



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie  
der Universität zu Lübeck**

**Direktorin: Prof. Dr. med. G. Riemekasten**

**Autoantikörperproduktion von gewebständigen Plasmazellen bei  
der Granulomatose mit Polyangiitis**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Gesche Weppner  
aus Rendsburg

Lübeck, 2018

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. P. Lamprecht

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. U. Schaible

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.01.2019

1	Inhaltsverzeichnis	
1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Zusammenfassung.....	6
3	Einleitung .....	8
3.1	Funktionen von B-Zellen in einer Immunantwort.....	8
3.1.1	Entwicklung einer dauerhaften B-Zellimmunantwort .....	9
3.1.2	Struktur und Vielfalt von Antikörpern .....	10
3.1.3	Klonale Selektion und Affinitätsreifung von IgLV & IgHV Genen in der Keimzentrumsreaktion .....	13
3.1.4	B-Zell Differenzierungsfaktoren (Blimp1, IL-21), IL-21 Rezeptor und IL-17A.....	14
3.1.5	Autoantikörper bei Autoimmunität .....	15
3.1.6	Werkzeuge zur genetischen Analyse von Immunglobulin-Genen.....	18
3.2	ANCA-assoziierte Vaskulitiden, insbesondere Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ....	20
3.2.1	Epidemiologische, klinische und diagnostische Charakteristika der GPA .....	20
3.2.2	Struktur und Funktion von ANCA.....	22
3.2.3	B Zell Autoimmunantwort in der Pathogenese bei der GPA.....	26
3.3	Fragestellung .....	28
4	Materialien .....	29
4.1	Geräte.....	29
4.2	Verbrauchsmaterialien .....	30
4.3	Verbrauchsreagenzien.....	30
4.4	Software .....	32
4.5	Primer .....	33
4.6	Antikörper .....	36
4.7	Angesetzte Reagenzien und Puffer.....	36
4.8	Patienteninformation .....	37
5	Methoden .....	40
5.1	Klonierung und Expression rekombinanter IgG aus gewebsständigen B Zellen bei der GPA	40
5.1.1	Lasermikrodissektion zur Isolierung von Einzelzellen aus dem Gewebsverband .....	40
5.1.2	semi-nested Einzelzell-PCR .....	41
5.1.3	Gelelektrophorese .....	45
5.1.4	TOPO-TA Klonierung zur Vorbereitung der Sequenzierung .....	46
5.1.5	Sequenzierung .....	47
5.1.6	Sequenzmodifizierung zur Klonierung in den Transfervektor .....	47

5.1.7	Klonierung in Transfervektor mittels Restriktionsenzym-Verdau und Ligation .....	49
5.1.8	Modifizierung des Transfervektors mittels PCR.....	51
5.1.9	Anreicherung der Transfervektorkonstrukte .....	54
5.1.10	Homologe Rekombination, Expression und Aufreinigung der rIgG.....	54
5.1.11	IgG1 ELISA.....	58
5.2	Spezifitätstestung rekombinanter IgG aus gewebständigen B Zellen bei der GPA.....	59
5.2.1	PR3-ANCA ELISA.....	59
5.2.2	Humaner Proteom Mikroarray .....	59
5.3	Analyse von IgHV & IgLV Genen .....	60
5.3.1	Meta-Analyse des Immunglobulingenrepertoires .....	60
5.3.2	Quantifizierung der Selektionsstärke von Mutationen .....	65
5.3.3	Sequenzierung monoklonaler anti-hPR3 Antikörper aus Maushybridomzellen .....	66
5.3.4	B Zellen – Repertoire aus Blut und Gewebe der Leichtkettengene mittels "next generation sequencing" .....	69
5.4	B Zell Differenzierungsfaktoren und ihre Effekte .....	78
5.4.1	mRNA Transkriptionsanalyse von IL-21, IL-21 Rezeptor, Blimp-1 und IL-17A .....	78
5.4.2	IL-21 & IL-21R Fluoreszenzfärbungen nasaler Biopsien .....	81
6	Ergebnisse .....	83
6.1	Klonierung und rekombinante Expression von IgHV & IgLV Genpaaren aus einzelnen B Zellen im entzündeten Gewebe bei der GPA.....	83
6.1.1	Darstellung zusammengehörender IgLV & IgHV Genpaare aus einzelnen gewebständigen B Zellen .....	83
6.1.2	Darstellung der Transfervektorkonstrukte .....	84
6.1.3	Homologe Rekombination und rekombinante Expression von IgG .....	85
6.1.4	Identifizierung von rekombinanten IgG1 .....	86
6.2	Spezifitätstestung rekombinanter IgG aus gewebständigen B Zellen bei der GPA.....	87
6.2.1	Die rIgG1 reagieren nicht mit humaner PR3 .....	87
6.2.2	Die rIgG1 reagieren mit bestimmten humanen Autoantigenen .....	87
6.3	Meta-Analyse des Immunglobulingenrepertoires (IgHV & IgLV) im entzündeten Gewebe bei der GPA .....	91
6.3.1	Unterschiede im IgHV Genrepertoire zwischen GPA und HC.....	91
6.3.2	Veränderte Muster von IgHV und IGHJ Genfrequenzen zwischen GPA und HC .....	92
6.3.3	Verlängerte CDR3-Region bei der GPA mit und ohne Berücksichtigung der IgHJ-Gensegmente .....	95
6.3.4	Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Art und Anzahl der Nukleotidmutationen zwischen GPA und HC .....	96

6.3.5	Hot Spot Motive in IgHV/IgLV Genen bei der GPA und der HC .....	98
6.3.6	Aminosäureaustausche in der CDR3 von IgHV & IgLV-Genen bei der GPA und der HC	103
6.3.7	Negative Selektion in der Rahmenregion von IgHV Genen bei der GPA .....	105
6.3.8	Keine erhöhte Anzahl von <i>S. aureus</i> spezifischen IgHV Genen im entzündeten Gewebe bei der GPA ( <i>in-silico</i> Analyse).....	107
6.4	Humane und murine anti-hPR3 Ig ähneln sich im V(D)J Rearrangement und unterscheiden sich in der CDR3 Aminosäuresequenz .....	108
6.5	High-Throughput IgLV Repertoire in entzündetem Gewebe und Blut bei der GPA ergab VJ-Rearrangierungen, die bei anti-PR3- IgLV Genen vorkommen .....	112
6.6	IL-21, IL-21 Rezeptor, Blimp1 und IL-17A werden in entzündetem Gewebe und im Blut bei der GPA exprimiert .....	114
6.6.1	IL-21, IL-21R, Blimp1 und IL-17A mRNA Expression im entzündeten Gewebe bei der GPA	115
6.6.2	Erhöhte mRNA Expression von Blimp1 in PBMC bei der GPA .....	115
6.6.3	Erhöhte Anzahl von IL-21R <sup>+</sup> Zellen im entzündeten Gewebe bei der GPA.....	117
7	Diskussion.....	119
7.1	Plasmazellen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA produzieren Auto-Antikörper .....	119
7.2	Veränderte Affinitätsreifung und Selektion von IgHV & IgLV Genen im entzündeten Gewebe bei der GPA .....	124
7.3	Vergleich der Eigenschaften zwischen IgLV & IgHV Gensequenzen von anti-hPR3 Ig und IgLV & IgHV Gensequenzen aus entzündetem Gewebe bei der GPA .....	128
7.4	Erhöhte Expression von Blimp1 mRNA in PBMC und erhöhte Anzahl von IL-21R <sup>+</sup> Zellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA .....	132
8	Verzeichnisse.....	135
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	135
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	139
8.3	Tabellenverzeichnis .....	142
8.4	Literaturverzeichnis .....	144
9	Anhang .....	163
10	Danksagung .....	169

## 2 Zusammenfassung

Bei der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die durch eine nekrotisierende granulomatöse Entzündung des oberen und unteren Respirationstraktes charakterisiert ist, sowie eine nekrotisierende Vaskulitis, die kleine und mittelgroße Gefäße betrifft. Diagnostische PR3-ANCA sind antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper, die die humane Proteinase 3 (PR3) erkennen. Die PR3-ANCA-induzierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten unterhält apoptotisch-nekrotische Prozesse der Entzündung. Das Zusammenspiel von chronischer Entzündung, Autoimmunantwort und hoher Antigen-Spezifität, nachweisbar anhand von Affinitäts-gereiften Antikörpern, suggeriert die Produktion von Autoantikörpern durch langlebige Plasmazellen. Im inflammatorischen Infiltrat bei der GPA werden Zeichen einer ektopisch-lymphatischen Gewebsneubildung in Form dendritischer Zellen, Clustern aus B- und T-Zellen und hoch-endothelialer Venolen gefunden. Der Nachweis von PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zellen in entzündlichen Geweben bei der GPA fehlt jedoch. Fokus meiner Arbeit sind direkte und indirekte Nachweise autoreaktiver B- und Plasmazellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA.

Dazu wurden sechs rekombinante Antikörper von gewebständigen Plasmazellen oder B-Zellen aus entzündlichen Läsionen bei der GPA kloniert und exprimiert. Die dafür notwendigen IgLV & IgHV Genpaare Laser-mikrodissektierter, einzelner B-Zellen wurden per Einzelzell-PCR amplifiziert. Mögliche Interaktionspartner der sechs rekombinanten Antikörper wurden gepoolt in einem Proteom-Mikroarray identifiziert. Darunter war PUF60, ein neues Autoantigen, beschrieben bei anderen chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen. Andere mögliche Interaktionspartner wie F-Box Protein 2, Azetyltransferasen oder RAD23 sind interessant, weil sie eine Rolle in der ungefalteten Protein-Antwort, der Epigenetik oder der DNA-Reparatur spielen und neue Hinweise auf pathogenetische Prozesse im entzündlichen Gewebe bei der GPA liefern können. Um weitere Indizien für eine Autoimmunantwort im entzündlichen Gewebe bei der GPA zu finden, wurde eine Meta-Analyse mit IgLV & IgHV Genen von 231 B-Zell-Klonen aus respiratorischem Gewebe bei der GPA durchgeführt. Mittels der Methode des "next generation sequencing" generierte IgHV Gene aus peripherem Blut gesunder Probanden (244.353 B-Zell Klone) und publizierte IgLV Gene (148 B-Zell Klone) fungierten als Kontrollen. Bei der GPA führen primäre und wahrscheinlich sekundäre Mechanismen zu einer veränderten VDJ Rearrangierung und einer verlängerten komplementaritäts-determinierenden Region 3 (CDR3) in IgHV Genen. Aminosäure-Austausche in der Rahmenregion (FWR) von IgHV Genen bei der GPA waren negativ selektioniert. Zusätzlich wurden Ig Gene von drei murinen, monoklonalen anti-PR3 Antikörpern sequenziert und mit fünf bekannten PR3-spezifischen Antikörpern verglichen, die sich im V(D)J Rearrangement

ähnelten und eine unterschiedliche CDR3 Region aufwiesen. Ein genetischer (IgLV & IgHV) Abgleich dieser anti-PR3 Ig mit den 231 B-Zell Klonen des entzündlichen Gewebes bei der GPA in Bezug auf V(D)J Rearrangierungen und die abgeleitete Aminosäuresequenz der CDR3 Region offenbarte wenig Übereinstimmungen. Innerhalb der 231 B-Zellklone spricht dies gegen ein Vorkommen an Klonen mit genetischen Merkmalen ähnlich denen der anti-PR3 Ig. Um nach seltenen B-Zell Klonen im entzündlichen Gewebe bei der GPA zu suchen, wurde das Verfahren des "next generation sequencing" für IgLV-Gene in korrespondierenden Gewebs- und Blutproben bei der GPA etabliert und angewendet. Im Gegensatz zu den "low-throughput"-Methoden waren mit den anti-PR3 Ig vergleichbare Rearrangierungen in den mittels NGS erhaltenen produktiven IgLV Genen der korrespondierenden Gewebs- und Blutproben zu 1-14 % bei der GPA nachweisbar, wobei durchschnittlich über eine Million Sequenzen pro Probe betrachtet wurden. Die Expressionsanalyse von B-Zell-Differenzierungsfaktoren (Blimp1 und Interleukin-21), dem Interleukin-21 Rezeptor und IL-17A mittels mRNA und Gewebefärbungen bei der GPA zeigte eine erhöhte Blimp1-Transkription in peripheren mononukleären Zellen des Blutes bei der GPA im Vergleich zu Gesunden sowie eine erhöhte Anzahl Interleukin-21 Rezeptor<sup>+</sup> Zellen im entzündeten Gewebe bei der GPA im Vergleich zu nasalen Schleimhautbiopsien bei chronischer Rhinosinusitis. Solche Veränderungen bieten Ansatzpunkte, um Mechanismen bei der Entwicklung autoreaktiver Plasmazellen aufzuklären.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass PR3-ANCA produzierende B-Zellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA als seltene Klone vorkommen. Hinweise auf autoreaktive B- und Plasmazellen anderer Spezifitäten müssen experimentell noch bestätigt werden und liefern ggf. die Voraussetzung für die Untersuchung neuer pathogenetischer Mechanismen. Genetische Abweichungen in den IgLV & IgHV Genen unterstreichen die Bedeutung von B-Zellen in entzündlichen Läsionen bei der GPA und stehen in Einklang mit einer veränderten follikulären Reifung von B-Zellen im entzündlichen Gewebe bei einer prototypischen Autoimmunerkrankung.

### **3 Einleitung**

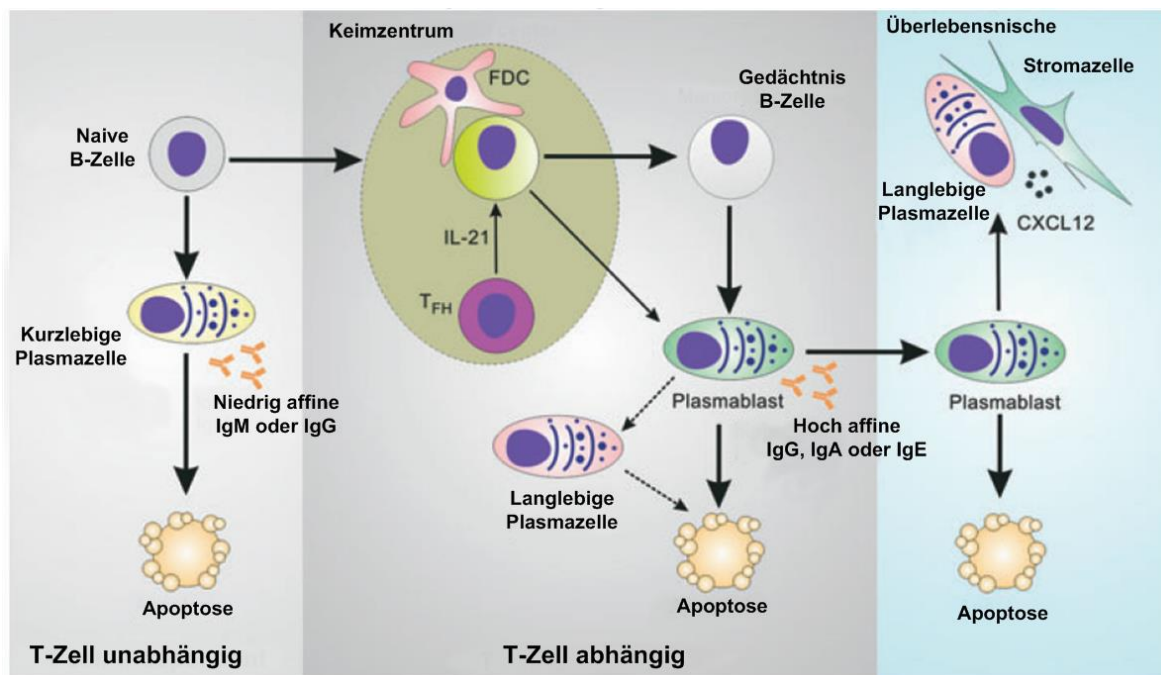
#### **3.1 Funktionen von B-Zellen in einer Immunantwort**

Das angeborene Immunsystem ist immer präsent und stellt erste Resistenz-Mechanismen gegen Gruppen ähnlicher Pathogene bereit. Mikrobielle Oberflächen aktivieren das Komplement-System. Auch anatomische Barrieren, antimikrobielle Peptide, Makrophagen und Neutrophile mit Pathogen-Muster-Erkennungs-Rezeptoren sind Funktionen des angeborenen Immunsystems. Da viele Mikroorganismen (z. B. Bakterien) Moleküle auf der äußeren Oberfläche haben, die nicht von Muster-Erkennungs-Rezeptoren der Phagozyten erkannt werden, reicht das angeborene Immunsystem oft nicht aus, um solche Pathogene zu bekämpfen. Im Gegensatz zu Phagozyten und Proteinen des Komplement-Systems sind Antikörper, die in der adaptiven Immunantwort entwickelt und von B-Zellen produziert werden, Antigen-spezifisch. Die adaptive Immunantwort wird mit dem Erreichen von Antigen-präsentierenden Zellen im lymphatischen Gewebe initiiert. Die Erkennung eines Antigen-Epitopes von B-Zell Rezeptoren (Oberflächengebundenes Immunglobulin) aktiviert die jeweilige B-Zelle und kann das Antigen in das Innere der B-Zelle befördern. Im Inneren der B-Zelle kann das Antigen verdaut werden, sodass Peptide des Antigens mit MHC II Molekülen auf der Oberfläche der B Zelle präsentiert werden können. Diese werden von Antigen spezifischen T-Helfer Zellen erkannt, die ebenfalls in Antwort auf das Antigen/Pathogen differenziert wurden. Mit der Erkennung passender T- oder B-Zell-Rezeptoren kommt es zur Proliferation der entsprechenden Zelle und Differenzierung in klonale Effektorzellen. Klonale Zellen bezeichnen Zellen, die aus einer einzigen Vorläuferzelle differenziert wurden. Ein Teil der proliferierenden B-Lymphozyten differenziert in Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen, die bei einer Re-Infektion desselben Pathogens für eine schnelle Eliminierung sorgen. Die Antikörper-Produktion ist eine zentrale Effektorfunktion von B-Zellen. Zur humoralen Immunantwort zählen Antikörper, welche zusammen mit phagozytotischen Zellen und speziellen Molekülen das Pathogen entfernen. Antikörper kommen im Blut und extrazellulären Körperflüssigkeiten vor. Der erste und direkteste Weg, mit dem Antikörper vor Pathogenen oder ihren Produkten schützen, ist die sogenannte Neutralisation. Dabei wird das Pathogen von Antikörpern gebunden, sodass die Pathogene keinen Zugang zu Zellen haben, die sie infizieren oder zerstören würden. Darüber hinaus ermöglichen Antikörper phagozytotischen Zellen wie Makrophagen oder Neutrophilen die Aufnahme und Zerstörung des Bakteriums durch Opsonierung. Pathogen-gebundene Antikörper binden dabei mit ihrem Stamm (Fc-Teil) an Phagozyten und werden so in die Zelle aufgenommen. Mit dem Fc-Teil aktivieren Pathogen-gebundene Antikörper auch das erste Protein des Komplement-Systems. Bestandteile des Komplement-Systems zerstören Bakterien und unterstützt bakterizide Phagozyten. Antikörper verschiedener Klassen werden an

verschiedenen Kompartimenten des Körpers gefunden und unterscheiden sich in der Rekrutierung der Effektormechanismen (Murphy, 2012). Insgesamt ähnelt die koordinierte Aktivität des Immunsystems einem sozialen Netzwerk, sodass komplexe immunologische Aufgaben jenseits der aufsummierten Funktion einzelner Zellen möglich werden. Dabei variieren die Funktionen ausgesendeter Signale je nach zellulärem Sender, Empfänger oder (patho-)physiologischem Zustand (Rieckmann et al., 2017).

### 3.1.1 Entwicklung einer dauerhaften B-Zellimmunantwort

Die Reifung von B-Zellen (Abb.1) beginnt mit der Aktivierung naiver B-Zellen, die über Pathogen-erkennende Rezeptoren oder Antigen-Quervernetzung des B-Zellrezeptors initiiert wird (Chu und Berek, 2013).



**Abbildung 1: Entwicklung kurzlebiger und langlebiger Plasmazellen (Chu und Berek, 2013)**

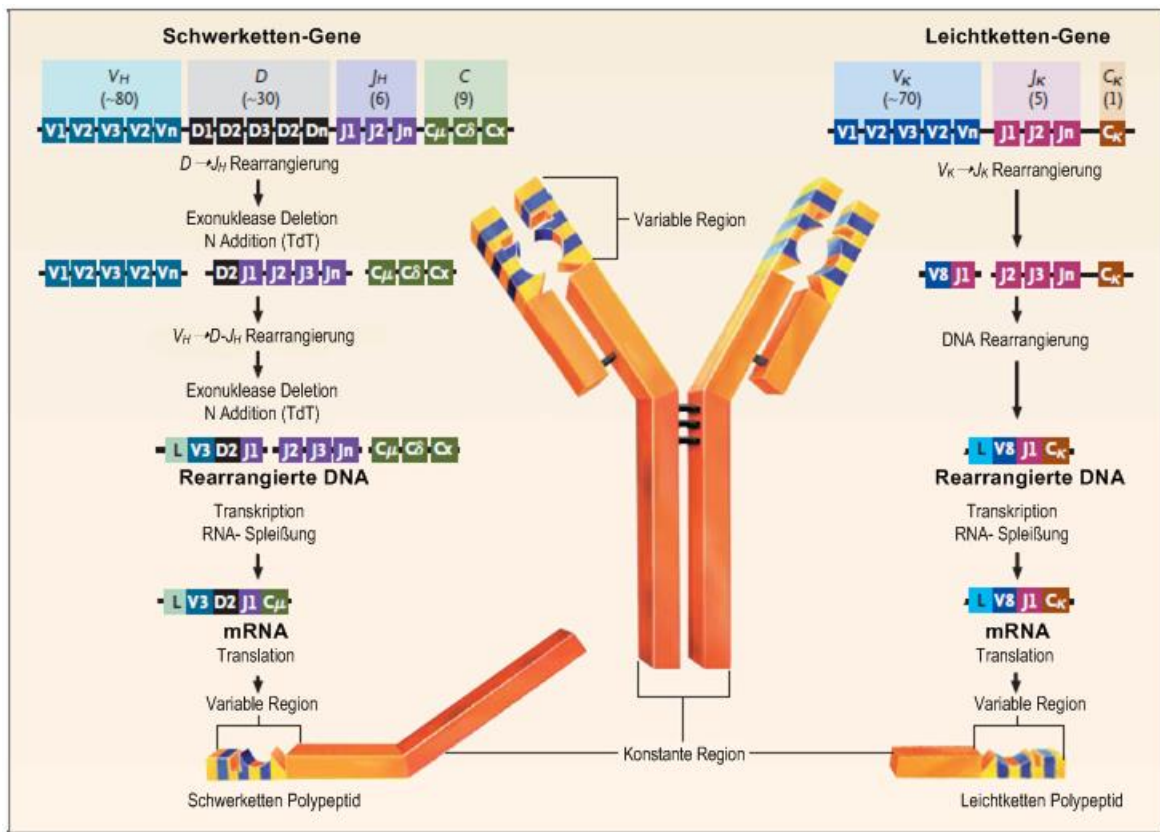
Zur Abwehr fremder Antigenen proliferieren und differenzieren B-Zellen in kurzlebige Plasmazellen, die unmutierte IgM oder IgG niedriger Affinität produzieren. Antigen-aktivierte B und T-Zellen können die Formation eines Keimzentrums in sekundären lymphatischen Geweben induzieren. Für die Entwicklung von hochaffinen B-Zellen des Keimzentrums in Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten sind Interaktionen mit Antigen-präsentierenden, follikulären, dendritischen Zellen (FDCs) und IL-21 nötig, welches von T-follikulären Helferzellen (T<sub>FH</sub>) produziert wird. Nach einem zweiten Kontakt mit dem Antigen, differenzieren Gedächtnis B-Zellen rasch in Plasmablasten, die CXCR4 hoch exprimieren. Plasmablasten migrieren in das Knochenmark, wo sie von CXCL12-exprimierenden Stromazellen zurückgehalten werden. Eine Fraktion dieser Plasmablasten reift in Plasmazellen und überlebt für lange Zeit in hoch spezialisierten Überlebensnischen.

Es wurden verschiedene Theorien diskutiert, wie der dauerhafte Schutz durch Antikörper gegen spezielle Antigene erhalten bleibt (Chu und Berek, 2013). Zum einen gibt es die Theorie, dass ein persistierender Kontakt zum Antigen erforderlich ist (Zinkernagel, 2014). Humane Antigen-spezifische Gedächtnis B Zellen können Organ-unabhängig erhalten und reaktiviert werden. Gedächtnis B-Zellen proliferieren in einer Antigen-spezifischen Weise

und differenzieren nach Antigen Re-Exposition (Giesecke et al., 2014; Schrezenmeier et al., 2018). Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren kontinuierlich im Körper im Gegensatz zu sessilen Plasmazellen. Zum anderen sezernieren langlebige Plasmazellen, unabhängig einer Antigen-Stimulation (Hiepe et al., 2011), kontinuierlich hoch-affine Antikörper, die im Körper verteilt werden. Langlebige Plasmazellen werden in zwei Schritten generiert, bei der einige der kurzlebigen, extrafollikulär aktivierten B-Zellen in einen Follikel einwandern und T-Zell abhängig in Plasmablasten differenzieren (Schrezenmeier et al., 2018). Finden Plasmablasten während ihrer migratorischen Phase von einer Woche eine Überlebensnische, können sie dort überleben solange die Nische nicht in Folge einer ausgeheilten Entzündung aufgelöst wird. Solche Plasmazell-Überlebensnischen können in lymphatischen Organen, entzündetem Gewebe oder dem Knochenmark vorkommen. Die Anzahl an Plasmazell-Überlebensnischen scheint begrenzt zu sein, vergrößert jedoch die maximale Menge an Antikörpern während einer Immunantwort und verursacht im Anschluß die Bildung protektiver Antikörper-Konzentrationen im Serum. Der Wettbewerb um Überlebensnischen zwischen langlebigen Plasmazellen und neu gebildeten, migrierenden Plasmablasten erhält die Vielfalt des humoralen Gedächtnisses (Radbruch et al., 2006). Nach dem Modell der Multi-Komponenten-Plasmazell-Nische müssen spezielle Bedingungen für das Überleben von Plasmazellen vorherrschen. Neben einer mesenchymalen Stromazelle zur Stabilisierung kann eine hämatopoietische Zellkomponente nötig sein, die je nach (patho)-physiologischen Bedingungen und dem Alter des Individuums zwischen Megakaryozyten, Basophilen, Eosinophilen und Makrophagen variieren kann (Winter et al., 2011).

### **3.1.2 Struktur und Vielfalt von Antikörpern**

Im Allgemeinen bestehen Immunglobuline aus Leicht- und Schwereketten, die variable und konstante Regionen aufweisen (Abb. 2 (Schwartz, 2003)). Die kodierende DNA-Sequenz für die variable Region der Leichtkette (IgLV) und Schwerekette (IgHV) entsteht durch Rearrangierung einer Gruppe vererbter Gensegmente. Bei einer Schwerekette wird zunächst ein individuelles D Gensegment zufällig mit einem der  $J_H$  Gensegmente rearrangiert, bevor ein  $V_H$  Segment vor die  $DJ_H$  Einheit rearrangiert wird. Diese Rearrangierungen schaffen die Voraussetzung zur Fusion mit der kodierenden Region für die konstante Region der Schwerekette mittels RNA Spleißung. Das kodierende Gen für die Leichtkette wird analog gebildet, weist jedoch kein Diversitäts-Gensegment D auf (Murphy, 2012).



**Abbildung 2: Entstehung der Antikörpervielfalt; (Schwartz, 2003)**

Die Schwer- und Leichtketten eines Antikörpermoleküls enthalten variable und konstante Regionen. Die variable Region bindet ein Antigen, wobei die konstante Region den Isotyp (IgM, IgG, IgA, IgE oder IgD) spezifiziert (hier IgG). Die kodierende Region der variablen Region der Schwerkette wird durch die Rearrangierung individueller Gene ( $V_H$ ,  $D$ ,  $J_H$ ) geformt. Dieser Prozess beginnt während der B-Zell Entwicklung, wenn Rekombinasen die zufällige Fusion eines  $D$  Segments mit einem  $J_H$  Segment initiieren und eine Endonuklease die verbleibenden  $D$  und  $J_H$  Segmente ausschneidet. Ein ähnlicher Mechanismus verbindet ein  $V_H$  Gen mit einer  $D-J_H$  Einheit. Nach der  $D \rightarrow J_H$  und  $V_H \rightarrow D-J_H$  Rearrangierung fügt die terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) bis zu sechs Nucleotide in zufälliger Weise zwischen die rearrangierten Gene. Das zusammengesetzte  $V_H-D-J_H$  Trio wird dann mit einem DNA-Segment zusammengebracht, welches die konstante Region eines IgM Moleküls ( $C_\mu$ ) kodiert, um die kodierende Einheit ( $V_H-D-J_H-C_\mu$ ) einer Schwerkette des IgM-Typs zu formen. Als nächstes bildet die unreife B-Zelle Leichtketten des  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Typs durch zufällige Rearrangierung von  $V_K$  und  $J_K$  (oder  $V_\lambda$  und  $J_\lambda$ ), die mit einem Gensegment der konstanten Region ( $C_\kappa$  oder  $C_\lambda$ ) fusionieren. Die vorangehende Sequenz (L) in der Immunglobulin-mRNA signalisiert den Transport des Schwer- oder Leichtkettenpolypeptides zur B-Zell Oberfläche.

Die variable Region von Antikörpern wird weiter unterteilt in Struktur-unterstützende Rahmenregionen (FWR) und Komplementaritäts-determinierende Regionen (CDR), die sich im IgHV/IgLV Gen abwechseln (FWR1-CDR1-FWR2-CDR2-FWR3-CDR3-FWR4) (Chang und Casali, 1994). Unterschiede von Antikörpern beruhen vor allem auf der kodierten CDR-Region des IgHV/IgLV Gens, welche die Bindungstasche für das Antigen formt (Schwartz, 2003). Die Vielfalt der verschiedenen Antikörper beruht u. a. auf den vielen Kombinationsmöglichkeiten in der Zusammenstellung von  $V_H$ ,  $D$  und  $J_H$  Gensegmenten im variablen Teil der Schwerkette und von  $V_K/V_\lambda$  und  $J_K/J_\lambda$  Gensegmenten im variablen Teil der Leichtkette des B-Zellrezeptors, die zusätzlich durch unpräzise Fusionen gesteigert wird. Solche V(D)J Rekombinationen sind spezifisch für die B-Zelllinie und abhängig von ihrem Entwicklungsstand. Nur in einer von drei Rearrangierungen bleibt ein

funktionierender Leserahmen erhalten, sodass das IgHV/IgLV Gen als produktiv oder funktionell gilt. Die Anzahl an produktiven Rearrangierungen in differenzierenden B-Lymphozyten im Knochenmark kann durch Rearrangierung des zweiten Allels erhöht werden. Die funktionelle Rearrangierung und Expression von IgHV/IgLV Genen treibt die Entwicklung von Vorläufer B-Zellen in unreifen B-Lymphozyten im Knochenmark voran, welche nun IgM-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren und das Knochenmark verlassen. Die Rezeptoreditierung bzw. zweite Rearrangierung der Leichtkette kann als Mechanismus betrachtet werden, der die Spezifität selbst-reaktiver B-Zellen abwandelt (Bassing et al., 2002). Das nachträgliche Austauschen eines  $V_H$  Segmentes in rearrangierten IgHV Genen durch andere  $V_H$  Segmente gilt als sekundärer Mechanismus, der die Antikörpervielfalt erhöht (Briney und Crowe, 2013). Wird das rearrangierte  $V_H$  Segment durch ein weiter vorne liegendes  $V_H$  Segment über flankierende Sequenzbereiche mit Rekombinationssignalen ersetzt, gilt dies als klassischer Mechanismus. Ob das nachträgliche Austauschen des  $V_H$  Segmentes im Knochenmark etwa zur Zeit der konventionellen VDJ Rearrangierung stattfindet und/oder in reiferen B-Zell Populationen ist noch nicht abschließend geklärt. Dieser Mechanismus kann sich bewährt haben, um die Anzahl produktiver Rearrangierungen zu erhöhen, produziert allerdings mutmaßlich längere CDR3-Regionen. Ob dieser Mechanismus eine schützende Funktion hat oder an der Entwicklung von Autoimmunität beteiligt ist, bleibt Spekulation. Im Schwerketten-Repertoire von B-Zellen kann der nachträgliche  $V_H$ -Austausch indirekt über spezielle Fußabdrücke in der DNA-Sequenz nachgewiesen werden, wobei die Spezifität solcher Sequenzmuster für den  $V_H$ -Austausch noch fraglich ist (Meng et al., 2014). 55-75 % der unreifen B-Zellen exprimieren selbst-reaktive B-Zell-Rezeptoren. Daher gibt es neben dem ersten Kontrollpunkt im Knochenmark einen weiteren, späteren Kontrollpunkt in der Entwicklung von B-Zellen, der selbst-reaktive B-Zellen ausselektiert. Es wurde beobachtet, dass Antikörper mit verlängerter, positiv geladener CDR3-Region in Vorläufer-B-Zellen und unreifen B-Zellen gehäuft vorkommen, wobei diese Eigenschaften, die mit selbst- und poly-Reaktivität assoziiert sind, im B-Zell-Repertoire gesunder Probanden während der weiteren Entwicklung verloren gehen. Der Umstand, dass große Mengen an Autoantikörpern unter physiologischen Bedingungen vorkommen, suggeriert, dass schon kleine Veränderungen in der Effizienz der Autoantikörper-Regulierung die Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen erhöht (Wardemann et al., 2003).

### 3.1.3 Klonale Selektion und Affinitätsreifung von IgLV & IgHV Genen in der Keimzentrumsreaktion

Paul Ehlich postulierte, dass das Immunsystem eine Reihe an einzigartigen Rezeptoren bereitstellt ohne Kontakt zum Antigen gehabt zu haben. Diese Entdeckung trug zum heutigen Konzept der klonalen Selektion bei, nach welchem B-Zellen in ihrer Proliferation begünstigt werden, deren Rezeptor eine hohe Affinität zum Antigen aufweist (Schwartz, 2003). Unreife B-Zellen, die das Knochenmark verlassen, kommen in Kontakt mit Antigenen. Die Bindung von IgM an ein Antigen ist von geringer Affinität, kann jedoch physiologische Reaktionen auslösen. In sekundären lymphatischen Organen löst diese Bindung die schnelle Proliferation aus, die zur Formierung sogenannter Keimzentren führt. Die somatische Hypermutation dient mit dem schrittweisen Einbau von Substitutionsmutationen in funktionell rearrangierten IgHV/IgLV Genen der Affinitätsreifung an ein Antigen und der Diversifikation. Funktionell rearrangierte IgHV Gene können über eine rekombinatorische Deletion einem Klassenwechsel unterzogen werden, wobei die Exons der konstanten Region der IgM Klasse entfernt werden, sodass die IgHV Gene mit abwärts liegenden konstanten Regionen anderer Klassen verbunden werden. Die somatische Hypermutation läuft in zwei Phasen ab, zunächst werden C:G Paarungen targetiert, deren resultierende A:T Paarungen in einer anschließenden Phase substituiert werden können. Das Enzym AID katalysiert die Deaminierung von Deoxycytidin, sodass eine Fehlpaarung aus Uracil und gegenüberliegendem Glycin entsteht. Das Spektrum der resultierenden Nukleotidmutationen hängt ab von der Erkennung, Prozessierung und Auslösung der U:G Fehlpaarung durch Proteine, die normalerweise eine Rolle in der DNA Reparatur spielen. Wird die DNA repliziert, entstehen an Uracil-Positionen Transitionsmutationen. Wird Uracil vorher durch die DNA Glycosylase der Basen-Exzisions-Reparatur entfernt, können an der abasischen Stelle neben Transitionen ebenfalls Transversionsmutationen entstehen. Wird die U:G Fehlpaarung erkannt, kommt es zu einem Reparaturmechanismus bei welchem Substitutionen an vorübergehenden A:T Transitionen entstehen (Di Noia und Neuberger, 2007). Unproduktive IgHV/IGLV Rearrangierungen einer Zelle mit exprimiertem funktionellen B-Zellrezeptor unterlaufen gleichermaßen die somatische Hypermutation, allerdings separat von der klonalen Selektion in Form der Affinitätsreifung an einem Antigen. Punktmutationen ausgehend von einer definierten Base geschehen bevorzugt in der Umgebung bestimmter Nukleotide, die sich im Vergleich zum Keimbahngen in der tatsächlichen Sequenz herausgebildet haben. Für Mutationen, ausgehend von „G“ oder „C“, wurden die entsprechenden Hotspotmotive RGYW und WRCY beschrieben mit R=A/G, Y=C/T, H=T/C/A D=A/G/T entsprechen der IUPAC Nomenklatur. Obwohl auch die Hotspotmotive WA und TW für die mutierten Basen „A“ oder „T“ umkehrbar erscheinen, werden in der somatischen Hypermutation häufiger „A“

Nukleotide mutiert als „T“ Nukleotide. Möglicherweise laufen Mutationen von „A“ oder „T“ nach einem ähnlichen Prinzip ab, aber nicht gleichzeitig auf beiden DNA-Strängen. Mutationen von „G“ oder „C“ weisen in den meisten Studien keine Abweichungen in der Anzahl auf (Spencer und Dunn-Walters, 2005).

### **3.1.4 B-Zell Differenzierungsfaktoren (Blimp1, IL-21), IL-21 Rezeptor und IL-17A**

Der B-Zell Differenzierungsfaktor IL-21 bewirkt eine erhöhte Antikörperproduktion humaner B-Zellen, die unabhängig von einer Proliferation, eines Klassenwechsels oder einer Plasmazelldifferenzierung ist. Dabei bewirkt IL-21 über seinen Rezeptor die Phosphorylierung von STAT3 und moduliert den TLR-MyD88-STAT3 Signalweg (Liu et al., 2013). Die molekulare Basis einer IL-21 abhängigen Induktion von Blimp1 wurde identifiziert. Ein IL-21 bindendes Element liegt 3' vom Blimp1 kodierenden PRDM1 Gen, dessen Aktivität von STAT3 und IRF4 Bindung abhängig ist. Interessanterweise sind auch andere IL-21 regulierte Gene von der funktionellen Zusammenarbeit der Transkriptionsfaktoren STAT3 und IRF4 abhängig (Kwon et al., 2009).

Fast alle Neutrophilen scheinen IL-21R zu exprimieren, jedoch weniger als Lymphozyten (Takeda et al., 2014). Auch Neutrophile selbst können IL-21 exprimieren (Tecchio et al., 2014). IL-21 stimulierte Neutrophile zeigen eine gesteigerte phagozytotische Aktivität und erhöhte Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies. Die IL-21 vermittelten Signalwege in Neutrophilen scheinen sich von jenen in Lymphozyten zu unterscheiden, da es in Neutrophilen nicht zur IL-21 abhängigen Phosphorylierung von STAT3 kommt (Takeda et al., 2014). Plasmazellen aus sekundären lymphatischen Organen exprimieren signifikant mehr IL-21R als Plasmazellen des Knochenmarks. IL-21 verstärkt in Plasmazellen aus sekundären lymphatischen Organen die Ig Produktion, die durch die Anwesenheit von T<sub>FH</sub> Zellen mit ihrer autokrinen/parakrinen IL-21 Sekretion weiter ausgebaut wird (Rodríguez-Bayona et al., 2012). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-21, möglicherweise in Abhängigkeit des Signalzusammenhangs, unterschiedliche Effekte in B-Zellen auslöst. In B Zellen bewirkt nur die gleichzeitige Stimulation von IL-21 mit anti-CD40 und anti-IgM eine starke Proliferation, die zusätzliche Stimulation mit LPS führt jedoch zur Apoptose. Die proapoptotische Wirkung von IL-21 auf B-Zellen könnte für die Entfernung unbeteiligter B-Zellen in einer spezifischen Immunantwort von Vorteil sein. Der Klassenwechsel von B-Zellen in Keimzentren könnte auf der IL-21 abhängigen Induktion des B-Zell Differenzierungsfaktors Bcl-6 basieren (Ozaki et al., 2004). IL-21 kann unabhängig von IL-6 zusammen mit TGF- $\beta$  die Differenzierung naiver T Zellen in proinflammatorische T<sub>H</sub> 17 Zellen bewirken. Dabei kommt es zur Induktion von ROR- $\gamma$ t und IL-17 sowie zur Supprimierung von Foxp3. Der größte Produzent von IL-21 unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind die T<sub>H</sub> 17 Zellen, die somit über IL-21 einen amplifikatorischen Anteil in der T<sub>H</sub> 17

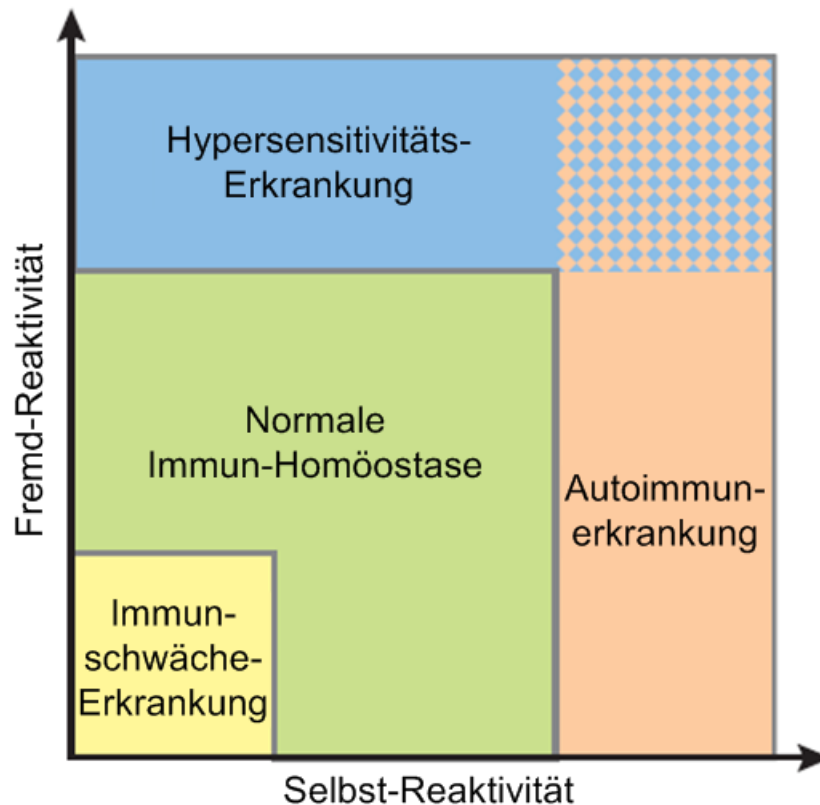
Differenzierung haben. IL-21R defiziente T Zellen konnten keine T<sub>H</sub> 17 Antwort generieren (Korn et al., 2007). IL17A wird charakteristischerweise von proinflammatorischen T<sub>H</sub> 17 Zellen produziert (Murphy, 2012). Obwohl Blimp1 lange Zeit als ein nötiger Faktor in der Generierung langlebiger Plasmazellen galt, dessen Targetierung sich in Autoimmunkrankheiten anbieten würde (Martins und Calame, 2008), wurde mittels selektiver Knock-out Experimente dargestellt, dass Blimp1 vor allem Prozesse der Antikörpersekretion reguliert. In generierten Plasmazellen wird dessen Erhalt durch IRF4, unabhängig von Blimp1, reguliert. Blimp1 ist ein zentraler Transkriptionsfaktor in der ungefalteten Protein-Antwort (UPR) in Plasmazellen (Tellier et al., 2016). Blimp1 ist mutmaßlich in der Differenzierung und Funktionsweise T regulatorischer Zellen beteiligt. Mäuse mit Blimp1 defizienten T-Zellen starben innerhalb weniger Monate an entzündlichen Erkrankungen. Dabei scheint Blimp1 für die Homöostase von T-Zellen wichtig zu sein, da es sowohl die Proliferation naiver T-Zellen begünstigt als auch die Apoptose Antigen-erfahrener T Effektorzellen (Martins und Calame, 2008).

### **3.1.5 Autoantikörper bei Autoimmunität**

Physiologisch geschieht die Eliminierung von hoch-affinen, selbst-reaktiven T- und B-Lymphozyten mittels negativer Selektion oder funktioneller Inaktivierung (Anergie) entsprechend im Thymus und Knochenmark (Elkon und Casali, 2008). Dies gilt als zentraler Toleranzmechanismus. In der Mikroumgebung des Knochenmarks, in der unreife B-Zellen entstehen, sind die Antigene fast alle selbst-reaktiv. Die Bindung solcher Antigene an B-Zell-Rezeptoren unreifer Lymphozyten bewirkt Prozesse zur Reduzierung der Selbstreaktivität. Ein neuer Aspekt der zentralen Tolleranz ist die Rezeptor-Editierung, welche die anhaltende Rekombination von Immunglobulin-Genen zulässt, um die Spezifität autoreaktiver B-Zell-Rezeptoren abzuwandeln. Die Kontrolle der zentralen Tolleranz ist bei der Rezeptor-Editierung lückenhaft (Nemazee, 2017). Der periphere Tolleranzmechanismus beruht auf dem angeborenen Immunsystem und reguliert die Unterscheidung zwischen selbst und fremd von Lymphozyten, die die zentralen lymphatischen Organe verlassen haben. In Abwesenheit einer Entzündung wird von Anigen-präsentierenden Zellen keine Aktivierung der adaptiven Immunantwort signalisiert, sodass eine selbst-reaktive naive B-Zelle zur Entwicklung regulatorischer Lymphozyten führen kann, die die Entwicklung von Effektormechanismen unterdrückt (Murphy, 2012).

Bei Autoimmunerkrankungen liegen eklatant abweichende Bedingungen vor, die sich von natürlichen Immunmechanismen stark unterscheiden. Mit diesem Dogma hat sich die Erforschung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beschäftigt. Eine Fehlregulation der natürlichen Homöostase (Abb. 3) scheint plausibler als der Beginn einer bisher abwesenden Selbstreaktivität. Das Gleichgewicht der Immunantwort gegen

körperfremde und körpereigene Antigene kann durch eine abnormale Antigenstimulation gestört werden (Jennette und Falk, 2010).



**Abbildung 3: Eine Gleichgewicht zwischen T-Zellen, B-Zellen und Antikörpern, die eine autoreaktive und/oder körperfremde Reaktivität aufweisen, ist an der normalen Immun-Homöostase beteiligt (Jennette und Falk, 2010).**

Ein gestörtes Gleichgewicht der Immunantwort führt zur Erkrankung. Dabei resultiert eine zu niedrige Immunantwort gegen fremde Pathogene in einer Immunschwächeerkrankung. Eine höhere Immunantwort gegen körperfremde Antigene als nützlich ist, führt zu Allergie oder Hypersensitivitäts-Erkrankung. Autoimmunerkrankungen entstehen bei einer höheren Immunantwort gegen körpereigene Antigene als nützlich ist.

Autoantikörper erkennen körpereigene Antigene, die in allen Zelltypen vorkommen oder die hochspezifisch für einen Zelltyp eines bestimmten Organs sind. Die Anwesenheit Organ-spezifischer Autoantikörper bei Organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen impliziert, dass Autoantikörper von der Entzündung des Organs gefördert werden. In systemischen Autoimmunerkrankungen ist die Herkunft der Autoantikörper weniger klar. Hoch-affine, somatisch hypermutierte IgG-Autoantikörper sind charakteristisch für Autoimmunerkrankungen und spiegeln einen pathologischen Prozess wieder, da sie in systemischen Autoimmunerkrankungen häufig Gewebsschäden verursachen. Dies geschieht über die Aktivierung von Effektormechanismen über den Fc-Teil der Autoantikörper. Nach Aufnahme von Immunkomplexen in Zellen kann über die Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (TLR) die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine bewirkt werden (Elkon und Casali, 2008). Die chronisch-

entzündliche Natur einer Autoimmun-Antwort und eine hohe Antigen-Spezifität, nachweisbar mit Affinitäts-gereiften Antikörpern, suggerieren die Produktion von Autoantikörpern durch langlebige Plasmazellen. Autoimmunität follikulären Ursprungs kann nach der Entwicklung von Gedächtnis B-Zellen und langlebiger Plasmazellen im Gewebe bislang nur unzureichend therapiert werden. Langlebige Plasmazellen sind resistent gegen Glucokortikoide, Immunsuppressiva und B-Zell depletierende Therapien (Hiepe et al., 2011; Vinuesa et al., 2009). Die Eliminierung Autoantigen-spezifischer langlebiger Plasmazellen stellt bei Autoimmunerkrankungen einen therapeutischen Ansatz dar (Radbruch et al., 2006). Werden in Abwesenheit einer adaptiven Immunantwort IgM Antikörper produziert, zählen sie zu den natürlichen Antikörpern (nAK) (Murphy, 2012). Die Entstehung von nAK wird in Analogie zu Molekülen der angeborenen Immunantwort als natürlich betrachtet. Im Gegensatz zu klassischen Antigen-spezifischen Antikörpern, binden nAK mehrere Antigene. Dabei ist die Polyreaktivität weder unspezifisch noch beruht sie auf Klebrigkeit, da jeder monoklonale, natürliche Antikörper ein bestimmtes Bindungsprofil aufweist und strukturell ähnliche Antigene unterscheiden kann (Mannoor et al., 2013). Polyreaktive Antikörper sind ein Hauptbestandteil der natürlichen Antikörper im peripheren Blut Gesunder, kommen dort jedoch hauptsächlich in gebundener Form an endogene Antigene vor. In rheumatologischen Autoimmunerkrankungen ist der prozentuale Anteil polyreaktiver Antigen-bindender B-Zellen im Vergleich zu Gesunden unverändert oder leicht erniedrigt (Chen et al., 1998). Die Mehrheit der nAK erkennen verschiedene Strukturell-unabhängige (Auto-)Antigene intra- oder extrazellulärer Art. Alle Isotypen von Antikörpern können als natürliche Autoantikörper vorkommen. Monoklonale Antikörper des IgM Isotyps haben meist nur wenige Mutationen erfahren und werden maßgeblich von Keimbahngenen kodiert. Dabei ist die CDR3-Region im IgHV Gen verlängert und meist positiv geladen (Avrameas, 2016). Ob nAK an der Entwicklung einer T-Zell abhängigen Differenzierung von Gedächtnis-Zellen beteiligt sind, ist noch unklar. Möglicherweise gibt es einen Kontrollpunkt im Keimzentrum, der die Entwicklung von nAK in Affinitäts-gereifte IgG-Autoantikörper bei Gesunden verhindert. Dabei könnte die nachträgliche Rezeptor-Editierung der Schwereketten ein wichtiger Mechanismus sein. Es gibt starke Hinweise, dass nAK mit immunregulatorischen und protektiven Funktionen selbst-reaktiv sind. Die Bindung und Beseitigung apoptotischer Zellen kann eine allgemeine Eigenschaft protektiver nAK sein, die Autoimmunität unterdrückt. In einigen Fällen können nAK des IgM-Typs die Produktion von IgG-Autoantikörpern über ihre anti-idiotypische Aktivität verhindern (Mannoor et al., 2013). Immunglobuline desselben Idiotyps erkennen dieselben Epitope, weisen jedoch unterschiedlich rearrangierte Immunglobulin-Gene auf (Murphy, 2012). Die Antigen-bindenden Regionen von Antikörpern, die sich gegenseitig erkennen, werden als Idiotyp und anti-Idiotyp bezeichnet. Bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen mit B-Zell-

depletierenden Medikamenten sollte ein regulatorisches Netzwerk mit Interaktionen von nAK und pathogenen Antikörpern bedacht werden. Da viele Pathogene Antigene exprimieren, die körpereigenen Strukturen ähneln, können nAK gegen solche Strukturen, das Vordringen von Pathogenen in humane Zellen und Gewebe einschränken (Jennette und Falk, 2010). Die Selektion unmutierter natürlicher Autoantikörper kann zum Auftreten pathogener Autoantikörper führen (Elkon und Casali, 2008). Dabei werden Mechanismen zur Diversifikation wie Affinitätsreifung und sekundäre Rearrangierungen in der IgHV/IgLV Gen-Region benötigt (Briney und Crowe, 2013).

Für genetische Analysen von IgLV & IgHV Genen kann die Technologie des "next generation sequencing" angewendet werden. Dabei können Proben im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung schneller, mit höherem Durchsatz und größerer Genauigkeit sequenziert werden (Metzker, 2005). Die daraus resultierende höhere Sequenzierungstiefe bedeutet die akkurate Erfassung von gering konzentrierten Sequenzen (Bentley et al., 2009). Um den Vergleich von Immunglobulin-Genen beider Sequenzierungstechnologien zu erleichtern, können statistische Methoden (Punkt 5.3.1.2 und 5.3.1.4) verwendet werden.

### **3.1.6 Werkzeuge zur genetischen Analyse von Immunglobulin-Genen**

Um Immunglobuline zu identifizieren, gibt es verschiedene bioinformatische Methoden wie IMGT/V-Quest, Ig-Blast, MIGEC und MIXR (Bolotin et al., 2015; Li et al., 2013; Shugay et al., 2014; Ye et al., 2013). Sie unterscheiden sich in der Ergebnisausgabe von der alleinigen CDR3-Identifikation bei MIGEC (Shugay et al., 2014) bis zu umfassenderen Informationen bei IMGT/V-QUEST und MIXR wie der Zuordnung von Keimbahngenen, FWR- und CDR-Regionen sowie dem Ausmaß an somatischen Hypermutationen (Bolotin et al., 2015; Li et al., 2013). Eine standardisierte Analyse des Immunglobulin-Gen Repertoires fehlt noch immer, IMGT gilt derzeit als Datenbank der Wahl (Greiff et al., 2015). Für die spezielle Auswertung gibt es weitere bioinformatische Werkzeuge. Viele funktionelle Interaktionen zwischen Genen und Proteinen, die an immunologischen Prozessen und Krankheiten beteiligt sind, sind noch unbekannt. Um solche Mechanismen aufzuklären wurde ImmuNet entwickelt (Gorenshteyn et al., 2015). Zur quantitativen Vorhersage eines Immunglobulin-Repertoires wurde ein System-immunologisches Werkzeug entwickelt (Greiff et al., 2017).

#### **3.1.6.1 IMGT/V-Quest**

IMGT, das internationale ImMunoGeneTics Informationssystem wurde 1989 von M. P. Lefranc im französischen Montpellier gegründet und gilt als Referenzdatenbank für Immunogenetik und Immunoinformatik. Es dient dazu komplexe immunogenetische Daten nach definierten Regeln zu standardisieren und zu verwalten. IMGT stellt unter anderem für Immunglobulingene interaktive online-Werkzeuge, Datenbanken und Referenzquellen zur

Verfügung (Lefranc, 2011). Mit dem online-Werkzeug IMGT/V-Quest können rearrangierte V, D und J Gensegmente identifiziert werden und Mutationen beschrieben werden (Brochet et al., 2008). IMGT/HighV-QUEST ist eine Hochdurchsatz-Variante von IMGT/V-QUEST, die Gruppen von bis zu 500.000 Sequenzen analysieren kann (Alamyar et al., 2012; Giudicelli et al., 2015). Die einheitliche Bezifferung, das sogenannte "IMGT unique numbering", gilt als großer Durchbruch in der Immunogenetik und Systembiologie, da 1997 erstmals ein Zusammenhang zwischen der Nukleotid-abgeleiteten Aminosäuresequenz und der räumlichen Struktur der variablen Region hergestellt werden konnte. Dabei wurden hochkonservierte Strukturen mit Kenntnissen aus dem Vergleich von über 5.000 Sequenzen, aus der Literatur über die FWR und CDR-Regionen, aus Strukturdaten und der Charakterisierung hypervariabler Loops in der CDR verflochten. Die standardisierte Abgrenzung von CDR und FWR wurde nach der längsten CDR1 und CDR2 Region der Keimbahngene definiert und für die CDR3 Region nach statistischen Analysen der Rearrangierung definiert. Fehlende Positionen einer individuellen Sequenz werden mit Punkten markiert, damit die Sequenzen nach der einheitlichen Bezifferung vergleichbar werden. Diese Kenntnisse zum IMGT unique numbering wurden von Lefranc in einem Zeitraum von 1997 bis 2003 veröffentlicht. Eine global anerkannte standardisierte Klassifikation und Nomenklatur wurde für die Gruppe, die Subgruppe, das Gen und das Allel eines Immunglobulins entwickelt. Da V(D)J Segmente von Leichtkette des  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Typs und Schwereketten unterschieden werden müssen, besteht die Gruppe der Immunglobuline der Spezies Homo Sapiens aus 10 Unterkonzepten (IgHV, IgHD, IgHJ, IgHC, IgkV, IgkJ, IgkC, Ig $\lambda$ V, Ig $\lambda$ J, Ig $\lambda$ C). In der Subgruppe werden Gene einer Gruppe zusammengefasst, die auf Nukleotidebene zu mehr als 75 % übereinstimmen, was ebenfalls auf die Keimbahngenkonfiguration jenes Rearrangements zutreffen muss. Das Allel ist ein Klassifikationskonzept, um polymorphe Varianten eines Gens zu beschreiben und wird mit einem \* in der IMGT-Nomenklatur versehen. Um die Kompatibilität zu erleichtern, arbeitet IMGT mit verschiedenen, anderen Datenbanken wie HGNC oder NCBI Gene zusammen (Lefranc, 2011).

Der IgHV Locus auf Chromosom 14q32.33 weist eine Länge von 1250 kb auf. Es gibt 7 IgHV Hauptgruppen. Auf Chromosom 15 und 16 gibt es 35 separate IgHV Gene, die jedoch auf Grund ihrer Lokalisation nicht zur Synthetisierung von Immunglobulinen beitragen können (Lefranc, 2001a). Der IgkV Locus befindet sich auf Chromosom 2p11.2, wobei separate IgkV Gene auf Chromosom 1, 2, 15 und 22 liegen (Lefranc, 2001b). Der Ig $\lambda$ V Locus befindet sich auf Chromosom 22q11.2 und umfasst 1050 kb, wobei separate Ig $\lambda$ V Gene auf Chromosom 8 und 22 liegen (Lefranc, 2001c).

## **3.2 ANCA-assoziierte Vaskulitiden, insbesondere Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)**

### **3.2.1 Epidemiologische, klinische und diagnostische Charakteristika der GPA**

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) zählt zu den ANCA assoziierten Vaskulitiden innerhalb der Kleingefäßvaskulitiden (Jennette et al., 2013). ANCA assoziierte Vaskulitiden sind Autoimmunerkrankungen und werden basierend auf klinischen und pathologischen Merkmalen in drei verschiedene Krankheiten eingeteilt: die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) und die Eosinophilen Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) (Lamprecht et al., 2018). ANCA assoziierte Vaskulitiden werden durch die nekrotisierende Entzündung kleiner und mittelgroßer Gefäße und die Anwesenheit von ANCAs charakterisiert (Cornec et al., 2016). Ohne Behandlung enden ANCA assoziierte Kleingefäßvaskulitiden durchschnittlich nach fünf Monaten letal, meist in Folge eines Nieren- oder Lungenversagens (Berden et al., 2012). Die EGPA unterscheidet sich von der GPA besonders durch die Hypereosinophilie (>10 %) und der Assoziation mit Asthma, bei der MPA kommen keine extravaskulären Granulome vor (Jennette et al., 2014). Grundsätzliche Definitionen von Krankheits- und Aktivitätsstadien bei Vaskulitiden wurden auf der internationalen Chapel Hill Consensus Konferenz anhand der Einschätzung von Experten festgelegt und werden im Folgenden zusammengefasst (Hellmich et al., 2007). Danach kann die Erkrankung in einem lokalen Stadium, einem früh-systemischen, einem generalisierten und einem schweren renalen Stadium auftreten. In der sog. Remission fehlt jegliche Krankheitsaktivität. Eine refraktäre Vaskulitis wird dadurch klassifiziert, dass nach dem Standardverfahren kein Ansprechen auf die Induktionstherapie in Form einer Remission erzielt werden konnte. Ein Rezidiv wird definiert als das Wiederauftreten neuer Krankheitsaktivität. Die Krankheitsaktivität wird mit dem *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS), entwickelt von (Luqmani et al., 1994), entsprechend des diagnostizierten Grades an Entzündung unabhängig einer Infektion der betroffenen Organe bewertet. Das C reaktive Protein der akuten Phase ist nicht spezifisch für die Erkrankung, stellt aber einen sensitiven Marker der Krankheitsaktivität dar. Der Organschaden in Form nicht-therapierbarer Narben, der in Folge der Vaskulitis und ihrer Therapie entstanden ist, wird mit dem *Vasculitis Damage Index* (VDI), entwickelt von (Exley et al., 1997), klassifiziert. Auf der internationalen Chapel Hill Consensus Konferenz 2012 wurden die Nomenklatur von Vaskulitiden entsprechend der Kombination an Eigenschaften, welche verschiedene Formen separieren und definieren kann, überarbeitet (Jennette et al., 2013).

Bei der GPA handelt es sich um eine nekrotisierende granulomatöse Entzündung, die normalerweise den oberen und unteren Respirationstrakt betrifft und eine nekrotisierende Vaskulitis, die hauptsächlich kleine und mittelgroße Gefäße betrifft. Gewöhnlich kommt es

zur nekrotisierenden Glomerulonephritis. Eine okuläre Vaskulitis und pulmonale Capillaritis mit Hämorrhagien sind häufig. Patienten ohne nachweisbare systemische Vaskulitis sollten besonders bei Anwesenheit eines ANCA als GPA klassifiziert werden, wenn identische pathologische Veränderungen im Respirationstrakt zu GPA-Patienten mit einer Respirationstrakt-Beteiligung vorliegen (Jennette et al., 2013).

Die Befundung entzündlicher Biopsien zeigt bei der GPA klassischerweise eine histopathologische Trias aus einer granulomatösen extravaskulären Entzündung mit landkartenartigen Nekrosen und einer teils nekrotisierenden Kleingefäßvaskulitis (Holl-Ulrich, 2009). Zudem können im inflammatorischen Infiltrat Zeichen einer ektopisch-lymphatischen Gewebsneubildung in Form dendritischer Zellen, Clustern aus B- und T-Zellen und hoch-endothelialer Venolen gefunden werden (Müller et al., 2013).

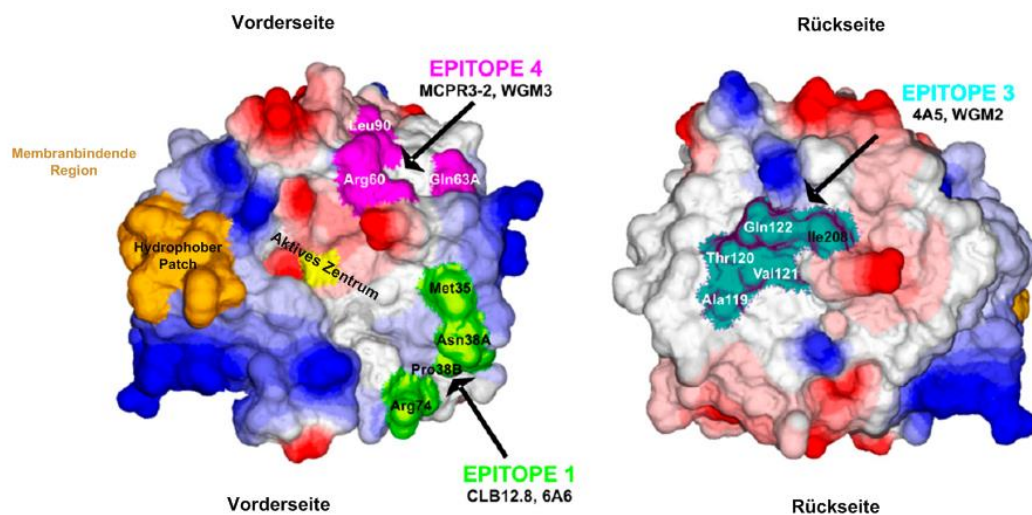
Aus epidemiologischer Sicht zählt die GPA zu den seltenen Krankheitsbildern. Betrachtet man eine Population aus einer Million Menschen, so liegt die jährliche Inzidenz bei 2-12 Neuerkrankungen und die Prävalenz bei 23-160 Erkrankten. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die GPA bei Männern und Frauen gleichermaßen gehäuft in der 5. Lebensdekade ausbricht und zu 93 – 98 % auf die Population hellhäutiger Caucasier und Hispanoamerikaner beschränkt ist (Pagnoux, 2016).

Zur spezifischen Labordiagnostik der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) dient die Messung des ANCA (antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper) mittels ELISA bzw. mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz von Ethanol-fixierten Granulozyten mit Patientenserum (Pagnoux, 2016). Derzeit wird die Verwendung hoch-entwickelter Immunotests für die Diagnose einer ANCA-assoziierten Vaskulitis wegen der besseren Sensitivität und Spezifität favorisiert (Bossuyt et al., 2017).

Als Therapie wird für die Remissionsinduktion bei frühsystemischen Formen der AAV Methotrexat empfohlen, bei schweren generalisierten Formen sollten stärkere Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid eingesetzt werden (Hellmich et al., 2007). Rituximab, ein chimärer, monoklonaler anti-CD20 Antikörper, ist ein neueres Medikament und wird nach Abwägung von Begleiterkrankungen, Schwangerschaftsplänen und Kosten bei schweren Formen der GPA eingesetzt oder bei refraktären Verläufen unter Cyclophosphamid-Therapie. In Kombination mit Immunsuppressiva werden immunmodulatorisch bzw. anti-entzündlich wirkende Glucocorticoide/Steroide wie Prednisolon oder antibiotisch wirkende Medikamente wie Cotrimoxazol bei der GPA eingesetzt (Pagnoux, 2016).

### 3.2.2 Struktur und Funktion von ANCA

Bei Caucasiern ist der PR3-ANCA hoch-spezifisch für die GPA, der MPO-ANCA hingegen wird in 60 – 70 % der MPA-Patienten nachgewiesen und in 10 – 50 % der EGPA-Patienten (Lamprecht et al., 2009). Bei einigen Patienten mit GPA findet sich ein MPO-ANCA und des gleichen lässt sich bei einigen Patienten mit MPA ein PR3-ANCA nachweisen (Csernok et al., 2006). Neben linearen Epitopen (Peen und Williams, 2000) erkennen PR3-ANCA vor allem konformationelle Epitope (Kuhl et al., 2010), da die Denaturierung der PR3 zur Reduzierung der Erkennung durch entsprechende Autoantikörper führt (Chang et al., 1995). Zudem wurden diskontinuierliche Oberflächenregionen auf der PR3 identifiziert (Abb 4), die nicht von linearen Peptiden nachgeahmt werden können, und als Epitope einiger bekannter monoklonaler PR3-Antikörper (Abb. 6) fungieren (Kuhl et al., 2010).



**Abbildung 4: Drei nicht-überlappende Epitope der humanen PR3 (1, 3, 4), die durch verschiedene monoklonale Antikörper markiert werden (Kuhl et al., 2010).**

Elektrostatistisches Potential der Oberfläche (rot = negativ, blau = positiv) in Bode's Standardorientierung generiert mit DeepView; Epitopnummerierung entspricht der Gruppierung von Antikörpern überlappender Spezifität (van der Geld et al., 1999; Kuhl et al., 2010).

Die Bindung spezifischer, monoklonaler Antikörper an PR3 kann auf elektrostatischen Kräften basieren, da PR3 stark positiv geladen ist und die CDR3 Region von monoklonalen anti-PR3 Ig negativ geladene Aminosäuren aufweist (Peen und Williams, 2000). In Seren von PR3-ANCA<sup>+</sup> Patienten wurde eine Korrelation zwischen der Erkennung der Pro-PR3 und der Krankheitsaktivität gefunden (Russell et al., 2001).

Funktionelle Aspekte von PR3-ANCA im Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität wurden an Ig aus Seren von 43 GPA Patienten in aktiver Form oder Remission analysiert, wobei die Aktivität der PR3 unter Anwesenheit von Substrat nach Präinkubation mit Ig aus GPA Patienten oder Gesunden gemessen wurde. Dabei konnte ein Dosis-abhängiger Effekt von PR3-ANCA positiven Ig auf die Inhibition der PR3-Aktivität beobachtet werden.

Interessanterweise war die Anzahl an PR3-ANCA Units für die halb-maximale Inhibition der PR3-Aktivität höher in aktiven Patienten und niedriger während einer Remission, wobei die benötigte Menge an Probanden-Ig für die halb-maximale Inhibition in aktiven Patienten niedriger war. Daher haben Patienten in Remission durchaus PR3-ANCA, die relativ gesehen eine stärkere Inhibition der PR3 verursachen bzw. einen relativ höheren Anteil an PR3-ANCA aufweisen, welche ein Enzym-inhibierendes Epitop erkennen. Im Umkehrschluß weisen aktive Patienten größere Mengen an PR3-ANCA auf, wovon die meisten nicht Enzym-inhibierenden Epitope erkennen müssten. Des Weiteren wurde untersucht inwiefern eine Präinkubation von Probanden Ig mit PR3 die Komplexierung mit ihrem natürlichen Inhibitor  $\alpha$ 1-Antitrypsin beeinflusst. IgG von GPA Patienten beeinflussten diese Komplexierung signifikant stärker als bei IgG von Gesunden, wobei die Anzahl an PR3-ANCA Units für eine halbmaximale Inhibition der Komplexierung zwischen aktiven Patienten und Patienten während einer Remissionsphase gleich war (van der Geld et al., 2002). Dies suggeriert die Reaktivität von PR3-ANCA mit Epitopen in der Nähe des aktiven Zentrums der PR3 (van der Geld et al., 2004). Dabei haben PR3-ANCA, die nur in der Nähe des aktiven Zentrums binden ohne die Aktivität zu inhibieren, ein sehr hohes pathogenes Potential, da sie nicht von dem natürlichen Inhibitor  $\alpha$ 1-Antitrypsin abgestriffen werden können (Kuhl et al., 2010). Die Klassifikation von Patienten nach ihrer ANCA-Spezifität könnte klinisch-nützliche Information schneller bereitstellen als klinische Untersuchungen allein und ist daher in neue Diagnostikkriterien eingearbeitet worden (Bossuyt et al., 2017; Cornec et al., 2016).

### **3.2.2.1 Proteinase 3 als Autoantigen bei der GPA**

Proteinase 3 (PR3) ist eine Serinprotease und wurde 1978 in der azurophilen Granula von humanen Neutrophilen entdeckt (Baggiolini et al., 1978). Des Weiteren findet sich die PR3 in der spezifischen Granula (den sekretorischen Vesikeln) und ist auf der Plasmamembran von Neutrophilen lokalisiert (Witko-Sarsat et al., 1999), wobei die schnelle Ausschüttung und Präsenz von PR3 ohne Inhibition der Proteaseaktivität gewebsschädigend ist (van der Geld et al., 2001). Die PR3 wird zunächst als inaktives Preproenzym exprimiert, wobei die N-terminale Abspaltung des Pro-Peptids (zweier Aminosäuren) den eigentlichen Konformationswechsel in die aktive Form bewirkt (Rao et al., 1996), die von PR3-ANCA erkannt wird (Specks et al., 1996). Die C-terminale Abspaltung eines Peptides von acht Aminosäuren hat wenig Einfluß auf die Konformation bzw. die Erkennung konformationeller Epitope der PR3 durch PR3-ANCA (Capizzi et al., 2003). Die PR3 kann in sekretorischer, zytosolischer oder Membran-gebundener Form vorkommen, siehe Abbildung 5 (Korkmaz et al., 2016).

### BOX 1 Pathogene Rolle von PR3

- Sezernierte PR3  
Partizipiert in der Gewebsdegeneration  
Fördert Entzündung
- Zytoplasmatische PR3  
Erhöht Apoptose in Neutrophilen  
Induziert Apoptose in Endothel-Zellen
- Membran-gebundene PR3  
Erhöht ANCA-induzierte proinflammatorische Antwort vorbereiteter Neutrophiler  
Erhöht proinflammatorische Antwort von apoptotischen Neutrophilen

Abbildung 5: Pathogene Rolle der PR3 (Korkmaz et al., 2016)

Neben der PR3 ist die MPO ein weiteres Autoantigen bei den ANCA assoziierten Vaskulitiden, deren Unterschiede zur PR3 im Hinblick auf die Erkennung durch Autoantikörper in Abbildung 6 zusammengefasst wird (Cornec et al., 2016).

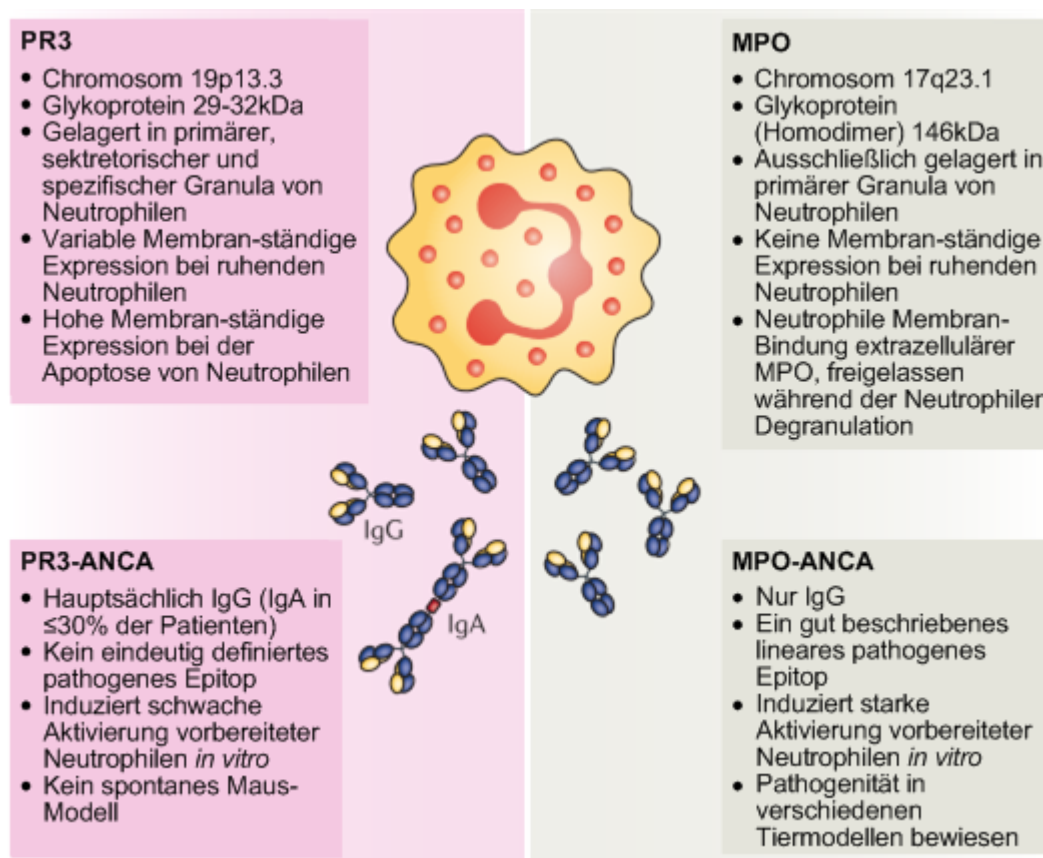


Abbildung 6: Unterschiede zwischen der PR3 und der MPO und den entsprechenden ANCA (Cornec et al., 2016)

Anti-Neutrophile-zytoplasmatische-Antikörper (ANCA) erkennen in ANCA-assozierten Vaskulitiden die zwei Haupt-Autoantigene Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO). Die PR3 ist ein sehr viel kleineres Glycoprotein als die MPO. Die PR3-Expression ist variabel auf der Zelloberfläche ruhender Neutrophiler und wird im Zuge der Apoptose von Neutrophilen auffallend erhöht, sodass die PR3 zugänglich für PR3-ANCA wird. Die MPO wird von Neutrophilen im Zuge der Degranulation freigesetzt, woraufhin die MPO an die Oberfläche benachbarter Neutrophiler bindet und zugänglich für MPO-ANCA wird.

### 3.2.2.2 Weitere Autoantikörper bei der GPA

In AAV wie GPA erkennen ANCA und andere Autoantikörper neben MPO- und PR3 weitere Antigene, siehe Tabelle 1 (Lamprecht et al., 2018).

**Tabelle 1: Zusammenfassung von Studien zur Assoziation von ANCA und anderen Autoantikörpern mit AAV wie GPA; bearbeitet aus (Lamprecht et al., 2018).**

ANCA Spezifitäten		gefunden bei:	Referenzen
<b>PR3, LAMP2, Pentraxin-3, Lactoferrin</b>			
IgG PR3-ANCA (IgG1, IgG3, IgG4)	lineare und konformationelle PR3 Epitope	GPA, gesunde Probanden	(Brouwer et al., 1991; Cui et al., 2010; Mulder et al., 1995; Prüßmann et al., 2014)
IgA PR3-ANCA	unbekannte(s) Epitop(e)	GPA, gesunder Proband	(Kelley et al., 2011)
IgM PR3-ANCA	unbekannte(s) Epitop(e)	GPA, MPA, gesunder Proband	(Finnern et al., 1995)
IgG komplementär zu PR3-ANCA	97mer des gegensätzlichen DNA Stranges der PR3 (Homologie zu mikrobiellen Peptiden)	PR3-ANCA Krankheit	(Bautz et al., 2008; Pendergraft et al., 2004; Tadema et al., 2011)
hLAMP2-ANCA	9mer Peptid, (100% homolog zu bakteriellem FimH)	AAV (enthält ANCA-negative AAV)	(Kain et al., 2012; Peschel et al., 2014; Roth et al., 2012)
Pentraxin-3-ANCA	unbekannte(s) Epitop(e)	MPA, GPA, EGPA, ANCA-negative AAV	(Simon et al., 2016)
<b>andere Autoantigene</b>			
anti-plasminogen IgG, anti-tissue plasminogen activator IgG	nicht komplett definiert, konformationelle Epitope sind wahrscheinlich	AAV	(Bautz et al., 2008; Berden et al., 2010)
anti-TMEM9b, anti-tetraspanin 7	unbekannte Epitope	GPA	(Turner et al., 2011)
anti-progranulin IgG	unbekannte(s) Epitop(e)	Autoimmunerkrankungen (enthält AAV)	(Turner et al., 2012)

### 3.2.3 B Zell Autoimmunantwort in der Pathogenese bei der GPA

Die Schlüsselrolle in ANCA assoziierten Vaskulitiden wie GPA wird aktuell den Gedächtnis B-Zellen zugesprochen (Schrezenmeier et al., 2018). In ANCA assoziierten Vaskulitiden wie GPA wurde eine verringerte Anzahl an Gedächtnis B-Zellen im Blut bei aktiven Patienten festgestellt (Lepse et al., 2014), möglicherweise in Folge ihrer Rekrutierung zum Ort der Entzündung oder ihrer Differenzierung in Plasmazellen (Schrezenmeier et al., 2018). In der Remission normalisiert sich der Anteil an Gedächtnis B-Zellen im Blut wieder (Lepse et al., 2014). Die Wirksamkeit von Rituximab als depletierendes Agens von CD20<sup>+</sup> B-Zellen unterstützt die Rolle einer fehlregulierten Homöostase von B-Zellen in ANCA assoziierten Vaskulitiden. Der Mechanismus der Differenzierung zu autoreaktiven B-Zellen ist immer noch ungeklärt (Dumoitier et al., 2015). Bereits bekannt ist, dass bei ANCA<sup>+</sup> Patienten mit GPA im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Anzahl zirkulierender IL-21 produzierender T-Helfer-Zellen vorliegt (Abdulahad et al., 2013). Dies ist von Bedeutung, da *in-vitro* IL-21 und BAFF die PR3-ANCA Produktion von PBMC induziert. Eine Stimulation mit exogenen Faktoren (CpG Oligonukleotide) erhöhte die Anzahl von zirkulierenden IL-21R<sup>+</sup> Gedächtnis B-zellen bei der GPA im Vergleich zu Gesunden, was mutmaßlich zur PR3-ANCA Produktion beiträgt (Lepse et al., 2016). ANCA sind wahrscheinlich ursächlich an der Pathogenese von Vaskulitiden beteiligt. Die ANCA induzierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten leitet u. a. die Aktivierung des alternativen Komplementweges ein, welche wiederum neutrophile Granulozyten zur Gefäßwand lockt. Dort werden sie erneut durch ANCA aktiviert, schließen einen pathophysiologischen Kreislauf und verursachen apoptotisch-nekrotische Prozesse über die Ausschüttung oxidativer Sauerstoffspezies, Granula und/oder extrazellulärer Netze (Jennette et al., 2014). Bei der GPA wurden B-Zell-reiche, Follikel-ähnliche Bereiche in Nachbarschaft zu PR3-exprimierenden Zellen und Plasmazellen dargestellt, die eine Anwesenheit autoreaktiver, PR3-ANCA produzierender B-Zellen in der granulomatösen Entzündung suggerieren (Voswinkel et al., 2006; Zhao et al., 2012). Ektopisch lymphatische Strukturen wurden in der granulomatösen Entzündung nasaler Schleimhautbiopsien nachgewiesen. Die Neubildung follikulärer Strukturen der lymphozytären Aggregate wurde durch Netzwerke CD21<sup>+</sup> follikulär-dendritischer Zellen und PNA<sup>+</sup> exprimierender hoch-endothelialer Venolen charakterisiert. Zusammen mit der dort nachgewiesenen Expression des Überlebensfaktors APRIL, der über die Rezeptoren TACI und BCMA mit Plasmazellen interagiert, scheint ein Überleben von Plasmazellen denkbar zu sein (Müller et al., 2014). Genetische Prädispositionen, Umweltfaktoren und die immunsuppressive Behandlung beeinflussen wahrscheinlich die Entwicklung und den Erhalt ektopisch lymphatischer Strukturen in entzündlichen Regionen, da die Prävalenz solcher Strukturen bei chronisch-rheumatischen Autoimmunerkrankungen sehr variabel ist. Die meisten ektopisch

lymphatischen Strukturen zeigen Funktionen von Keimzentren wie der Expression von AID, Affinitätsreifung und klonaler Selektion. Die Antigen-gesteuerte Autoimmun-Antwort in ektopisch lymphatischen Strukturen scheint jedoch krankheitsspezifisch zu sein (Bombardieri et al., 2017). Ferraro und Mitarbeiter beschreiben in einer Fallstudie die mutmaßliche Korrelation von Rezidiven und infiltrierenden B-Zellen in der granulomatösen Entzündung bei einer refraktären GPA unter Rituximab Therapie (Ferraro et al., 2008). In ANCA-assoziierten Vaskulitiden wurden PR3-ANCA des IgM Isotyps nachgewiesen und mit einer höheren Krankheitsaktivität assoziiert, was im Zusammenhang mit einem mikrobiellen Trigger diskutiert wird (Clain et al., 2017). Natürliche Autoantikörper gegen PR3 und MPO wurden in Antigen-aufgereinigten IgGs von gesunden Probanden detektiert, jedoch in signifikant geringerer Konzentration als bei AAV-Patienten. Eine Regulation natürlicher anti-PR3-Antikörper über anti-idiotypische Antikörper wird diskutiert, wobei die Zerstörung dieses Gleichgewichtes in Folge einer Infektion oder einer unkontrollierten Entzündung zu einer ANCA assoziierten Vaskulitis führen kann. MPO und PR3 werden von nekrotischen oder aktivierten Neutrophilen freigesetzt und sind im Blut nachweisbar (Cui et al., 2010). Zirkuläre PR3-spezifische B-Zellen in AAV sind hauptsächlich Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten (Cornec et al., 2017). Ein mögliches Szenario für eine ANCA-abhängige Pathogenese könnte von natürlichen Autoantikörpern ausgehen, die PR3, MPO oder andere Antigene erkennen, die in einer entzündlichen Mikroumgebung selektioniert werden und mit der Hilfe Autoantigen-spezifischer T-Zellen reifen (Lamprecht et al., 2018).

### 3.3 Fragestellung

PR3-ANCA sind wahrscheinlich eine pathogenetische Ursache bei AAV, zu denen die GPA gehört (Jennette et al., 2014). Der Nachweis von PR3-ANCA ist diagnostisch für die GPA (Bossuyt et al., 2017; Csernok und Moosig, 2014). Die Entwicklung von pathogenetisch relevanten PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zellen ist jedoch unverstanden. In Analogie zu anderen Autoimmunerkrankungen wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass entzündliche Gewebe bei der GPA zur Entstehung von pathogenetisch relevanten PR3-ANCA oder anderen Autoantikörpern beitragen. In der Tat wurden im entzündlichen Gewebe bei der GPA B-Zell-reiche, Follikel-ähnliche Bereiche in Nachbarschaft zu PR3-exprimierenden Zellen und Plasmazellen gefunden, die eine Anwesenheit PR3-ANCA produzierender B-Zellen in der granulomatösen Entzündung suggerieren (Voswinkel et al., 2006). Im Hinblick auf die Suche nach PR3-ANCA<sup>+</sup> Zellen im Gewebe bei der GPA beschäftigt sich diese Arbeit mit der rekombinanten Klonierung, Expression und Charakterisierung von IgG aus gewebständigen Plasmazellen. Zudem fokussiert sich die Arbeit im Rahmen einer Meta-Analyse auf vergleichende Studien von IgLV und IgHV-Genen zwischen entzündetem Gewebe bei der GPA (Sanger-Sequenzierung) und Blut von gesunden Kontrollen (NGS). Zusätzlich sollen monoklonale anti-PR3 Ig genetisch charakterisiert werden und eine weitere Vergleichsgruppe bilden. Aufgrund des vermuteten seltenen Vorkommens von PR3-ANCA<sup>+</sup> Plasmazellen, soll des Weiteren ein Hochdurchsatzverfahren etabliert werden, mit dem IgLV-Repertoires in korrespondierenden Gewebs- und Blutproben bei der GPA erstellt und analysiert werden können.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Erkennen humane rIgG (n=6) aus gewebständigen B- und Plasmazellen bei der GPA spezifische Autoantigene, darunter möglicherweise PR3?
2. Zeigen Immunglobulingene aus der granulomatösen Entzündung bei der GPA Anzeichen für Affinitätsreifung und Selektion? Unterscheiden sie sich von Immunglobulingenen aus dem peripheren Blut Gesunder?
3. Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten gibt es zwischen anti-hPR3 Antikörpern und Immunglobulingenen aus der granulomatösen Entzündung?
4. Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten gibt es im IgLV-Genrepertoire (anhand "next generation sequencing") zwischen entzündlichem Gewebe und korrespondierenden Blutproben bei der GPA?
5. Werden in der granulomatösen Entzündung bei der GPA Differenzierungsfaktoren für B-Zellen exprimiert, die zur Reifung von Plasmazellen beitragen?

## 4 Materialien

### 4.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer MINI SUB CELL GT	Bio Rad, München
Agarosegelkämme (8er, 2er, 15er)	Bio Rad, München
Agarosegelkammer zum Gießen	Bio Rad, München
Agarosegelschlitten	Bio Rad, München
Axiovert 200M PALM Micro Beam System	Zeiss, Göttingen
Bakterienzentrifuge (Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck)	Beckman Coulter, Krefeld
Heraeus Brutschrank zur Bakterienanzucht	Thermo Scientific, Schwerte
Bunsenbrenner GASI	Schütt Labortechnik, Göttingen
Cycler ABI 7900	Applied Biosystems, Foster City CA
Webeco Dampfsterilisator	Matachana, Selmsdorf
Elektrophorese Netzgerät Power Pack P25 Biometra	Analytik Jena, Jena
Erlenmeyerkolben	Duran Group, Mainz
EVOS FL	Thermo Scientific, Schwerte
Färbekammer	neoLab Migge, Heidelberg
Färbeküvette	Roth, Karlsruhe
Feinwaage Adventurer	OHAUS, Greifensee CHE
Gel Doc EZ Imager	Bio Rad, München
Glasröhrchen	Duran Group, Mainz
Große und kleine Zentrifugenbecher (Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck)	Beckman Coulter, Krefeld
iMark Microplate Reader	Bio Rad, München
Kryotom Jung Frigocut 2800E	Leica, Wetzlar
Laborglasflaschen	Duran Group, Mainz
Lichtmikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Magnetrührer RSM-10HS	Phoenix Instrument, Garbsen
Messzylinder	Duran Group, Mainz
Mikropipette Reference 0,5-10 µl	eppendorf, Hamburg
Mikropipette Research 10-100 µl & 100-1000 µl & 20-200 µl	eppendorf, Hamburg
MiSeq (Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck)	Illumina, München
Multipipette XSTREAM	eppendorf, Hamburg
Nano Drop (Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck)	Thermo Scientific, Schwerte
PCR Arbeitshaube Clene Cab	HeroLab, Wiesloch
PCR Arbeitskabinett Holten LaminAir	Fisher Scientific, Schwerte
pH Meter inoLab	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Real Time System CFX Connect	Bio Rad, München
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen
Vacuum Centrifuge Concentrator 5301 (Rotor: F-45-48-11) (Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator 3031	GFL, Burgwedel
Sicherheitsbrenner GASI	Schütt, Göttingen
Sicherheitswerkbank SAFE 2020	Thermo Scientific, Schwerte
StepOne RealTime PCR System (Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck)	Fisher Scientific, Schwerte
Thermocycler T1 Biometra	Analytik Jena, Jena
Thermocycler T3 Biometra	Analytik Jena, Jena
Thermomixer 5436	eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge MC6	Sarstedt, Nümbrecht
TRIO Thermoblock with Heated Lid Biometra	Analytik Jena, Jena
UV sample tray	Bio Rad, München
UV-Tisch TI3 Biometra	Analytik Jena, Jena
Vakuum-Exsikkator mit Planflansch DN100	Duran Group, Mainz
Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Waage EMB 600-2	KERN, Balingen

Bezeichnung	Hersteller
Waage L610D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wipp-Schüttler RS-RS 5	Phoenix Instrument, Garbsen
Zentrifuge Allegra X-12R	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Micro V	Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

#### 4.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1,6 ml Kryokonservierungsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
1.0 mm PEN-Membran Objektträger	Zeiss, Göttingen
96 multiply PCR plates natur	Sarstedt, Nümbrecht
96 well Plattendeckel	Th. Geyer, Renningen
Alu Klebefolie durchsichtig	Sarstedt, Nümbrecht
Aufsätze Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Ausstreichösen für Bakterien	VWR, Darmstadt
Biosphere 8er Ketten 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips 0,1-20 µl & 2-100 µl & 2-200 µl & 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere Reaktionsgefäße 1,5 ml & 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Feather scalpel	VWR, Darmstadt
Handschuhe, puderfrei & aus Nitril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Hard Shell PCR plates	Bio Rad, München
Eclipse Needle 0,9 mm	BD, Heidelberg
Katapult Micro Tube 500	Zeiss, Göttingen
Membranfilter 0,22 µm	Millipore, Darmstadt
Micro seal B	Bio Rad, München
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 50 ml, 15 ml, 1,5 ml & 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Stabpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt Nümbrecht
Zellkulturflaschen (T25 & T75)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

#### 4.3 Verbrauchsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
10 kbp-DNA-Marker	Bio Basics, Markham ON, CA
10x CutSmart Buffer	New England Biolabs, Frankfurt
10x Expand High Fidelity PCR Puffer w/o Mg	Roche, Mannheim
10x NEBuffer 2.1	New England Biolabs, Frankfurt
10x NEBuffer 3.1	New England Biolabs, Frankfurt
10x PCR Rxn Puffer	Life Technologies, Darmstadt
10x Target Retrieval Solution pH 9	Dako, Glostrup DK
12 % Natriumhypochlorit	Roth, Karlsruhe
25 mM MgCl <sub>2</sub>	Roche, Mannheim
2X Quick Ligation Buffer	New England Biolabs, Frankfurt
3-Amino-9-ethylcarbazol (Tabletten A6926)	Sigma, Steinheim
50 mM MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies, Darmstadt
absolutes Aceton	Merck, Darmstadt
Afl II (10 units/µl) Timer-Saver qualified	New England Biolabs, Frankfurt
Allprotect Tissue Medium	Qiagen, Hilden
Agar Bacteriology Grade	AppliChem, Darmstadt
Agarose Wide Range	Serva, Heidelberg
Ampicillin Natriumsalz BioChemica	AppliChem, Darmstadt
Ampli Taq DNA Polymerase	Perkin Elmer, Vaterstetten
Anti-PR3-hn-hr-ELISA	Euroimmun, Lübeck

Bezeichnung	Hersteller
Avr II (10 units/ $\mu$ l) Timer-Saver qualified	New England Biolabs, Frankfurt
baculovirale DNA	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
Biocoll	Biochrom, Berlin
Biophor Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
BioScience-Grade & Nuklease-freies Wasser (DEPC behandelt & autoklaviert)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Bsi W I (10 units/ $\mu$ l) Timer-Saver qualified	New England Biolabs, Frankfurt
Bss H II (10 units/ $\mu$ l) Timer-Saver qualified	New England Biolabs, Frankfurt
Chloroform/Isoamylalkohol	Thermo Scientific, Schwerte
dNTP Mix	Life Technologies, Darmstadt
DOTAP	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
Dulbecco PBS w/o $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ & low endotoxin	Biochrom, Berlin
EDTA	Sigma, Steinheim
EHIGG1	Thermo Scientific, Schwerte
Endotoxinfreie, sterile 0,9 % iges NaCl	Berlin Chemie, Berlin
Eselserum	Dianova, Hamburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Expand High Fidelity Taq Polymerase 3,5 U/ $\mu$ l	Roche, Mannheim
Fetales Kälberserum (selbst hitzeinaktiviert 30 min 56 °C)	Pan Biotech, Aidenbach
GelRed 10000x	Biotium, Fremont CA
Glycerol	MP Biomedicals, Eschwege
Hämalaun nach Mayer, unverdünnt & filtriert	Waldeck, Münster
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Image-iT FX Signal Enhancer	Thermo Scientific, Schwerte
Immersionsöl Mikroskopie	Carl Roth, Karlsruhe
iScript cDNA synthesis kit	Bio Rad, München
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
Maus-/Kaninchen-/Ratten-Polymer, Peroxidase konjugiert	Zytomed Systems, Bargteheide
Max Block Autofluorescence Reducing Reagent Kit	Dianova, Hamburg
Mineralöl for molecular biology	Sigma, Steinheim
MiSeq Reagent Kit V2 für 500 Zyklen in einer Standardflußzelle	Illumina, München
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
N,N-Dimethylformamide	Merck, Darmstadt
NaCl	Baker, Deventer NL
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, Steinheim
Neubauerzählkammer (0,0025mm <sup>2</sup> /0,1mm)	Zeiss, Jena
Neutralrot	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
Nhe I (10 units/ $\mu$ l) Timer-Saver qualified	New England Biolabs, Frankfurt
Nucleo Spin RNA Blood Midi Kit	Macherey & Nagel, Düren
Nucleo Spin RNA Kit	Macherey & Nagel, Düren
One Shot Top 10 chemically competent <i>E. coli</i>	Thermo Scientific, Schwerte
Paraformaldehyd	Thermo Scientific, Schwerte
Penicillin & Steptomycin	Pan Biotech, Aidenbach
PerfeCTa NGS Quantification Kit (Illumina ROX)	Quanta Biosciences, Beverly MA
Phenol	Thermo Scientific, Schwerte
PhiX Control V3	Illumina, München
Polyvinylalkohol	Merck, Darmstadt
PR3-ANCA ELISA	Orgentec, Mainz
Primer	MWG/eurofins, Ebersberg

Bezeichnung	Hersteller
Pro Long Gold Antifade Reagent	Thermo Scientific, Schwerte
Proteinase K	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
Proteinblock	Dako, Glostrup DK
QIA prep Spin Miniprep kit	Qiagen, Hilden
QIA quick Gel extraktion kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Quick T4 DNA Ligase (2*106 units/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
Quick-Load 100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt
RNase AWAY Molecular BioProducts	Thermo Scientific, Schwerte
RPMI	Pan Biotech, Aidenbach
Sarkosyl	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
SsoAdvanced SYBR Green Supermix (2x)	Bio Rad, München
Sf9 Insektenzell-Linie	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
steriles & endotoxinfreies Wasser Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Sucrose	Merck, Darmstadt
Superscript IV VIL0 Mastermix	Thermo Scientific, Schwerte
Taq DNA Polymerase, recombinant 5U/�l	Life Technologies, Darmstadt
TEK Puffer	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
TGV1 & TGV3 Zellkulturmedium	Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie
Tris - EDTA	Thermo Scientific, Schwerte
Tissue Freezing Medium	Jung, Nussloch
TOPO-TA cloning kit for sequencing	Thermo Scientific, Schwerte
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-Cl	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween20	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ultra Low Range DNA Ladder 10 to 300 bp	Thermo Scientific, Schwerte
Universale, humane RNA	Takara Bio Europe SAS, F
Vent DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylene	Thermo Scientific, Schwerte
�-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

#### 4.4 Software

Bezeichnung	Hersteller
ANARCI <sup>1</sup>	(Dunbar und Deane, 2016)
Baseline Algorithmus V1.3 <sup>2</sup>	(Yaari et al., 2012, 2013)
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio Rad, München
FASTX Barcode Splitter	HannonLab, Howard Hughes Medical Institute, USA
GraphPadPrism Version 4.0 und 6.0	GraphPad Software, La Jolla, CA

<sup>1</sup> Oxford Protein Informatics Group (ohne Jahr)  
Antibody Numbering - ANARCI  
<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/ANARCI.php>  
(Stand: 12.06.2018)

<sup>2</sup> Mohamed Uduman; Gur Yaari; Uri Hershberg; Mark J. Shlomchik; Steven H. Kleinstein (2014)  
Bayesian Estimation of Antigen-Driven Selection in Immunoglobulin Sequences  
<http://selection.med.yale.edu/baseline/>  
(Stand: 12.06.2018)

Bezeichnung	Hersteller
Image Lab	Bio Rad, München
IMGThighV-QUEST V.3.4 <sup>3</sup>	(Alamyar et al., 2012; Giudicelli et al., 2015)
IMGTV-QUEST V3.4 <sup>4</sup>	(Brochet et al., 2008)
KIEL	Markus Schilhabel, Institut für klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
NCBI <sup>5</sup>	National Center for Biotechnological Information, Bethesda MD, USA
NEBaseChanger V1.2.7 <sup>6</sup>	New England Biolabs, Frankfurt
Palm Robo V3.2	Zeiss, Göttingen
Pearsons X <sup>2</sup> Test <sup>7</sup>	Bernard Rosner, Fundamentals of Biostatistics, 6th Ed., 2006
pRESTO Version 0.5.4	(Vander Heiden et al., 2014)
Primer3 web Version 4.1.0 <sup>8</sup>	(Untergasser et al., 2012)
R-Paket BCellMA Version 0.3.4 R Cran	(Ohlei, 2016)
R-Paket bcREP R Cran	(Bischof und Ibrahim, 2016)
R-Paket movMF R Cran Version 0.2.2	(Banerjee et al., 2005)
R-Paket perm Version 1.0 – 0.0	(Fay und Shaw, 2010)
R-Paket shazam R Cran Version 0.1.6	(Gupta et al., 2015)
R-Paket VEGAN (ADONIS) R Cran Version 2.4-6	(Anderson, 2001)
SDS V2.4.1	Applied Biosystems, Foster City CA
Software MSC V 2.6.2.1	Illumina, München
StepOne Software Version 2.3	Fisher Scientific, Schwerte

#### 4.5 Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Einsatz
VH1	CAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA	semi-nested Einzelzell PCR 1. Runde (Voswinkel et al., 2008a)
VH2	GTCCTRCGCTGGTGAAACCCACACA	
VH3	GGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAG	
VH4	GACCCTGTCCCTCACCTGCRCTGTC	
VH5	AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGARGA	

<sup>3</sup> IMGThighV-QUEST, the international ImMunoGeneTics information system®, Marie-Paule Lefranc (2018)

IMGThighV-QUEST

<https://www.imgt.org/HighV-QUEST/login.action>

(Stand: 12.06.2018)

<sup>4</sup> IMGTV-QUEST, the international ImMunoGeneTics information system®, Marie-Paule Lefranc (2018)

IMGTV-QUEST Search Page

<https://www.imgt.org/IMGTV-quest/vquest>

(Stand: 12.06.2018)

<sup>5</sup> National Center for Biotechnological Information (ohne Jahr)

National Center for Biotechnology Information

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

(Stand: 12.06.2018)

<sup>6</sup> New England Biolabs (2017)

NEBaseChanger

<http://nebasechanger.neb.com/>

(Stand: 12.06.2018)

<sup>7</sup> Interactive Statistical Pages project (ohne Jahr)

JavaStat -- 2-way Contingency Table Analysis

<http://statpages.info/ctab2x2.html>

(Stand: 12.06.2018)

<sup>8</sup> Whitehead Institute for Biomedical Research, Steve Rozen, Andreas Untergasser, Mairo Remm, Triinu

Koressaar and Helen Skaletsky (ohne Jahr)

primer3web suite

[Bioinfo.ut.ee/primer3/](http://Bioinfo.ut.ee/primer3/)

(Stand: 12.06.2018)

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Einsatz
VH6	ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG	
JH_Intron1	GACTCACCTGAGGAGACGGTGACC	
JH_Intron2	TCTTACCTGAGGAGACGGTGACCR	
Vkappa1	GACATCCRGWTGACCCAGTCTCCWTC	
Vkappa2	CAGWCTCCACTCTCCCTGYCCGTCA	
Vkappa3	TTGTGWTGACRCAGTCTCCAGSCACC	
Vkappa4	AGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC	
Vkappa5	CAGTCTCCAGCATTATGTCAGCGA	
Vkappa6	TTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAA	
3' _Jkappa1.2.4	ACTCAGGTTTGATYTCCASCTTGGTCC	
3' _Jkappa3	GTACTIONAGTTTTGATATCCACTTTGGTCC	
3' _Jkappa5	GCTTACGTTTTAATCTCCAGTCGTGTCC	
Vlambda1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTG	
Vlambda2	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCT	
Vlambda3a	CTCAGCCACCCTCAGTGTCCGT	
Vlambda3b	CTCAGCCACCCTCGGTGTCTCAGT	
Vlambda4	TTTCTTCTGAGCTGACTCAGGAC	
Vlambda6	GAGTCTCCGGGGAAGACGGTA	
Vlambda7	GTGGTGACTCAGGAGCCCTCAC	
Vlambda8	ACTGTGGTGACCCAGGAGCCA	
Vlambda9	GCTGACTCAGCCACCTTCTGCA	
3' _Jlambda1	GCCACTTACCTAGGACGGTGAC	
3' _Jlambda2.3	GAAGAGACTCACCTAGGACGGTC	
3' _Jlambda6.7	GGAGACTYACCGAGGACGGTC	
JH1	GACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGTGC	semi-nested Einzelzell PCR 2. Runde reverse Primer für VH Einzelansätze (Voswinkel et al., 2008a)
JH2	GACCAGGGTGCCACGGCCCCAGAGA	
JH3	CATTGTCCCTTGCCCCAGACATCA	
JH4	GACCACGGTTCCTTGCCCCAGTAG	
JH5	GTGACCAGGGTTCCTTGCCCCAGG	
JH6	CGTGGTCCCTTGCCCCAGACGTCC	
5' _Jkappa1.2	TTGATYTCCASCTTGGTCCCCTGGC	semi-nested Einzelzell PCR 2. Runde reverse Primer für Vkappa Einzelansätze (Voswinkel et al., 2008a)
5' _Jkappa3	TTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC	
5' _Jkappa4	TTGATCTCCACCTTGGTCCCCTCCGC	
5' _Jkappa5	TTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGC	
5' _Jlambda1	GGACGGTGACCTTGGTCCCAGT	semi-nested Einzelzell PCR 2. Runde reverse Primer für Vlambda Einzelansätze (Voswinkel et al., 2008a)
5' _Jlambda2.3.7	GACGGTCAGCTTGGTSCCTCC	
5' _Jlambda6	GACGGTCACCTTGGTGCCACT	

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Einsatz
MSCVK1	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATCCAGCTGACTCAGCC	Murine IgVκ Multiplex-PCR (Barbas et al., 2001)
MSCVK2	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTTCTCWCCCAGTC	
MSCVK3	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGMTMACTCAGTC	
MSCVK4	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGYTRACACAGTC	
MSCVK5	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTRATGACMCAGTC	
MSCVK6	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTMAGATRAMCCAGTC	
MSCVK7	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTCAGATGAYDCAGTC	
MSCVK8	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATYCAGATGACACAGAC	
MSCVK9	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTTCTCAWCCAGTC	
MSCVK10	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGWGCTSACCCAATC	
MSCVK11	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTSTRATGACCCARTC	
MSCVK12	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYRTTKTGATGACCCARAC	
MSCVK13	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATGACBCAGKC	
MSCVK14	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATAACYCAGGA	
MSCVK15	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATGACCCAGWT	
MSCVK16	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAACC	
MSCVK17	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTTTGCTGACTCAGTC	
MSCJK12B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTKATTTCCAGYTTGGTCCC	
MSCJK4B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTTATTTCCAACCTTTGTCCC	
MSCJK5B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC	

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Einsatz
MSCVH1	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTRMAGCTTCAGGAGTC	Murine IgVH Multiplex- PCR (Barbas et al., 2001)
MSCVH2	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTBCAGCTBCAGCAGTC	
MSCVH3	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAGCTGAAGSASTC	
MSCVH4	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCARCTGCAACARTC	
MSCVH5	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTTCAGCTBCAGCARTC	
MSCVH6	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTTCARCTGCAGCAGTC	
MSCVH7	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCACGTGAAGCAGTC	
MSCVH8	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAASSTGGTGAATC	
MSCVH9	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAWGYTGGTGGAGTC	
MSCVH10	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAGSKGGTGGAGTC	
MSCVH11	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAMCTGGTGGAGTC	
MSCVH12	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGCTGATGGARTC	
MSCVH13	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCARCTTGTTGAGTC	
MSCVH14	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTAAAGCTTCTCGAGTC	
MSCVH15	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAARSTTGAGGAGTC	
MSCVH16	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTACTCTRAAAGWGTSTG	
MSCVH17	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCAACVACGCARCC	
MSCVH18	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAACTTGAAGTGTCT	
MSCVH19	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGTTCATCGAGTC	
MSCG1ab-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACAGATGGGGSTGTYGTTTTGGC	
MSCG3-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACAGATGGGGCTGTTGTTGT	
MSCM-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACATTTGGGAAGGACTGACTCTC	

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Einsatz	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung	
pVTC gp37	ATGGAGTTCGGCCTGAG	Sequenzierung (Labor bei Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie)	
pVTCk	TGCTGCTGCTCTGGCTC		
pVTCλ	AACTCCTGGGCCTGCTG		
H1 H3 fw	GCTAGCACCAAGGGC	Deletions-PCR	
H2 H4 H5 H6 fw	GCTAGCACCAAGGGCCCA	Deletions-PCR	
H1 H3 rew	TGAGGAGACGGTGACC	Deletions-PCR	
H2 rew	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCC	Deletions-PCR	
H4 H5 rew	TGAGGAGACGGTGACCACG	Deletions-PCR	
H6 rew	TGAGGAGACGGTGACCAGG	Deletions-PCR	
L1 L2 L3 L5 L6 fw	CGTACGGTGGCTGCACCA	Deletions-PCR	
L4 fw	CCTAGGACAACCTAAGGCTG	Deletions-PCR	
L1 L6 rew	TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTC	Deletions-PCR	
L2 rew	TTTGATTTCCACCTTGGTCCCC	Deletions-PCR	
L3 L5 rew	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTG	Deletions-PCR	
L4 rew	ACGGTCAGCTTGGTCCCT	Deletions-PCR	
H3rep2 fw	CTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGG	Substitutions-PCR	
H3rep2 rew	CTGCACCTGACACTGGACACCC	Substitutions-PCR	
18SrRNA fw	GTAACCCGTTGAACCCATT	qPCR	Effizienz: 98 %
18SrRNA rew	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	qPCR	
GAPDH fw	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	qPCR	Effizienz: 98 %
GAPDH rew	GGAAGATGGTGATGGGATTT	qPCR	
IL-21 fw	TTCTGCTTTCAGAAGGCC	qPCR	Effizienz: 87 %
IL-21 rew	ATGAAGGGCATGTTAGTCTGTGT	qPCR	
IL-21R fw	ACCCAGTCAGAGGAGTTAAAGG	qPCR	Effizienz: 81 %
IL-21R rew	TTTCTGAAGTCTCCGCTGC	qPCR	
IL-17A	Prime PCR Assay (Bio Rad, München)	qPCR	Effizienz: 100 %
Blimp1 fw	TTCACCACTTCATTGACGGC	qPCR	Effizienz: 114 %
Blimp1 rew	TGCTCTGTGTTTGTGTGAGATT	qPCR	
Seq. fw	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC T	NGS/qPCR (iRepertoire)	
Seq. rew	CGGTCTCGGCATTCCCTGCTGAACCGCTCTTCC GATCT	NGS/qPCR (iRepertoire)	
Adaptor A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCT TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	NGS (iRepertoire)	

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Einsatz
Adaptor B	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTC GGCATTCTGCTGAACCGCTCTCCGATCT	NGS (iRepertoire)
HBKLI-M		NGS (iRepertoire)

#### 4.6 Antikörper

Antigen/Spezifität	Klonalität	Wirt	Hersteller
ahumanes Syndecan-1, CD138	M 7228 CloneMI15	Mus musculus	Dako, Glostrup DK
ahumanerPR3-ANCA	12.8	Homo sapiens	Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam NL
F(ab') <sub>2</sub> α-Ziege IgG (H+L) – Alexa Fluor 594		Esel	Dianova, Hamburg
F(ab') <sub>2</sub> α-Kaninchen IgG (H+L) – Alexa Fluor 488		Esel	Dianova, Hamburg
ahumaner IL-21R	polyklonal	Ziege	AbD Serotec (Bio Rad), München
ahumanes IL-21	polyklonal	Kaninchen	Dianova, Hamburg
Normal IgG		Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
IgG Isotypenkontrolle		Ziege	GeneTex (Biozol), Eching

#### 4.7 Angesetzte Reagenzien und Puffer

- 1xTBS Puffer:
  - o 10x PBS pH 7,4 – 7,6:  
12,1 g TRIS und 87,8 g NaCl in 1 Liter Aqua dest. lösen und den pH-Wert mit HCl einstellen
  - 10x PBS mit Aqua dest. 1:10 verdünnen und mit einem Membranfilter der Größe 0,22 µm filtrieren.
  
- AEC-Substrat:
  - o 3-Amino-9-ethylcarbazol wurde per Tablette in 2,5 ml N,N-Dimethylformamide gelöst und in 250 µl Aliquots bei -80°C gelagert
  - o 50 mmol/l Acetatpuffer pH 5,0:  
74 ml 0,2 mol/l Essigsäure  
176 ml 0,2 mol/l Natriumacetat  
750 ml Aqua dest

Vor Gebrauch 2,5 µl 30 %igen Wasserstoffperoxid und 250 µl AEC in DMF mit 4,75 ml Acetatpuffer mischen und mit einem Membranfilter der Größe 0,22 µm filtrieren.
  
- 1x TBE Puffer:
  - o Herstellung 0,5 M EDTA Stocklösung (pH8,0):  
73,05 g EDTA wurden unter Zufügen von NaOH in 500 ml Aqua dest. gelöst
  - o Herstellung 5x Tris-Borat-EDTA PufferstammLösung:
    - 54 g TRIS und 27,5 g Borsäure wurden in etwa 900 ml Aqua dest. unter Hilfe des Magnetrührers gelöst
    - 20 ml 0,5 M EDTA Stocklösung (pH8,0) einrühren
    - auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
  - o vor Gebrauch 5x TBE-Puffer mit Aqua dest. auf 1x verdünnen

- 6x Nukleinsäure Ladepuffer
  - o 0,25 % Bromphenolblau und 40 % Sucrose in H<sub>2</sub>O lösen
  
- Luria-Bertani(LB)-Flüssigmedium und –Agarplatten
  - o Für 1 Liter LB-Medium wurden 10 g Typton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 950 ml Aqua dest. gelöst
  - o Der pH – Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt
    - Für LB-Agarplatten wurde 15g/l Agar dazugegeben
  - o Es wurde für 20 min bei 121 °C und 1 bar im Flüssigprogramm autoklaviert
  - o Nachdem der LB auf etwa 55 °C abgekühlt war, wurde das Antibiotikum (Endkonzentration: 50 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin) dazugegeben
    - Gießen der LB-Agarplatten in Petrischalen
  - o Lagerung: 4°C im Dunkeln für 5 Wochen
  
- 1%iger Polyvinylalkohol in 0,9 % NaCl:
  - o 1 g Polyvinylalkohol in autoklavierte Glasflasche füllen und mit 100 ml 0,9%igem, endotoxinfreiem NaCl unter sterilen Bedingungen auffüllen
  - o Unter Erhitzung auf bis zu 90 °C lösen
  - o Lagerung bei 4 °C

#### 4.8 Patienteninformation

Diese Arbeit analysiert im Wesentlichen entzündliche Gewebssproben bei der GPA, sodass es sich nur dann um keine Gewebssproben handelt, wenn ausdrücklich von einer anderen Probenquelle gesprochen wird. Die Gewebsspenden für die Forschung wurden in der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde bzw. der Klinik für Nephrologie der Universität zu Lübeck entnommen. Die histologische Diagnose wurde von Dr. Konstanze Holl-Ulrich aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck gesichert. Die Gewebsspenden unterliegen einem Ethikantrag (Az 07-058). In der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Universität zu Lübeck wurden die unten aufgeführte Diagnosen gesichert und die Blutspenden für die Forschung entnommen, welche einem Ethikantrag (Az 16-199) unterliegen.

Analyse	Probe	Diagnose	♀/♂	Alter	BVAS	VDI	PR3-ANCA (>10U/l)	CRP (mg/l)	Therapie
rlgG	rlgG1	GPA (aktiv)	w	73	n.d.	n.d.	pos.	n.d.	Methotrexate
	rlgG2								
	rlgG3	GPA (aktiv)	m	49	n.d.	n.d.	neg.	n.d.	Steroide
	rlgG4	GPA (aktiv)	m	51	n.d.	n.d.	pos.	n.d.	keine
	rlgG5	frühsystemische GPA (Remission)	w	51	n.d.	n.d.	pos.	n.d.	Methotrexat, Prednisolon
	rlgG6*	GPA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Analyse	Probe	Diagnose	♀/♂	Alter	BVAS	VDI	PR3-ANCA (>10U/l)	CRP (mg/l)	Therapie
NGS	G1	lokale GPA (aktiv)	w	27	6	2	neg.	11,4	Cotrim
	B1								
	G2	generalisierte GPA (Remission)	w	49	0	0	355	6,4	Leflunomid, Cyclophosphamid
	B2								
	G3	frühsystemische GPA (aktiv)	m	58	8	2	76,7	4,5	Methotrexat
	B3								
	G4	generalisierte GPA (Remission)	w	72	0	1	pos.	0,4	Prednisolon, Cyclophosphamid, Methotrexat
	G5	frühsystemische GPA (Remission)	w	55	0	0	9,3	1,9	Methotrexat
B5	53			Klinisch Symptomatik sehr ähnlich					

Analyse	Probe	Diagnose	♀/♂	Alter	PR3-ANCA (>10U/l)	Krankheits-Dauer (Jahre)	Therapie
Meta-Analyse	N1	GPA (aktiv)	w	61	positiv	7	keine
	N2	GPA (aktiv)	w	61	negativ	12	keine
		GPA (geringe Aktivität)	w	68	negativ	19	Cotrimoxazol
	N3	GPA (geringe Aktivität)	m	55	negativ	34	Methotrexate, Steroide
	N4	GPA (geringe Aktivität)	w	64	positiv	1	keine
	N5	GPA (geringe Aktivität)	w	82	negativ	0,25	keine
	N6	GPA (aktiv)	w	79	positiv	11	Cotrimoxazol, Steroide
	N7	GPA (aktiv)	w	28	negativ	0,25	keine
	L8	GPA (aktiv)	m	48	positiv	0,25	Cyclophosphamid, Steroide
	N8	GPA (aktiv)	m	49	positiv	1	Cyclophosphamid, Steroide
	N9	GPA (aktiv)	m	46	positiv	12	keine
	N10	GPA (aktiv)	m	51	positiv	0,25	keine
N11	GPA (aktiv)	m	77	positiv	0,5	Cyclophosphamid	
N12	GPA (aktiv)	m	49	postiv	0,25	Steroide	

Analyse	Probe	Diagnose	♀/♂	Alter	PR3-ANCA (>10U/l)	Krankheits-Dauer (Jahre)	Therapie
	N13	GPA (aktiv)	m	49	negativ	0,25	Steroide
	N14	GPA (aktiv)	w	73	positiv	1	Methotrexate
	N15	frühsystemische GPA (Remission)	w	51	positiv	1,33	Methotrexate, Prednisolon
IF	V458-14	GPA	m	56	n.d.	n.d.	n.d.
	V10-13	GPA (aktiv)	w	51	n.d.	n.d.	n.d.
	V143-15	GPA (aktiv)	w	61	n.d.	n.d.	n.d.
	V456-11	GPA (aktiv)	m	66	n.d.	n.d.	n.d.
	V183-07	GPA (aktiv)	m	54	n.d.	n.d.	n.d.
	Crs 3925-08	Chronische Rhinosinosis	entnommen der Kohorte (Müller et al., 2014)				
	Crs 8885-08						
	Crs 19236-08						

## **5 Methoden**

### **5.1 Klonierung und Expression rekombinanter IgG aus gewebständigen B Zellen bei der GPA**

#### **5.1.1 Lasermikrodissektion zur Isolierung von Einzelzellen aus dem Gewebsverband**

Mit einem fokussierten Laserstrahl wurden einzelne Zellen ausgeschnitten und in den Deckel eines Eppendorfgefäßes katapultiert. Dies gewährte zusammen mit Flächendesinfektionsmitteln (2 % Natriumhypochlorit) den nötigen Reinheitsgrad für eine Einzelzell-PCR. Die Zellen wurden per Halogenbeleuchtung direkt im Tubusstrahlengang abgebildet, wobei ein Blaufilter das Präparat vor dessen Wärmeentwicklung schützte. Das inverse Mikroskop hatte einen zweiten Strahlengang für die Lasereinheit, an welchem die Kamera angeschlossen war.

##### **5.1.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten**

Nasenschleimhautbiopsien wurden mit dem Kryotom 7,5 µm dick geschnitten und zwecks Haftung auf 1,0 mm PEN-Membran beschichtete Objektträger gezogen. Die Kryostatschnitte wurden mit absolutem, eiskaltem Aceton fixiert, kurz luftgetrocknet und bei -80 °C gelagert.

##### **5.1.1.2 Immunhistochemische Färbung von Kryogewebe auf CD138**

Der Kryostatschnitt wurde in 1x TBS für 2-3 min aufgetaut. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Gewebspräparate für 7 min mit 3 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger kurz in 1x TBS gedippt. Der monoklonale, anti-humane-Syndecan-1 Primäantikörper aus der Maus wurde für 15 min bei Raumtemperatur in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Nach kurzem Waschen in 1x TBS wurde das Peroxidase-konjugierte Maus-/Kaninchen-/Ratten-Polymer für 15 min auf den Gewebspräparaten inkubiert. Wieder wurde das Präparat 3-4 Mal in 1x TBS eingetaucht und anschließend die vorbereitete, 0,22 µm filtrierte Substratlösung 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) in Dimethylformamid für 2-5 min aufgebracht. Nach Spülen in Aqua dest. wurde die Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer für 1 min angeschlossen. Der Farbüberschuss wurde in Aqua dest. abgespült und der Kernfarbstoff für 5 min in 1x TBS gebläut. Nach abschließendem Spülen in Aqua dest. wurden die Präparate luftgetrocknet und im KCl vorbereiteten Excikator zur luftblasenfreien Lagerung aufbewahrt.

### 5.1.1.3 Lasermikrodissektion am Zeiss Axiovert 200M PALM Micro Beam System mit der Software Palm Robo V3.2

Für die Lasermikrodissektion wurden die Deckel von *Zeiss Katapult tubes* mit Mineralöl benetzt. Der Tubedeckel wurde umgedreht in einer Halterung über das Präparat gefahren, sodass die ausgeschnittene Zelle am Öl haften blieb. Mit dem 40er Objektiv wurden die CD138<sup>+</sup> Zellen, welche besonders im subepithelialen Raum lokalisiert sind, im Modus Robo LCP kreisförmig für die Mikrodissektion markiert, siehe Abbildung 7. Zum Ausschneiden wurde eine Gesamtlaserenergie von 75 % gewählt, wobei mit 40 % der Laserenergie fokussiert, mit 47 % der Laserenergie ausgeschnitten und mit 85 % der Laserenergie katapultiert wurde. Als Negativkontrolle wurde analog ein gleich großer Kreis PEN Membran aus einem gewebsfreien Areal ausgeschnitten.

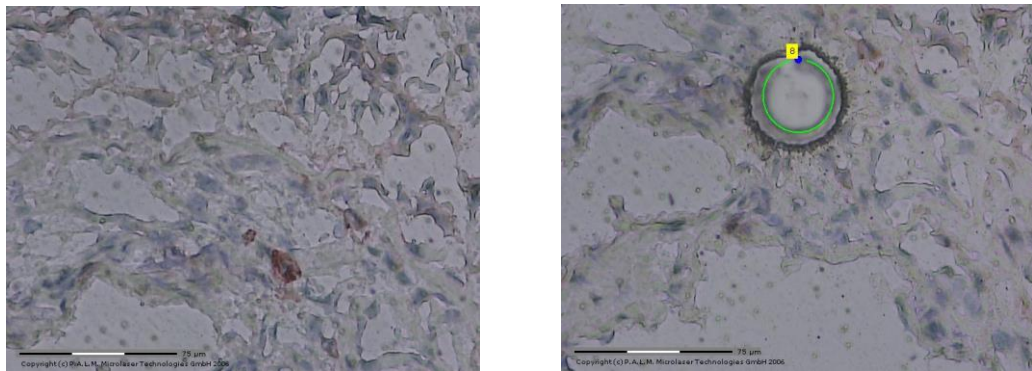


Abbildung 7: CD138<sup>+</sup> gefärbte Zelle im Zellverband einer nasalen Biopsie, aufgenommen im 40er Objektiv – vor und nach der Lasermikrodissektion

Im sterilen PCR-Kabinett werden je 21 µl 1x PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) in die *Zeiss Katapult tubes* pipettiert und anschließend bei 10 000 Upm 0,5 min zentrifugiert. So werden die Einzelzellen bei -20 °C gelagert oder sofort in die erste Runde der semi-nested Einzelzell IgHV PCR überführt.

### 5.1.2 semi-nested Einzelzell-PCR

Mit dieser verschachtelten Amplifizierung in zwei Schritten konnten spezifisch jene kleinen Bereiche im B-Zell-Genom amplifiziert werden, die für die variable Region der Leicht- und Schwereketten des Immunglobulins kodieren. In der ersten Amplifizierungsrunde wurden 21 Vorwärts-Primer eingesetzt, welche am Beginn der möglichen IgHV und IgLV oder IgKV Gene banden. Die in diesem Ansatz verwendeten Rückwärts-Primer (n=8) banden über die Enden der J Gensegmente der variablen Region hinaus, um den gesamten Bereich der variablen Region anzureichern. In der zweiten Runde wurde die präamplifizierte DNA der 1. Runde spezifisch hochamplifiziert. Es werden als 2. PCR 21 Ansätze mit jeweils einem Vorwärts-Primer der ersten Runde angesetzt und einer Mischung aus weiter innen liegenden Rückwärts-Primern, die am Ende der möglichen J Gensegmente der variablen

Region banden. Um eine Kontamination der Primer der ersten Runde mit weiter innen liegenden Primern der 2. Runde zu vermeiden, wurden die erste und zweite PCR Runde an verschiedenen sterilen Arbeitsplätzen durchgeführt. Die produktiven Rearrangierungen bilden im Gegensatz zu den unproduktiven Rearrangierungen funktionstüchtige Immunglobuline.

Theoretisch konnten auf beiden DNA Strängen die V-, (D-) und J-Gensegmente rearrangiert werden, sodass zwei rearrangierte Versionen pro Leicht- oder Schwereketten der Zelle auftreten konnten, von denen im Normalfall eine unproduktiv war. Da die J-Gensegmente jedoch nur 200-600 bp voneinander entfernt lagen, konnten längere PCR-Produkte ausgehend von der V-Primer Bindestelle das aktuell rearrangierte J-Gensegment überfassen und bis zu einem weiter abwärts liegenden J-Gensegment reichen. Abweichende PCR-Produktlängen konnten ebenfalls in Folge von Deletionen und Duplikationen entstehen. Deletionen und Duplikationen traten in einer Größenordnung von einzelnen Nukleotiden bis zu mehrere hundert Basenpaaren in etwa 4 % somatischer Mutationen in nicht-selektionierten (z. B. nicht ablesbare) Rearrangierungen auf und in 40 % der mutierten, nicht ablesbaren Rearrangierungen. Die hier beschriebene Technik wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe Küppers entwickelt (Küppers, 2004). Die Technik wurde weiterentwickelt von (Voswinkel et al., 2008a) (siehe Primerliste) und für die Experimente dieser Arbeit in der unten beschriebenen Variante durchgeführt.

### 5.1.2.1 PCR Runde 1

Zunächst wurde mit 29 Primern (siehe Primertabelle im Materialteil) ein Primermix hergestellt, wobei jeder Primer eine Konzentration von 10 pmol/µl aufwies (Tab. 2).

**Tabelle 2: Mastermix für Einzelzell PCR Runde 1.**

Komponente	Volumen [50 µl rxn]	8xMM
<b>10x Expand High Fidelity PCR Puffer w/o Mg</b>	3 µl	24 µl
<b>10 mM dNTP Mix</b>	1 µl	8 µl
<b>29 Primer – Mix</b>	5 µl	40 µl
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	4 µl	32 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	15 µl	120 µl

Die 21 µl Zellsuspensionen (Einzelzelle in PBS) wurden nun mit 28 µl Mastermix vermischt und im Thermocycler (TRIO) bei 95 °C für 2 min lysiert, bevor in der Pause bei 65 °C die Expand High Fidelity Taq Polymerase (je 1 µl a 3,5 U/µl) hinein-pipettiert wurde (Tab. 3).

**Tabelle 3: Zyklusbedingungen der Einzelzell PCR Runde 1.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	2 min	

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
65 °C	Pause (Zugabe der Taq-Polymerase)	1x
72 °C	1 min	
95 °C	50 sec	34x
59 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1x
4 °C	Pause	

### 5.1.2.2 PCR-Runde 2

Zunächst wurde pro Einzelzellprobe unter den sechs IgHV-Familien der Schwereketten nach einem Produkt gesucht. Ein J<sub>H</sub> 1-6 Primermix wurde in H<sub>2</sub>O hergestellt, wobei jeder Primer eine Endkonzentration von 0,25 pmol/μl aufwies. Sechs Mastermixe für IgHV1-6 wurden hergestellt (Tab. 4-5).

**Tabelle 4: Mastermix für die IGHV 1 Einzelzell-PCR Runde 2.**

Komponente	Volumen [50 μl rxt]	9xMM
10x PCR Rxn Puffer	5 μl	45 μl
10 mM dNTP Mix	0,5 μl	4,5 μl
JH1-6 Primermix	2,5 μl	22,5 μl
Primer VH1 10 pmol/μl	2,5 μl	22,5 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 μl	22,5 μl
H <sub>2</sub> O	35,4 μl	318,6 μl
Taq Polymerase 5 U/μl	0,6 μl	5,4 μl

**Tabelle 5: Mastermix für die IGHV2-6 Einzelzell-PCR Runde 2.**

Komponente	Volumen [50 μl rxt]	9xMM
10x PCR Rxn Puffer	5 μl	45 μl
10 mM dNTP Mix	0,5 μl	4,5 μl
JH1-6 Primermix	2,5 μl	22,5 μl
Primer VH 10 pmol/μl	2,5 μl	22,5 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 μl	13,5 μl
H <sub>2</sub> O	36,4 μl	327,6 μl
Taq Polymerase 5 U/μl	0,6 μl	5,4 μl

Je 1 μl PCR-Produkt einer Einzelzellprobe/Kontrolle und 1 μl H<sub>2</sub>O als Kontrolle der PCR2 wurde mit allen 6 Mastermixen (je 49 μl) in einer 96well-Platte für den Amplifizierungsschritt (Thermocycler T1) vorbereitet. Als Verdampfungsschutz wurde je 1 Tropfen Mineralöl aufpipettiert und eine Folie aufgeklebt. Die einzelnen Schritte (Doppelstrang-Denaturierung; Primerbindung, Amplifikation) liefen unter den Bedingungen aus Tab. 6 ab.

**Tabelle 6: Zyklusbedingungen der IGHV Einzelzell-PCR Runde 2.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	1 min	1x
68 °C	1 min	
72 °C	1 min	
95 °C	50 sec	44x
61 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1x
4 °C	Pause	

Sofern in einer Einzelzellprobe eine IgHV-Sequenz identifiziert werden konnte, wurde mit der PCR2 für die sechs IgkV und neun IgλV Familien als mögliches Leichtkettengen fortgefahren. Ein 5'Jk - Primermix und 5'Jλ - Primermix (siehe Punkt 4.5) wurden hergestellt, wobei jeder Primer eine Endkonzentration von 2,5 pmol/μl aufwies. Die sechs Mastermixe für Vκ 1-6 und die neun Mastermixe für Vλ wurden wie in Tabelle 7 und 8 angesetzt.

**Tabelle 7: Mastermix für IGkV Einzelzell-PCR Runde 2.**

Reagenz	Volumen [50 μl rxt]	4xMM
10x PCR Rxn Puffer	5 μl	20 μl
10 mM dNTP Mix	0,5 μl	2 μl
5'J kappa - Primermix	2,5 μl	10 μl
Primer V kappa 10 pmol/μl	2,5 μl	10 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 μl	10 μl
H <sub>2</sub> O	35,4 μl	141,6 μl
Taq Polymerase 5 U/μl	0,6 μl	2,4 μl

**Tabelle 8: Mastermix für IGλV Einzelzell-PCR Runde 2**

Komponente	Volumen [50 μl rxt]	4xMM
10x PCR Rxn Puffer	5 μl	20 μl
10 mM dNTP Mix	0,5 μl	2 μl
5'J lambda - Primermix	2,5 μl	10 μl
Primer V lambda 10 pmol/μl	2,5 μl	10 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 μl	6 μl
H <sub>2</sub> O	36,4 μl	145,6 μl
Taq Polymerase 5 U/μl	0,6 μl	2,4 μl

Wie in der PCR2 für das IgHV-Gen wurde je 1 μl PCR1-Produkt einer Einzelzellprobe/Kontrolle bzw. 1 μl H<sub>2</sub>O mit allen Mastermixen (je 49 μl) in

Reaktionsgefäßen für den Amplifizierungsschritt (Thermocycler T3) vorbereitet. Das Amplifizierungsprotokoll wurde wie in Tabelle 9 und 10 aufgelistet abgewandelt.

**Tabelle 9: Programm Thermocycler für IGκV Einzelzell-PCR Runde2.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	1 min	1x
68 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
95 °C	50 sec	44x
58 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1x
4 °C	Pause	

**Tabelle 10: Programm Thermocycler für IGλV Einzelzell-PCR Runde2.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	1 min	1x
61 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
95 °C	1 min	44x
63 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1x
4 °C	Pause	

### 5.1.3 Gelelektrophorese

Um die Amplifikate der IgHV, IgκV und IgλV – Einzelzell PCR auf spezifische Produkte zu überprüfen, wurden diese im 1,5%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Pro Gel wurden 0,75 g Agarose (Wide Range, Serva) in 50 ml 1x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und anschließend mit 5 µl Gelred (10000x) vermischt und in der Gelgießkammer mit entsprechendem Kamm im Schlitten ausgehärtet.

In einem Zellkulturdeckel einer Platte mit 96 Vertiefungen wurden je 2 µl 6x Nukleinsäure-Ladepuffer mit 10 µl PCR-Produkt vermischt und anschließend in die Geltasche pipettiert. Zur Orientierung wurde ein 100 bp Marker (10 µl) verwendet. Bei einer Spannung von 70 Volt wurden die Proben 50 min lang entsprechend ihrer Größe in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Mit der Software ImageLab wurde die Geldokumentationsanlage gesteuert, in welcher das Gel auf einem UV-Tray fotografiert wurde. Das gesuchten Gene der variablen Region waren auf einer Höhe von 350 bp zu finden.

#### **5.1.4 TOPO-TA Klonierung zur Vorbereitung der Sequenzierung**

Da eine direkte Sequenzierung obiger PCR-Produkte auf Grund lokaler, struktureller Sequenzgegebenheiten mit den derzeitigen kommerziellen Sequenzierungsdiensten nicht möglich war, wurde die Methodik der TOPO-TA Klonierung der Sequenzierung vorangestellt. Das PCR-Produkt wurde mittels präparativem Agarosegel aufgereinigt und dann in den Standardvektor pCR<sup>TM</sup>4-TOPO® kloniert, sodass zur anschließenden Sequenzierung Standardprimer aus dem Vektor benutzt werden konnten. Wie in dem Herstellerhandbuch versprochen, ermöglichte die Methodik der TOPO-TA Klonierung den Einbau von PCR-Produkten in einen Plasmidvektor ohne die Verwendung von spezifischen Restriktionsenzymen und Ligierungsschritten. Der sogenannte aktivierte Vektor lag linearisiert vor mit einem Überhang von Thyrosinen am 3'-Ende. Die Topoisomerase I des Vaccinia Virus spaltete das Phosphodiester-Rückgrat spezifisch nach doppelsträngigen 5'-CCTT- Motiven und speicherte die frei gewordene Energie unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zum 3' Phosphatende (Shuman, 1991). Voraussetzung für den Einbau sind PCR-Produkte, die in der letzten Amplifizierungsphase durch die Aktivität der Taq-Polymerase als terminale Transferase am 3'-Enden mit einem Überhang an Adenosinen versehen worden waren. Es kam zur komplementären Doppelstrangbindung an den "T"- und "A"- Überhängen, was strukturell den Einbau des PCR-Produktes in einen zirkulären Plasmidvektor bedeutete, wobei die Energie für die Ligation im Phosphodiester-Rückgrat aus der Spaltung der kovalenten Bindung zur Topoisomerase resultierte (Shuman, 1994).

##### **5.1.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkt mittels präparativem Agarosegel**

Ein 3%iges Agarosegel (Biophor Agarose, Biozym) wurde gegossen, in welchem 50 -100 µl frisches PCR-Produkt bei 50 Volt 3 h aufgetrennt wurde. Zur Orientierung wurden 10 µl UL-Marker mit aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde auf dem UV-Tisch mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit mit Mikrozentrifuge). Bei geringer DNA Menge wurde das Standardelutionsvolumen verringert und re-eluiert.

##### **5.1.4.2 TOPO-TA Klonierung**

Ein kommerzielles Kit (TOPO-TA Cloning Kit for sequencing) wurde zusammen mit chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (One Shot TOP10) benutzt. In die Klonierungsreaktion wurden 4 µl aufgereinigtes PCR Produkt eingesetzt. Abweichend vom Protokollvorschlag wurde dieser Klonierungsansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert und für die Transformation der *E. coli* Zellen per Hitzeschock wurden 4 µl Klonierungsreaktion verwendet (Kommunikation mit Dr. Christoph Hammers). Es wurden 50 - 100 µl transformierte Zellen (unverdünnt & 1:40) in SOC Medium auf Selektionsplatten (50 µg/ml Ampicillin)

ausgestrichen und für 24h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2-4 Einzelkolonien in 5 ml LB-Flüssigmedium (50 µg/ml Ampicillin) für 12-16 h bei 37 °C und 180 Upm für die Plasmidisolierung gezüchtet. Vor der Plasmidisolierung (QIAprep Spin Miniprep Kit mit Mikrozentrifuge) wurden Glycerolstocks zur Langzeitlagerung angelegt. Dabei wurden 700 µl kultivierte Einzelkolonie und 300 µl Glycerol (50 % in H<sub>2</sub>O, steril autoklaviert) in Kryotubes bei -80 °C eingefroren.

### **5.1.5 Sequenzierung**

Die DNA Konzentration der aufgereinigten Plasmide wurde mit dem Nano-Drop in der Physiologie der Universität zu Lübeck bestimmt. Die aufgereinigten Plasmide wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 15 µl und eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt; die Primer (Standardprimer T7) auf 15 µl a 10 pmol/µl. Zur Sequenzierung wurden diese Probe zu MWG/eurofins geschickt.

Mit der unter Punkt 5.1.1 bis 5.1.5 beschriebenen Methodik konnte ein weiteres Paar an IGHV & IGLV Genen einer einzelnen CD138<sup>+</sup> B-Zelle der GPA-Nasenschleimhaut (H5= MF616000, L5= MF615999) identifiziert werden. Mit der unter Punkt 5.1.1 bis 5.1.3 beschriebene Methodik wurden 4 Paare an IGHV & IGLV Genen einzelner CD138<sup>+</sup> B-Zellen der GPA-Nasenschleimhaut (H1=JQ240200, L1=JQ240201; H2=JQ240202, L2=JQ240203, H3=JN990800, L3=JN990801, H4=JN990783, L4=JN990784) und ein weiteres, solches Paar aus einer einzelnen CD20<sup>+</sup> Nierenzelle (Kooperation mit Prof. Dr. Jan Willem Cohen Tervaert, Universität Maastricht, Niederlande) in Form laborinterner Vorarbeiten generiert, die ich freundlicherweise übernehmen durfte.

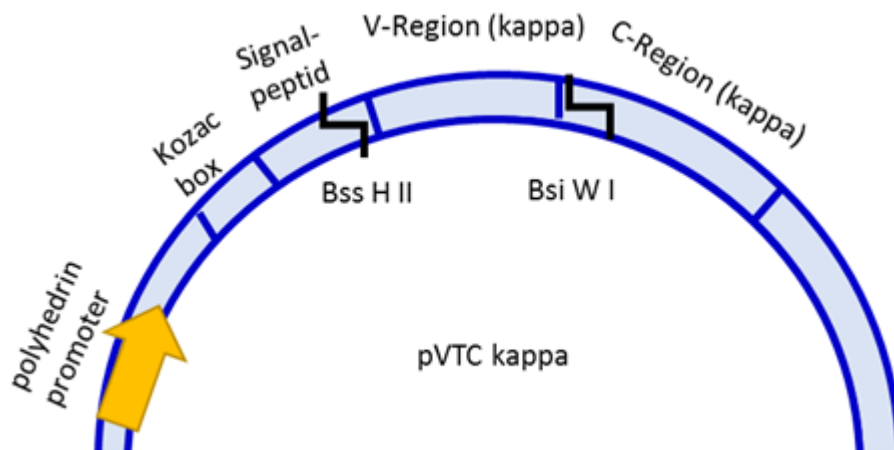
### **5.1.6 Sequenzmodifizierung zur Klonierung in den Transfervektor**

Identifizierte IgHV und IgLV Gene aus einer Einzelzelle wurden nun für die spezifische Klonierung in die entsprechenden Transfervektoren (pVTC gp37 für die Schwereketten, pVTC<sub>κ</sub> oder pVTC<sub>λ</sub> für die Leichtketten) vorbereitet. Mit den Transfervektoren gelangten die Sequenzen der variablen Region später in die Insektenzelllinie, in der die Expression der rekombinanten Immunglobuline stattfand. Zunächst wurden die Sequenzen der variablen Region abwärts und/oder vorwärts mit der Sequenzinformation aus dem wahrscheinlichsten Keimbahnen laut IMGT/V-Quest an beiden Enden verlängert, um den gesamten Bereich der variablen Region (FWR1-FWR4) zu komplettieren. Dabei fehlten am 5'-Ende durchschnittlich 17 Basen der FWR1 und am 3'-Ende durchschnittlich 7 Basen der FWR4. Des Weiteren mussten die beiden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme zuäußerst der variablen Region angefügt werden. Dabei war es wichtig, dass die Schnittstelle für das jeweilige Restriktionsenzym (Tab. 11) exakt wie im Transfervektorkonstrukt (Abb. 8) in das Ende der Signalpeptidsequenz oder den Anfang der konstanten Region integriert wurde, sodass nach Klonierung über

Restriktionsenzymverdau und Ligation des Signalpeptid, die variable Region und die konstante Region in-frame abgelesen werden konnten (weitere Details im Anhang).

**Tabelle 11: Einbau der Schnittstellen für Restriktionsenzyme.**

	5' der V-Region		3' der V-Region	
<b>Schwerkette (pVTC gp37)</b>	Afl II	C↓TTAAG GAATT↑C	Nhe I	G↓CTAGC CGATC↑G
<b>Leichtkette (pVTCκ)</b>	Bss H II	G↓CGCGC CGCGC ↑ G	Bsi W I	C↓GTACG GCATG↑C
<b>Leichtkette (pVTCλ)</b>	Bss H II	G↓CGCGC CGCGC↑G	Avr II	C↓CTAGG GGATC↑C



**Abbildung 8: Aufbau des Transfervektorkonstruktes (pVTC kappa) für die Expression von Leichtketten-Genen des kappa-Typs**

Leichtkettengen des kappa-Typs, bestehend aus V-Region und C-Region können in Abhängigkeit des Polyhedrin-Promoters transkribiert werden. Mittels der Restriktionsenzyme BssH II und Bsi W I werden individuelle IgLV-Gene in den Vektor kloniert. Die Kozac-Box wird für die Initiierung der Translation benötigt. Das Signalpeptid reguliert den Transport des Proteins. Das Polyadenylierungs-Signal für die mRNA abwärts der C-Region stammt aus dem ursprünglichen bakuloviralen Polyhedrin-Gen (Poul et al., 1995). Das Transfervektorkonstrukt für die Klonierung von IgLV-Genen wurde freundlicherweise von Dr. Martine Cérutti bereitgestellt.

Für die Klonierung der rekombinanten Immunglobuline (H4, rIgG Nr. 5 & rIgG Nr. 6) wurden die erforderlichen Sequenzverlängerungen kommerziell von MWG/eurofins synthetisiert, um Mutationen durch PCR-Fehler zu vermeiden. Dabei wurde die gewünschte Sequenz in den Standardvektor pEXA2 eingefügt. Für die Klonierung der rekombinanten Immunglobuline (rIgG Nr. 1 bis 4) gab es Vorarbeiten. Jene Sequenzen sind mittels Verlängerungs-PCR unter Verwendung überlappender Primer generiert worden wie bei (Haslin et al., 2007) beschrieben wurde und bei -80 °C in Form eines zwischenklonierten Vektors in *E. Coli* Zellen aufbewahrt worden.

### 5.1.7 Klonierung in Transfektor mittels Restriktionsenzym-Verdau und Ligation

Die Transfektoren wurden freundlicherweise von Dr. Martine Cérutti (Baculovirus et Thérapie, Station de Recherche, CNRS, 30380 Saint Christol L ez Alès, France) bereitgestellt. Je 10 µg Transfektor in Ethanol wurden bereitgestellt. Für die molekulargenetischen Arbeiten wurden die Vektoren unter Zentrifugation bei 13000 Upm für 12 min bei RT gefällt und anschließen in je 10 µl H<sub>2</sub>O unter Vortexen gelöst. Als Reserve wurden *E. Coli* Zellen, wie im TOPO-TA Protokoll beschrieben, mit den Transfektoren transformiert und bei -80  C als Glycerolstock aufbewahrt. Es wurden 10-50 µl Glycerolstock (Transfektor oder zwischenklonierte Sequenz der variablen Region) auf vorgewärmten LB-Agarplatten kultiviert und aufgereinigt (QIAprep Spin Miniprep Kit mit Mikrozentrifuge) wie ebenfalls im TOPO-TA Protokoll beschrieben wurde. Sowohl die zwischenklonierte Sequenz der variablen Region als auch der entsprechende Transfektor wurden in separaten Ansätzen mit den entsprechenden beiden Restriktionsenzymen aus Tabelle 11 verdaut. In den Tabellen 12-14 werden die Reaktionsansätze und Inkubationsschritte beschrieben. Je nach Konzentration der DNA, die am NanoDrop ermittelt wurde, wurde der 50 µl oder 75 µl Ansatz gewählt. Es wurde auf Eis pipettiert und direkt nach dem Verdau eine Aufreinigung im pr eparativen Agarosegel angeschlossen wie in Punkt 5.1.3 beschrieben. Im Gel wurde ebenfalls das unverdaute Konstrukt als Kontrolle und Orientierung mit aufgetragen. Auf diese Weise konnte das Schneiden in Fragmente der richtigen Größe überprüft werden und der Verdau durch Entfernen der Enzyme und Salze endgültig gestoppt werden.

**Tabelle 12: Restriktionsenzymverdau für die Klonierung der Schwereketten mit Afl II und Nhe I.**

Pipettierreihenfolge	Komponente	Volumen [50 µl rxt / 75 µl rxt]
1	Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	43 µl – X µl / 63,5 µl – X µl
2	10x NEBuffer 2.1	5 µl / 7,5 µl
3	DNA (1 µg)	X µl / X µl
4	Afl II (10 units/µl)	1 µl / 2 µl
4	Nhe I (10 units/µl)	1 µl / 2 µl
Inkubation für 10 min bei 37 �C im Thermocycler T3		

**Tabelle 13: RE-Verdau für die Klonierung der κ-Leichtkette mit Bss H II und Bsi W I.**

Pipettierreihenfolge	Komponente	Volumen [50 µl rxt / 75 µl rxt]
1	Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	43 µl – X µl / 63,5 µl – X µl
2	10x NEBuffer 3.1	5 µl / 7,5 µl
3	DNA (1 µg)	X µl / X µl
4	Bss H II (10 units/µl)	1 µl / 2 µl
Inkubation für 10 min bei 50 �C im Thermocycler T3		
5	Bsi W I (10 units/µl)	1 µl / 2 µl

Pipettierreihenfolge	Komponente	Volumen [50 µl rxt / 75 µl rxt]
Inkubation für 10 min bei 55 °C im Thermocycler T3		

Tabelle 14: RE-Verdau für die Klonierung der λ-Leichtkette mit Avr II und Bss H II.

Pipettierreihenfolge	Komponente	Volumen [50 µl rxt / 75 µl rxt]
1	Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	43 µl – X µl / 63,5 µl – X µl
2	10x CutSmart Buffer	5 µl / 7,5 µl
3	DNA (1 µg)	X µl / X µl
4	Avr II (10 units/µl)	1 µl / 2 µl
Inkubation für 10 min bei 37 °C im Thermocycler T3		
5	Bss H II (10 units/µl)	1 µl / 2 µl
Inkubation für 10 min bei 50 °C im Thermocycler T3		

Für die Ligation des geschnittenen Transfervektors mit der geschnittenen Sequenz für die variable Region wurden jeweils 50 ng Vektor mit der 3-fachen, 5-fachen oder 7-fachen molaren Menge an Insert kombiniert (Tab. 15). Um die benötigte Menge (ng) an Insert entsprechend des gewünschten molaren Verhältnisses von Insert/Vektor zu berechnen, wurde diese Formel benutzt:

$$\text{Insert (g)} = \left( \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert (bp)}}{\text{Vektor}} \right) \times \text{Vektor (g)} \times \left( \text{Längenverhältnis} \frac{\text{Insert (bp)}}{\text{Vektor (bp)}} \right)$$

Tabelle 15: Molare Verhältnisse an Insert und Vektor für die Ligation.

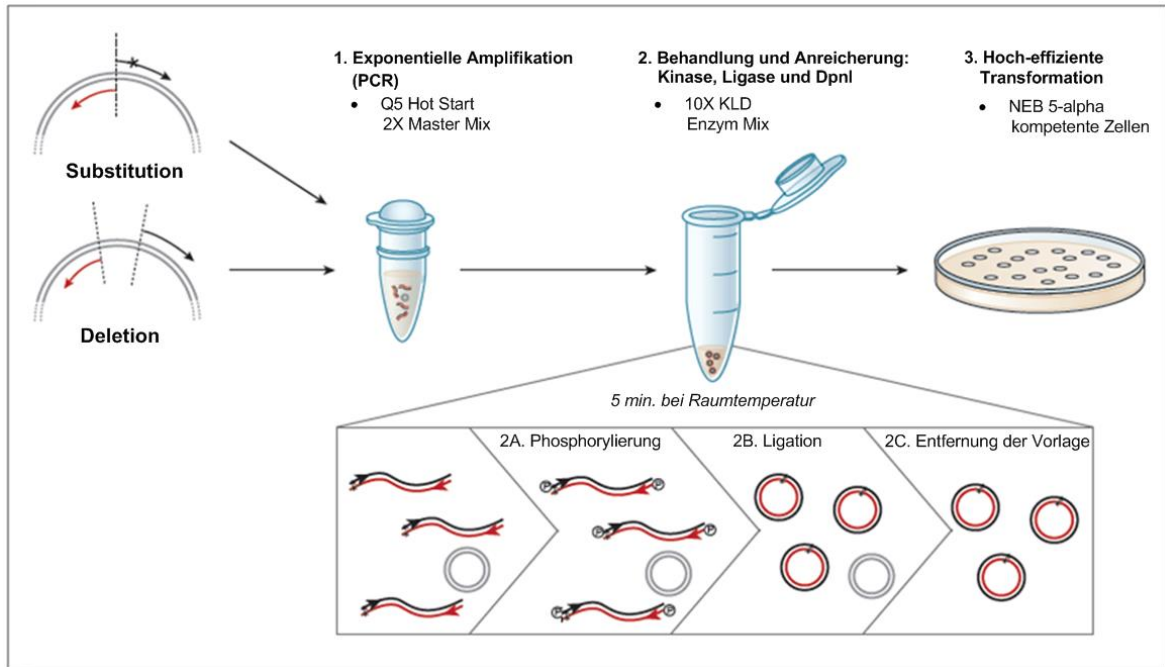
Nr. der Schwer- bzw. Leichtkette	Insertlänge (bp)	Transfektor für jeweiliges Insert	Vektorlänge (bp)	molares Verhältnis $\frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$ bei Ligation
H1	397	pVTC gp37	7510	3:1
H2	382	pVTC gp37	7510	7:1
H3	415	pVTC gp37	7510	5:1
H4	370	pVTC gp37	7510	5:1
H5	391	pVTC gp37	7510	5:1
H6	379	pVTC gp37	7510	7:1 & 5:1
L1	346	pVTC kappa	8185	5:1
L2	331	pVTC kappa	8185	5:1
L3	331	pVTC kappa	8185	7:1
L4	343	pVTC lambda	8184	5:1
L5	337	pVTC kappa	8185	5:1
L6	331	pVTC kappa	8185	7:1

Das Volumen von Insert und Vektor wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Es wurde auf Eis gearbeitet und 10 µl 2X Quick Ligation Buffer dazugegeben und gemischt. 1 µl Quick T4 DNA Ligase (2\*10<sup>6</sup> units/ml) wurde einpipettiert, vorsichtig gemischt und kurz in einer

kleinen Tischzentrifuge runterzentrifugiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz für 5 min in einem 26 °C warmen Heizblock inkubiert, dann 10 min auf Eis abgekühlt und bei – 20 °C gelagert. Geprüft wurde die Ligation mittels Sequenzierung. Dazu wurden wie in Punkt 5.1.4.2 *E. Coli*-Zellen analog mit dem Ligationsansatz transformiert und kultiviert. Nach der Plasmidisolation wurden die Transfervektorkonstrukte zusammen mit dem entsprechenden Primern (siehe Punkt 4.5) pVTC gp37, pVTCκ oder pVTCλ zur Sequenzierung bei MWG/eurofins versandt, wie in Punkt 5.1.5 genauer beschrieben worden ist. Die Sequenzierungsprimer wurden vorwärts der Insertionsstelle im Transfervektor in einer Länge von 17 bp designt, die spezifisch nur dort vorkam. Des Weiteren wurde eine niedrige Energie zur Selbsthybridisierung, ein GC-Gehalt von 55 – 65 %, eine Schmelztemperatur von 55 – 60 °C und eine Position der 3' GC-Klammer vorausgesetzt.

### **5.1.8 Modifizierung des Transfervektors mittels PCR**

Die Transfervektoren mit den ligierten variablen Regionen wurden per Deletions-PCR ein weiteres Mal modifiziert, da der gesamte Teil der variablen Region inkloniert worden war ohne zu berücksichtigen, dass 1-5 Basen der FWR4 ausgespart werden müssen, um einen in-frame Übergang zum Anfang der konstanten Region im entsprechenden Transfervektor zu bilden. Dazu wurde das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Des Weiteren musste das Transfervektorkonstrukt für die Schwerkette H3 an einer weiteren Stelle um 2 künstliche Mutationen aus PCR oder DNA-Replikation in *E. Coli* korrigiert werden. Für die Substitutions-PCR wurden entgegengesetzte Vorwärts- und Rückwärts-Primer entworfen (Abb. 9), die die korrekte Substitution an ihren 5'-Enden enthalten. Für die Deletions-PCR wurden entgegengesetzte Vorwärts- und Rückwärts-Primer entworfen (Abb. 9), die die zu deletierende Region mit ihren 5'-Enden flankieren und 100 % komplementär zur Plasmidsequenz waren.



**Abbildung 9: Methodischer Überblick für Substitutions- und Deletions-PCR mittels Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Quelle: NEB-Manual E0554)**

Mit speziell designeten Primern können sowohl Substitutionen als auch Deletionen per PCR in Vektoren eingebracht werden. Die nachfolgende Behandlung des amplifizierten, nicht-methylierten Materials mit dem sogenannten KLD-Mix aus Kinase, Ligase und DpnI bereitet das Konstrukt für die Transformation in *E. coli* Zellen vor. Die Kinase phosphorylierte die 5'-DNA-Enden für die Ligation bzw. Rezirkulation und das DpnI Restriktionsenzym verdaute das bakteriell - methylierte Ausgangstemplate.

Ein online-Programm<sup>9</sup> wurde zur Primerentwicklung verwendet. Die Annealingtemperatur (58 - 69 °C) lag etwa bei der Schmelztemperatur zuzüglich 3 °C und musste bei 6 der 12 zu deletierenden Transfervektoren weiter gesenkt oder erhöht werden. Bei den Primern für die Transfervektorkonstrukte H1 und H3 entstanden bei hohen Annealingtemperaturen kein Produkt, da vermutlich keine Hybridisierung mehr stattfand. Bei niedrigeren Annealingtemperaturen im PCR-Zyklus oder einer Touch-Down-PCR entstanden ebenfalls keine Produkte, was vermutlich an der hohen Haarnadel-Stabilität des Rückwärts-Primers laut Primer3 lag. Für die Deletions-PCR der Transfervektorkonstrukte H1 und H3 wurden die zunächst entwickelten Primer am 3'-Ende um je 3 Basen eingekürzt, um die Bildung der Haarnadel-Struktur zu verhindern.

Die Template-DNA (aufgereinigtes Plasmid) wurde in Elutionspuffer auf 15 ng/μl verdünnt. Die PCR wurde wie in Tabelle 16 beschrieben angesetzt, gemischt und im Thermocycler T3 nach den Zyklusbedingungen aus Tabelle 17 und 18 durchgeführt.

<sup>9</sup> New England Biolabs (2017)  
NEBaseChanger  
<http://nebasechanger.neb.com/>  
(Stand: 12.06.2018)

**Tabelle 16: Mastermix für Deletions-/Substitutions-PCR.**

Komponente	Volumen [25 µl rxt]
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	9
Primer fw (10 µM)	1,25 µl
Primer rew (10 µM)	1,25 µl
Q5 Hot Start High Fidelity 2x Mastermix	12,5 µl
DNA (15 ng/µl)	1 µl

**Tabelle 17: Zyklusbedingungen für die Deletions-/Substitutions PCR.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
98 °C	30 sec	1x
98 °C	10 sec	25x
Annealingtemperatur aus Tabelle 7	20 sec	
72 °C	3 min 20 sec	
72 °C	2 min	1x
4 °C	Pause	1x

**Tabelle 18: Annealingtemperatur für die Deletions-/Substitutions PCR einzelner Transfervektorstrukture.**

Transfervektorkonstrukt	Annealingtemperatur
H1	58 °C
H2	69 °C
H3	60 °C
H3 rep2	67 oder 68 °C
H4	69 °C
H5	69 °C
H6	69 °C
L1	69 °C
L2	68 °C
L3	69 °C
L4	66 °C
L5	67 °C
L6	69 °C

Das PCR-Produkt wurde im 1,5%igen Agarosegel bei 70 Volt für 1,5-2 h zusammen mit 6 µl 10 kbp-DNA-Marker aufgetragen. Die nachfolgende Behandlung mit dem sogenannten KLD-Mix bereitete das Konstrukt für die Transformation in sog. hoch-effiziente NEB 5-alpha kompetente *E. coli* Zellen vor. Die Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben mit 1 µl PCR-Produkt durchgeführt. NEB 5 alpha kompetente *E. coli* Zellen wurden mit 5 µl

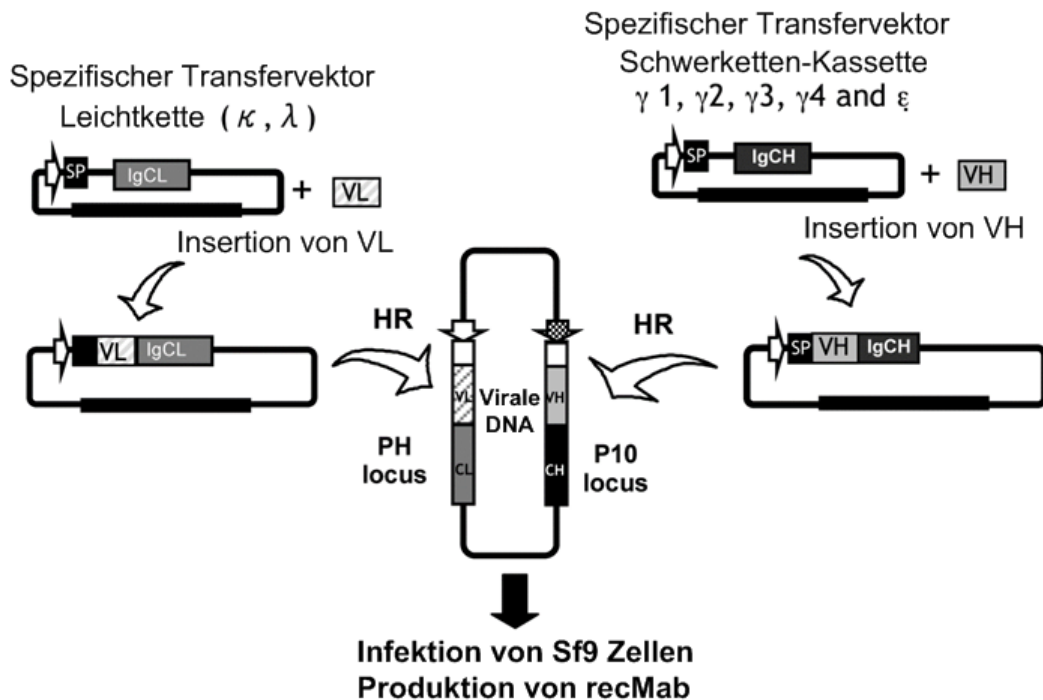
KLD-Reaktion entsprechend dem Herstellerhandbuch transformiert und auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Nach der Plasmidisolierung von 2-4 Einzelkolonien wurde die korrekte Deletierung per Sequenzierung mit den Transfervektorprimern (pVTC gp37, pVTC kappa oder pVTC lambda) wie in Punkt 5.1.5 beschrieben überprüft.

#### **5.1.9 Anreicherung der Transfervektorkonstrukte**

Aus dem Glycerolstock mit dem gewünschten Transfervektorkonstrukt wurden 10 µl in 25 ml vorgewärmtem LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin für 12-16 h bei 37 °C und 180 UPM für die Plasmidisolierung gezüchtet. Für die Aufreinigung wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit entsprechend der Standardanleitung benutzt. Freundlicherweise durfte die Bakterienzentrifuge (≥20000 g) im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck benutzt werden. Pro Midi-Prep wurden 5 ml Eluat (Plasmid in 1,25 M NaCl, 15 % Isopropanol, 50 mM Tris-Cl, pH8,5) gewonnen, die dann mit dem 0,7 - fachen Volumen an ungekühltem Isopropanol präzipitiert worden sind bei 30 - minütiger Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C, um ein Überhitzen der Probe zu vermeiden. Für die Sequenzierungskontrolle wurden 200 µl Eluat separat gefällt und anschließend in 1 ml 70 %igem Ethanol bei 20000 g und 4 °C für 10 min gewaschen. Das Pellet wurde 15 min Luft – getrocknet und in 20 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit gelöst. Die übrige Isopropanol – gefällte Probe wurde in 1 ml 70%igem Ethanol versandt.

#### **5.1.10 Homologe Rekombination, Expression und Aufreinigung der rlgG**

Die homologe Rekombination, Expression und Aufreinigung der rlgGs wurde nach einem jahrelang optimierten Verfahren von einem Kooperationspartner durchgeführt (Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie, Station de Recherche, CNRS, 30380 Saint Christol Lèz Alès, Frankreich). Während meines zweiwöchigen Aufenthalts bei Dr. Martine Cérutti durfte ich die homologe Rekombination von Leicht- und Schwereketten-Transfervektorkonstrukt zusammen mit baculoviraler DNA in Sf9 Insektzellen wie in Abbildung 10 dargestellt an einem rlgG selbst durchführen sowie eine Kontroll-PCR mit viraler DNA. Dabei wurden zur Transfektion der DNA über Liposomenkomplexe in Insektzellen DOTAP benutzt.



**Abbildung 10: Methodische Übersicht zur Konstruktion rIgG exprimierender Baculoviren in Insektzellen (Cérutti und Golay, 2012)**

Die kodierende cDNA für die variablen Regionen (VH und VL) werden entsprechend des Leserahmens von Signalpeptid-Sequenz und der humanen konstanten Region von Immunglobulinen in entsprechende Transfervektoren inseriert. Die Transfektion von Sf9 Insektzellen mit defekter nicht-infektöser, viraler DNA und zwei Transfervektoren bewirkt die homologe Rekombination (HR). Die entstandenen infektiösen, doppelt-rekombinanten Viren werden mittels Plaque-Assay in einzelne Klone separiert.

Für die Kotransfektion wurden die Transfervektorkonstrukte für 15 min bei 10000 Upm zentrifugiert und das Pellet anschließend 3 Mal in 70%igem Ethanol für 5 min bei 10000 Upm gewaschen. Das pelletierte Transfervektorkonstrukt wurde 5-10 min Luft - getrocknet und in Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Dabei sollte eine DNA-Konzentration von etwa 1 µg/µl erreicht werden, die über Nacht bei 4 °C zwecks Faltung inkubieren musste. Am nächsten Tag wurde eine Sf9 Insektzellkulturlinie (3-Tage Anzucht in F75-Zellkulturflasche, exponentielle Phase) geerntet, indem das alte Medium abgesaugt wurden und die Zellen in 10 ml TGV1-Medium abgeschabt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit TGV1 Medium auf eine Sättigungsdichte (100 % ≈ maximale Zellzahl pro Kubikzentimeter unter spezifischen Wachstumsbedingungen) von 30 - 50 % verdünnt. Je 5 ml dieser Zellsuspension wurden in T25 – Zellkulturflaschen 1 h bei Raumtemperatur adhärirt. In der Zwischenzeit wurde in einem 1,8 ml Reaktionsgefäß 0,5-1 µg baculovirale DNA und 5 µg DNA der beiden Transfervektorkonstrukte vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 1,5 ml TGV1 zu der DNA dazugegeben und 15 – 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der adhärirten Sf9 Zellen wurde entfernt. 40 µl DOTAP wurden zügig in ein 6 ml Reaktionsgefäß mit 1,5 ml TGV1 pipettiert und im Anschluss mit der TGV1 – DNA Reaktion kurz vermengt und dann auf die Zellen pipettiert.

So wurden die Zellen für 4 Stunden bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und 5 ml TGV3 (enthält fetales Kälberserum) ersetzt. Nun mussten die Zellen 3-5 Tage bei 28 °C im Brutschrank wachsen. Danach wurden die Zellen durch leichtes Klatschen an das Anzuchtgefäß gelöst. Der gesamte Überstand wurde bei 3000 Upm für 10 min zentrifugiert und entfernte die Insektenzellen. Der virale Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

Für die Aufreinigung/Aufkonzentrierung rekombinanter Baculoviren in Form von Klonen wurde der lytische Plaque-Assay (Brown und Faulkner, 1977) benutzt. Zunächst wurde wieder eine Sf9 Insektenzellkulturlinie (3-Tage Anzucht in F75-Zellkulturflasche, exponentielle Phase) wie oben beschrieben geerntet. Je 3 ml wurden in die Vertiefungen von vier 6-well-Platten pipettiert. Der virale Überstand wurde mit TGV3 in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 1/10 in 7 Schritten in Reaktionsgefäßen vorbereitet. Nun wurde das Medium der adhärenierten Zellen pro Vertiefung mit je 0,5 ml verdünntem, viralem Überstand ersetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden pro viraler Verdünnung ( $10^{-1}$  –  $10^{-7}$ ) 3-4 Vertiefungen der 6-well-Platte infiziert. In der Zwischenzeit wurde Agarose (0,8 g in 20 ml destilliertem H<sub>2</sub>O autoklaviert) in der Mikrowelle erhitzt. Wenn die Agarose auf etwa 55 °C abgekühlt war, wurden 45 ml TGV3 dazugegeben und im 37 °C Wasserbad aufbewahrt. Die Vertiefungen der 6-well-Platten wurden nun mit je 2 ml Agaroselösung tropfenweise und unter Kreisen der Platte überschichtet, was ein Ablösen der Zellen verhinderte. Nach 1-2 Stunden war der Agar ausgehärtet. Die Agaroseschicht garantierte, dass sich Viren nur von Zelle zu Zelle ausbreiten konnten, nicht aber über das Zellmedium. Die 6-well-Platten wurden mit Parafilm versiegelt und für 3-5 Tage bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde jede Vertiefung mit 1 ml Neutralrot (0,05 % in TGV1) für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Lebendzellarbstoff wieder abgesaugt, die Platte in Parafilm eingewickelt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden unter dem Lichtmikroskop weiße, lytische Zellplaques eingekreist, die auf Grund von Virusbefall gestorben waren. Unter der Sterilbank wurden die 2-3 mm durchmessenden Plaques mit einer Pasteurpipette abgesaugt und pro Klon in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml TGV3 überführt. Die rekombinanten Baculoviren wurden bei 4 °C gelagert. Die Plaque-bildende Einheit (pfu) gibt die Anzahl infektiöser Viren einer Flüssigkeit an und wird folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl an Plaques}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen (ml)}}$$

Für die erste Amplifizierung der rekombinanten Bakuloviren mit einem einzelnen Klon wurden zunächst adhärenente Sf9-Zellen vorbereitet. 5 ml einer Zellsuspension der Konzentration 100000 Zellen/ml TGV1 wurden in einer F25 – Flasche für 1 h inkubiert und

dann das Medium ersetzt durch 0,2 ml eines einzelnen, baculoviralen Klons und 1 ml TGV3. Nach 1 h wurden weitere 4 ml TGV3 hinzugefügt und das Kulturgefäß bei 28 °C für 4-5 Tage im Brutschrank gelagert. Der Überstand wurde wieder gesammelt und nach Zentrifugation bei 3500 Upm für 5 min bei 4 °C aufbewahrt.

Für die DNA-Aufreinigung viraler Partikel aus 3 ml Zellkulturüberständen wurden diese ein zweites Mal bei 35000 Upm für 45 min zentrifugiert. Das virale Pellet wurde in 500 µl TEK-Puffer aufgenommen und 5 µl Proteinase K (20 mg/ml in destilliertem H<sub>2</sub>O) sowie 10 µl Sarkosyl (10 %) hinzu pipettiert. Diese Behandlung diente dem Abbau von Proteinen und der Denaturierung von Nukleinsäure. Der Ansatz wurde über Nacht bei 50 °C in Zentrifugiergefäßen mit weißem Stopfen inkubiert und am nächsten Tag für die DNA-Extraktion in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umgefüllt. Für das Pipettieren viraler DNA wurden Pipettenspitzen mit weiterer Öffnung verwendet, um die DNA nicht zu beschädigen. Dann wurden 10 µl RNase hinzu pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 500 µl Phenol aufgefüllt. Nach vorsichtigem Schwenken wurde bei 10000 Upm für 5 min zentrifugiert, sodass sich eine Schichtung aus organischer und wässriger Phase ergab, wobei sich denaturierte Proteine in der Interphase sammelten. In den nächsten beiden Schritten wird die wässrige Phase mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (Fluka) vermischt und erneut bei 10000 Upm für 5 min zentrifugiert. Die gesäuberte, wässrige Phase wird abpipettiert, mit 1/10 - Volumen 3 M Natriumacetat sowie dem 2-fachen Volumen Ethanol präzipitiert bei 10000 Upm für 15 min. Anschließend wird das Pellet 2 Mal in 70%igem Ethanol gewaschen, Luft - getrocknet und in 45 µl TE (0,1x von Fluka) gelöst. Wieder ist eine Lagerung bei 4 °C über Nacht wichtig.

Die so gewonnene virale DNA rekombinanter Baculoviren wurde mittels PCR auf den korrekten Einbau der variablen Region über homologe Rekombination überprüft. Dabei wurden vektorständige Primer für Schwerkette und Leichtkette benutzt und der Ansatz wie in Tabelle 19 pipettiert. An der Größe des PCR-Produktes (15 µl PCR-Produkt + 3 µl 6x LP; 5 µl DNA-Marker) im 1%igen Agarosegel nach 40- minütiger Auftrennung bei 170 Volt konnte erkannt werden, ob das Insert der variablen Region aufgenommen worden war.

**Tabelle 19: PCR-Reaktion zur Insertionskontrolle.**

Komponente	Volumen [50 µl rxt]
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	27,25 µl
Fw Primer (10 µM)	5 µl
Rew Primer (10 µM)	5 µl
Vent Buffer 10x	5 µl
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	3 µl
dNTP (20 mM)	2 µl
Vent DNA Polymerase	0,75 µl
Viral DNA	2 µl

Unsere Kooperationspartner haben die virale DNA rekombinanter Baculoviren ebenfalls mit dem Southern Blot auf den Einbau des Inserts mit der variablen Region überprüft. Dabei wurde die virale DNA einem spezifischen Verdau unterzogen und dieses Muster an Fragmenten im Agarosegel aufgetragen. Jetzt konnte der Verdau verifiziert und quantifiziert werden. Nach dem Blotten auf eine Membran wurden die DNA-Doppelstränge alkalisch aufgespalten und mit einer spezifischen Sequenz als DNA-Sonde hybridisiert, dessen spezifische Bindung mittels Enzym-markiertem Antikörper sichtbar gemacht wurde, sodass erkennbar wurde ob das Insert im richtigen Fragment lag.

Auch die Aufreinigung der rIgGs im großen Maßstab wurde von den französischen Kooperationspartnern durchgeführt. Für die Produktion großer Mengen an viralem Überstand musste die Zellkultur weiter angepasst werden. Die viralen Zellkulturüberstände mussten 2 Mal dialysiert werden, zunächst gegen Tris ethylenediaminetetraacetic acid buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid) um den pH auf 7,8 anzuheben und anschließend in PBS (pH 7,8) wie unter (Lieby et al., 2001) beschrieben wurde. Die Affinitätschromatographie ist eine Säulenchromatographie, bei der mittels kovalent gebundenem Protein A in der Säulenmatrix selektiv über den Fc-Teil humane IgG gebunden werden können. Auf diese Weise konnten störende Substanzen gut rausgewaschen werden. Die gebundenen IgGs wurden durch denaturierende Bedingungen in kleinen Volumina eluiert, was den Vorteil einer hohen Aufkonzentrierung hat.

Dazu wurden Protein A Säulen von Bio Rad (Hercules, CA) entsprechend des Herstellerprotokolls benutzt. Die Eluate wurden gegen PBS oder TBS (TBS; 50 mM Tris buffer, 120 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.5) dialysiert und mit einem Filter der Porengröße 0,1 mm filtriert, bevor die Reinheit im Gel und direktem IgG ELISA quantifiziert wurde (Lieby et al., 2001).

#### **5.1.11 IgG1 ELISA**

Um die korrekte Klonierung und Expression der rIg vor Amplifizierung und Aufreinigung zu überprüfen, wurde der IgG1 HC ELISA (EHIGG1 von Thermo Scientific) mit viralen Überständen durchgeführt. Dabei wurde als Kontrolle und zur Anpassung der Baseline das TGV3 – Medium, Probenpuffer und eine leere Vertiefung mitgemessen. Die viralen Überstände wurden unverdünnt, 1:50, 1:100 und 1:200 verdünnt in Doppel- und teilweise Einzelbestimmung getestet. Bei der Konzentrationsüberprüfung aufgereinigter viraler Überstände (Protein A Säule, Kooperationspartner) wurden Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 gemessen. Der Detektionsantikörper des direkten ELISA targetierte human exprimiertes IGHV und trug eine Biotinylierung, über welche HRP markiertes Streptavidin

gebunden wurde. Die Umsetzung des TMB-Substrates wurde im iMark Microplate Reader quantifiziert.

## **5.2 Spezifitätstestung rekombinanter IgG aus gewebständigen B Zellen bei der GPA**

### **5.2.1 PR3-ANCA ELISA**

Die rekombinanten Antikörper wurden mit einem direkten PR3-ANCA ELISA (Anti-PR3-hn-hr-ELISA, Euroimmun) auf die Erkennung des Hauptautoantigens (humane Proteinase3) geprüft. Dabei sind die Vertiefungen der Testplatte mit einem Gemisch aus nativer humaner PR3 und rekombinanter humaner PR3 beschichtet. Als Detektionsantikörper fungiert hier ein Peroxidase - gekoppelter Anti-Human-IgG Antikörper aus dem Kaninchen. Quantifiziert wird die Anwesenheit der Peroxidase über die Spaltung von TMB im iMark Microplate Reader. Doppelbestimmungen wurden immer gemessen. Drei Kalibrationsseren, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle dienten der internen Testkontrolle. Zur Kontrolle der nötigen Konzentration an PR3-ANCA wurde ein kommerzieller PR3-ANCA (12.8) in verschiedenen Verdünnungen (0,3 µg/ml, 1 µg/ml und 2 µg/ml) mitgemessen. Als weitere Validierung des Testsystems wurden aufgereinigte IgGs aus PR3-ANCA positiven Seren (Verdünnung 1:2, laborinterne Vorarbeiten per FPLC) gemessen. Als Kontrolle und zur Bestimmung der Baseline wurde das entsprechende Lösungsmittel und eine leere Vertiefung mitanalysiert. Virale Überstände wurden unverdünnt und 1:2 verdünnt gemessen. Aufgereinigte rIgGs wurden auf 7-12 µg/ml verdünnt. Die Messung aufgereinigter rIgGs wurde wiederholt mit einem Zusatz von 0,05 % Tween in Proben- und Waschpuffer.

### **5.2.2 Humaner Proteom Mikroarray**

Die Firma Cambridge Protein Arrays führte mit dem humanen Proteom Mikroarray HuProt V3.1 eine Spezifitätsanalyse der sechs rIgGs in gepoolter Form (15 µg/ml  $\pm$  6 Mal 2,5 µg/ml) durch. Im Folgenden wird die beschriebene Methodik aus dem erhaltenen Studienbericht vorgestellt.

Die N-terminale GST-Markierung dient der Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine aus Hefezellen. Das Aufbringen der Proteine in Doppelbestimmung zusammen mit Kontrollproteinen wie GST, IgG und BSA auf Glasträger erhöht die Testsicherheit. Die negative Sekundärkontrolle stellte ein Array ohne Probe dar, die Positivkontrolle war eine anti-GST Färbung. Beide wurden parallel zum Proben-Array mitgeführt. Als Proben- und Blockierungspuffer wurde PBS mit 2 % BSA und 0,05 % Tween verwendet. Zum Waschen diente PBS mit 0,05 % Tween. Der Sekundärantikörper anti-IgG (H+L) Alexa 546 wurde benutzt und als Positivkontrolle ein anti-GST-650 Antikörper. Nach der Detektion wurde der

Arrays an Hand von Kontrollproteinen und GST-gefärbten Punkten mit einer Software akkurat über die beiden Kontrollarrays gelegt. Für die Datenanalyse wurden zunächst die Fluoreszenzsignale der Sekundärkontrolle von den Fluoreszenzsignalen des Proben-Arrays abgezogen. Aus der Doppelbestimmung wurden Standardabweichung und Mittelwert bestimmt, der für die Auswertung  $\log_2$  transformiert wurde, wenn die Standardabweichung  $< 0,35$  und das Signal zu Rausch-Verhältnis  $> 2,5$  waren.

Zur Bewertung der Probensignale wurde der z-Score berechnet:

$$z = (\log_2(F_{\text{Protein}}) - \text{Durchschnitt } \log_2) / SD \log_2$$

$\log_2(F_{\text{Protein}})$  =  $\log_2$  transformiertes Fluoreszenzsignal eines spezifischen Proteins

Durchschnitt  $\log_2$  = Mittelwert aller  $\log_2(F_{\text{Protein}})$  Werte aller Proteinspots des Arrays (ohne die Kontrollproteine)

$SD \log_2$  = Standardabweichung aller Proteinspots des Arrays (ohne die Kontrollproteine)

Der z-Score gibt in der Einheit der Standardabweichung an, wie weit ein einzelner Wert von Mittelwert der Verteilung abweicht. Geht man von einer Normalverteilung von Fluoreszenzsignalen eines Arrays mit 23800 Proteinen, liegt die zufällige Wahrscheinlichkeit einen z-Score  $> 3,75$  für ein spezifisches Protein zu finden bei  $< 0,01$  %. Daher werden in den Ergebnissen nur spezifische Proteine mit einem z-Score  $> 3,75$  aufgeführt.

Alternativ kann zur Bewertung der Probensignale der i-Score herangezogen werden:

$$i = (F_{\text{Protein}} / F_{\text{GST Protein}}) * 10$$

$F_{\text{GST Protein}}$  = Fluoreszenzsignal aus der entsprechenden GST – Färbung des spezifischen Proteins

Der i-Score gibt die aus der Bindung eines Proteins resultierende Signalstärke in Relation zur immobilisierten Menge an Protein an. Bei einer starken GST-Färbung kann auch ein klar detektierbarer Probenpunkt einen niedrigen i-Score haben

### 5.3 Analyse von IgHV & IgLV Genen

#### 5.3.1 Meta-Analyse des Immunglobulingenrepertoires

Die vorgestellten Datenkohorten (Tab. 20) wurden mit highIMGT/V-QUEST analysiert. Eine Masterarbeit (Ohlei, 2016) einer Mathematikstudentin wurde begleitet, in der R-Algorithmen generiert worden sind, mit denen nachfolgend das klonale Immunglobulingenrepertoire analysiert wurde. Dabei ging es um Frequenzen von Nukleotidmutationen und Austauschmutationen, Transitionen/Transversionen, HotSpot Motive und die kombinierte Gen-Benutzung in Form von Heat-Maps. Zusätzlich wurden auf Grund der unterschiedlichen Datenstruktur komplexe statistische Methoden von PD Dr. Andreas Recke in Form von R-Programmen angewendet, um eine qualifizierte statistische Aussage

treffen zu können. Der Beitrag von Gesche Weppner lag in der interdisziplinären Kommunikation, Beratung der biologischen Relevanz und Interpretation der Daten.

**Tabelle 20: Überblick der analysierten Datenkohorten; Zuordnung der Funktionalität nach IMGT/V-QUEST (Brochet et al., 2008a).**

Berechnung der Klone von Olena Ohlei mit der Funktion Clones aus dem R-Paket bcRep (R Cran, (Bischof und Ibrahim, 2016))

Kohorte	Organ	Gen	Spender	Sequenzen	Klone	Referenz
gesund	Blut	Prod. IGHV	15	2.050.098	244.353	freundlicherweise bereitgestellt von Prof. S. Ibrahim LIED (Recke et al., 2016)
gesund	Blut	Unprod. IGHV	15	439.433		
gesund	Blut & Knochenmark	Prod. IGLV	5	189	148	(Abraham et al., 2007)
gesund	Blut & Knochenmark	Unprod. IGLV	5	23		
gesund	Darmmukosa	Prod. IGHV	8	29	28	(Boursier et al., 1999)
gesund	Darmmukosa	Unprod. IGHV	8	1		
GPA	Nasenmukosa, Lunge	Prod. IGHV	15	253	231	(Voswinkel et al., 2006)
GPA	Nasenmukosa, Lunge	Unprod. IGHV	6	20		(Müller et al., 2014; Voswinkel et al., 2006, 2008a)
GPA	Nasenmukosa	Prod. IGLV	7	18	18	(Müller et al., 2014; Voswinkel et al., 2008a)
GPA	Nasenmukosa	Unprod. IGLV	2	3		

### 5.3.1.1 Generierung klonaler Sequenzen

Um einzelne, unabhängige Klone zu analysieren wurden die Datensätze mit der Funktion Clones aus dem R-Paket bcRep (R Cran, (Bischof und Ibrahim, 2016)) und der Funktion CollapseClones aus dem R Paket shazam (R Cran Version 0.1.6, (Gupta et al., 2015)) bearbeitet. Dabei wurden Sequenzen als Klon zusammengefasst, welche eine gleich lange CDR3-Region aufwiesen, die zumindestens zu 85 % in der Aminosäureabfolge übereinstimmten und aus den gleichen V und J Gensegmenten zusammengesetzt worden waren. CollapseClones kreierte aus einer Gruppe klonaler Sequenzen eine Konsensussequenz mit gleich langer, dazugehöriger Keimbahngensequenz. Dabei wurden für jede Stelle der Konsensussequenz zunächst die Frequenzen der vier möglichen Basen anhand der Sequenzen eines Klons erfasst und dann die wahrscheinlichste ausgewählt oder eine zufällige, falls es keine wahrscheinlichste gab.

### 5.3.1.2 Diversitätsbestimmung mehrdimensionaler Datensätze

Um die Diversität mehrdimensionaler Datensätzen zu bestimmen, kann die Methode der multidimensionalen Skalierung benutzt werden (PD Dr. Andreas Recke, persönliche Kommunikation), bei der jeder Proband eines Datensatzes in Form eines Vektors aus

mehreren Variablen im mehrdimensionalen Raum konfiguriert wird. Die Variablen stellen die Anzahlen klonaler Sequenzen (IgHV Subfamilien, IgHJ -Familien und IgHV-IgHJ Kombinationen) eines Probanden dar. Der Permutationstest ist mit der R-Funktion ADONIS aus dem R-Paket VEGAN (R Cran Version 2.4-6; (Anderson, 2001)) von PD Dr. Andreas Recke berechnet worden.

Wenn die Frequenz der Variablen beider Datensätze A und B als ungleich angenommen wird, kann zur Unähnlichkeitsbestimmung die Jaccard-Distanz benutzt werden (Bandyopadhyay und Saha, 2013):

$$d = 1 - \left| \frac{A \cap B}{A \cup B} \right|$$

Um Verteilungsunterschiede multivarianter Daten zu bestimmen, sollten die Effekte individueller Faktoren und ihre Interaktionen im Experiment berücksichtigt werden. Dabei wird angenommen, dass diese Faktoren nicht normalverteilt sind und voneinander abhängen können. Grundsätzlich wird das Konzept des nicht parametrischen ANOVA in einen Permutationstest abgewandelt, wobei Unterschiede innerhalb einer Gruppe unter Verwendung der Distanzmatrizen mit jenen einer anderen Gruppe anhand von pseudo F-Werten verglichen werden. Auf diese Weise entstehen mit einem multivarianten, analogen Fisher's Test permutierte P-Werte (Anderson, 2001).

Der Permutationstest wurde 1935 von Fisher entworfen. Er postulierte, dass keine Normalverteilung vorausgesetzt werden muss, um zu bestimmen, ob die Mittelwerte eines Parameters mit und ohne Permutation voneinander abweichen (Fisher, 1935). Die Nullhypothese und Annahmen über die Auswechselbarkeit bestimmen die Permutationsstrategie. Dabei wird angenommen, dass sich die Mittelwerte vor und nach Permutation nicht unterscheiden, sodass der Fehler der Auswechselbarkeit irrelevant wird (Winkler et al., 2014).

Wenn Verteilungsunterschiede eines Parameters mit einem Permutationstest analysiert werden, sollte auf die im Folgenden beschriebene Weise geprüft werden, ob die Berücksichtigung individueller Faktoren die Daten besser beschreibt (PD Dr. Andreas Recke, persönliche Kommunikation). Es können verschiedene Modelle (LREM= linear random effects models) simuliert werden: Modell 1 beschreibt eine zufällige Verteilung des zu untersuchenden Parameters, Modell 2 beschreibt Modell 1 zusammen mit individuellen Faktoren. Beide Modelle werden auf eine unterschiedliche Wahrscheinlichkeits-Verteilung unter einem Signifikanzniveau von 5 % überprüft. Zusätzlich wird die Qualität der Modelle mit dem Akaike Informationskriterium (AIC) bewertet. Wenn der AIC von Modell 2 kleiner ist als der AIC von Modell 1, ist Modell 2 besser. Dabei wird untersucht wie stark der zu untersuchende Parameter mit und ohne Berücksichtigung individueller Faktoren streut. Der

AIC Wert verkleinert sich, wenn sich der Fehler der Voraussage des Modells verkleinert (Olofsen und Dahan, 2013).

### **5.3.1.3 Frequenzbestimmung der IgHV Gene**

Die relative Frequenz an IgHV Subfamilien produktiver, klonaler IgHV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien bei der GPA und Blutproben von gesunden Probanden wurde mit der Funktion GeneUsage aus dem R-Paket bcRep (R Cran, (Bischof und Ibrahim, 2016)) von Olena Ohlei berechnet.

### **5.3.1.4 Verteilungsunterschiede der IgHV und IgHJ Genfrequenz**

Um Verteilungsunterschiede in der IgHV und IgHJ Genfrequenz verschiedener Datensätze zu untersuchen, kann ein ungerichtetes, gemischtes Kugelmodell basierend auf Textmining Algorithmen verwendet werden (PD Dr. Andreas Recke, persönliche Kommunikation). Zur Berechnung wurde das R-Paket (movMF) von PD Dr. Andreas Recke benutzt [Version 0.2.2 R Cran; (Banerjee et al., 2005)]. Bei diesem Kugelmodell werden die Daten (Genfrequenzen) nach dem Prinzip der maximalen Erwartungs-Wahrscheinlichkeit normalisiert. Die Dokumente (Probanden) werden als Punkte auf einer mehrdimensionalen kugeligen Abbildung modelliert, wobei der Abstand der einzelnen Parameter (Subfamiliengene) in Form von Vektoren mit der Cosinus-Distanz berechnet wird. Desweiteren wird die Präsenz, Abwesenheit und Frequenz einzelner Wörter (Subfamiliengene) einer laut Cosinus Distanz inhaltlich zusammenhängenden Bücherrubrik (Gruppe an Probanden mit ähnlicher Subfamiliengen-Frequenz) auf Unterschiede gewichtet. Dessen Wahrscheinlichkeit wird mit der von Mises-Fisher Verteilung untersucht (Banerjee et al., 2005; Reisinger et al., 2010).

### **5.3.1.5 Erstellung der Heatmaps IgHJ/IgHV und IgHD/IgHV**

Um die Häufigkeit und Verteilung von IgHJ/IgHV oder IgHD/IgHV Gen-Gen-Kombinationen zu berechnen, wurde die Summe vorkommender Kombinationen jeder möglichen Gen-Gen-Kombination gebildet und durch die Summe aller vorkommenden Kombinationen der entsprechenden Gruppe geteilt. Dazu wurden die Funktion sequences.geneComb aus dem R-Paket bcRep (R Cran, (Bischof und Ibrahim, 2016)) von Olena Ohlei verwendet.

### **5.3.1.6 Ermittlung von Aminosäuren-Längenunterschieden der CDR3-Region**

Die Verteilungsunterschiede in der Aminosäurenlänge der CDR3-Region wurden mit und IgHJ Anteil an Hand eines Permutationstestes analysiert, wobei hier außer der Gruppenzugehörigkeit keine weiteren individuellen Faktoren berücksichtigt wurden.

Der durchschnittliche Beitrag des IgHJ Gens zur CDR3 Region wie folgt berechnet:

$$(N_1 \times J_1 + N_2 \times J_2 + \dots + N_6 \times J_6) / (N_1 + N_1 + \dots + N_6)$$

Wobei N die Anzahl klonaler Sequenzen ist und J die Anzahl an Aminosäuren für jede der 6 IgHJ Familien (entsprechend 6,6,5,4,5,9 Aminosäuren). Dieser Wert wurde von der Gesamtlänge der CDR3-Region abgezogen. Die Berechnungen wurden von PD Dr. Andreas Recke mit dem R-Paket perm (Version 1.0 – 0.0 R Cran, (Fay und Shaw, 2010)) und der Funktion permTS durchgeführt.

### 5.3.1.7 Berechnung von Mutationsfrequenzen (Transversion, Transition, Nukleotide)

Der relative Anteil von Nukleotid-, Transitions- oder Transversionsmutationen an allen Mutationen wurde mit der Funktion basen\_mutation aus dem R-Paket BCellMA (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016)) von Olena Ohlei analog zu (Zuckerman et al., 2010) berechnet. Mögliche Unterschiede bzw. Unabhängigkeiten einer Mutationsart zwischen HC und GPA wurden in Form absoluter Werte mit Pearsons  $\chi^2$  Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % untersucht. Bei  $n \leq 10$  wurde die Korrektur nach Yates durchgeführt. Zusätzlich wurden der adjustierte Kontingenzkoeffizient und das Odds Ratio berechnet. Das frei verfügbare online-Programm wurde benutzt<sup>10</sup>.

Das Odds Ratio und der adjustierte Kontingenzkoeffizient können berechnet werden, um die Richtung und den Zusammenhang des Effektes beurteilen zu können. Dabei kann das Odds Ratio Werte zwischen 0 und  $\infty$  annehmen, wobei ein Wert von 1 keinen Unterschied in der Richtung des Effektes anzeigt. Der adjustierte Kontingenzkoeffizient kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei 0 keinen Zusammenhang und 1 einen großen Zusammenhang anzeigt (Gehring und Weins, 2009)<sup>11</sup>.

### 5.3.1.8 Analyse der Hot Spot Motive von Mutationen

Die Umgebung der vier möglichen Punktmutationen einer DNA-Sequenz wurde in Form einer Hot Spot Analyse untersucht, wie bei (Zuckerman et al., 2010) beschrieben. Dazu wurden IgHV und IgLV Gene aus GPA Patienten und gesunden Probanden mit ihrem jeweiligen Keimbahngen (laut IMGT/V-QUEST) übereinandergelegt. Mit der relativen Frequenz in IgHV/IgLV (SFM) und Keimbahngen (SFG) eines Nukleotides B („A“, „T“, „C“

---

<sup>10</sup> Interactive Statistical Pages project (ohne Jahr)  
JavaStat -- 2-way Contingency Table Analysis  
<http://statpages.info/ctab2x2.html>  
(Stand: 12.06.2018)

<sup>11</sup> Anja Hall (2007)  
Kreuztabellenanalyse – Zusammenhangsmaße (siehe Folie 7)  
[https://www.bibb.de/dokumente/pdf/a22-lehre-ws0708\\_hall.pdf](https://www.bibb.de/dokumente/pdf/a22-lehre-ws0708_hall.pdf)  
(Stand: 12.06.2018)

oder „G“) an einer definierten Position  $i$  drei Basen vor oder nach der Mutation wurde die Substitutionsfrequenz als  $d(\%)$  bestimmt:

$$SF_B^i = \frac{n_B^i}{n_A^i + n_T^i + n_C^i + n_G^i}$$

$$d(\%) = (SFM_B^i - SFG_B^i)100\%$$

Die in der Vignette beschriebenen Funktionen wurden aus dem R-Paket BCellMa (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016)) von Olena Ohlei benutzt.

### 5.3.1.9 Darstellung von Substitutionen in der CDR3 Region von IgHV und IgLV Genen

Die durchschnittliche Frequenz eines Aminosäure-Austausches wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$F_i(AA_i > AA_j) = \frac{1}{n} \sum_{k=0}^n \frac{M_{i,k}(AA_i > AA_j)}{\sum_{l=0}^{380} M_{l,k}(AA_i > AA_j)}, i \neq j, i = 1, 2, \dots, 20, j = 1, 2, \dots, 19$$

Dabei stellte  $k=1,2,\dots,n$  jedes Ig Gen einer Gruppe dar und  $M_{i,k}$  die Nummer möglicher Substitutionen (von 20 bestehenden ( $i$ ) zu 20 resultierenden ( $j$ )) mit  $l=1,2,\dots,380$  in der CDR3 Region der Sequenz  $k$ . Die Anzahl eines spezifischen Aminosäure-Austausches mit der Nummer  $M_{i,k}$  wurde dividiert durch die Summe aller Substitutionen  $M_{l,k}(AA_i > AA_j)$  in der CDR3 Region der Sequenz  $k$ , sodass ein relativer Wert entstand, der auf die Länge der CDR3 Region einer Sequenz normalisiert war. Um Unterschiede in der Anzahl an Sequenzen einer Gruppe zu adjustieren, wurde die relative Frequenz einer spezifischen Substitution pro CDR3-Region einer Sequenz aufsummiert und durch die Anzahl an Sequenzen dividiert. Die Veränderung der Aminosäure in Bezug auf physikochemische Eigenschaften laut IMGT/V-QUEST wurde durch die Einteilung in vier Klassen ausgedrückt. Die nötigen Funktionen sind in dem R-Paket BCellMa (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016)) implementiert und wurden analog zu der beschriebenen Methodik bei (Zuckerman et al., 2010) von Olena Ohlei berechnet.

### 5.3.2 Quantifizierung der Selektionsstärke von Mutationen

Um die Selektionsstärke von Mutationen zu quantifizieren wurde der Baseline-Algorithmus Version 1.3 (Yaari et al., 2012, 2013) benutzt. Er wurde in der Arbeitsgruppe von S. Kleinstein entwickelt und wird im Folgenden beschrieben. Unter positiver Selektion versteht man eine Erhöhung der Anzahl an Austauschmutationen in einer Region von IgHV/IgLV Genen in Folge eines Anpassungsprozesses an ein Antigen. Negative Selektion meint eine

Senkung der Anzahl an Austauschmutationen bzw. eine Erhöhung an stillen Mutationen. Zunächst wird die mutierte Sequenz mit dem korrespondierenden Keimbahngen übereinandergelegt und die Anzahl an stillen Mutationen und Austauschmutationen in den CDR und FWR Regionen anhand einer Formel bestimmt (Uduman et al., 2011). Nach dem Bayeschen Prinzip wird die erwartete Wahrscheinlichkeit für signifikante Unterschiede in der Anzahl an Austauschmutationen bestimmt unter der Nullhypothese, dass keine Selektion stattfindet. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation als zentrale Base in einem 5er Motiv in ihrer Frequenz im unmutierten Keimbahngen berücksichtigt. Mit der Normalisierung auf die Anzahl an Sequenzen einer Gruppe und die Länge der Keimbahngene kann die Selektion einer Gruppe unabhängiger Sequenzen detektiert werden. Quantifiziert werden kann die Selektion einer Gruppe von Sequenzen, indem der Logarithmus des Odds Ratio aus beobachteter und erwarteter Wahrscheinlichkeiten in eine Wahrscheinlichkeitsfunktion mit Hilfe des totalen Differentials partieller Ableitungen transformiert wird. Anhand der Fläche unter der Wahrscheinlichkeitsfunktion kann der P-Wert zur Nullhypothese bestimmt werden. Für den P-Wert aus dem quantitativen Vergleich zweier Gruppen muss die numerische Integration verwendet werden. Eine weitere integrierte Option des Baseline-Algorithmus ermöglicht die Berücksichtigung klonaler Sequenzen in Form zugeordneter klonaler Sequenzvarianten zu ihrem Keimbahngen (Yaari et al., 2012, 2013).

### 5.3.3 Sequenzierung monoklonaler anti-hPR3 Antikörper aus Maushybridomzellen

Drei murine Hybridomzellkulturlinien (WGM1, WGM2, WGM3) wurden in RPMI mit 20 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kulturüberstände, welche die monoklonalen Antikörper enthielten, wurden mit dem PR3-ANCA ELISA (orgentec) positiv getestet. Diese Zellkulturen wurden freundlicherweise von der Klinik für Rheumatologie und Immunologie in Bad Bramstedt (Braun et al., 1996; Csernok et al., 1990) bereitgestellt. Geerntet wurden die murinen Hybridomzellen mit dem Zellschaber und anschließender Zentrifugation bei 1000 Upm für 10 min. Die Zellen wurden in 2,5 ml RPMI gelöst. Von dieser Zellsuspension wurden 20 µl mit 10 µl Trypanblau zur Vitalfärbung vorsichtig vermischt und 10 µl gefärbte Zellsuspension in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Unter Verwendung folgender Formel wurde die Zellzahl bestimmt:

$$\text{MW Einzelquadrat} \times 2 \times 10000 = \text{Zellen/ml}$$

Für die RNA-Isolation wurden etwa 10<sup>6</sup> Zellen nach Zentrifugation des entsprechenden Volumens bei 1000 Upm für 10 min in 350 µl RA1 Lysepuffer (Nucleo Spin RNA Kit, Macherey und Nagel) mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol zur Denaturierung der Nukleasen gelöst

und ggf. bei -80 °C zwischengelagert. Die RNA wurde entsprechend des Herstellerprotokolls per Silicasäule isoliert und in 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst.

Für das weitere Vorgehen wurde die beschriebene Technik zur Generierung einer sogenannten „humanen antibody-phage-library“ in (Hammers et al., 2015) abgewandelt. Die c-DNA Synthese wurde mit 2,5 µg totaler RNA unter Verwendung des Superscript IV VILO Mastermixes (Invitrogen) hergestellt, da die enthaltene Transkriptase zusammen mit Helferproteinen laut Hersteller besonders effektiv und akkurat trotz der Anwesenheit von Störfaktoren (z. B. Salze, Alkoholreste) die RNA targetieren würde. Als Primer dienten sogenannte oligo (dT)<sub>18</sub> und random hexamer Nukleotidmoleküle.

Die anschließende Multiplex PCR zur Amplifikation der IgHV und IgLV Gene wurde aus dem Protokoll 9.5 „Mouse scFv Libraries“ abgeleitet (Barbas et al., 2001). Bei der Multiplex – PCR war es wichtig sehr sauber und auf Eis zu arbeiten. Die PCR-Reaktionen wurden entsprechend Tabelle 22 und 23 zusammengestellt und nach dem Programm aus Tabelle 24 im Thermocycler T3 amplifiziert.

**Tabelle 21: Mastermix Murine Multiplex PCR IgHV.**

Komponente	Volumen [100 µl rxt]	4xMM (WGM1-3 & NK)
<b>Schwerketten Primermix (forwärts)</b>	60 pmol	
4x MSCVH1 (stock1:20→5pmol/µl)	4,537 pmol 0,907 µl	3,63 µl
4x MSCVH2 (stock1:20→5pmol/µl)	4,537 pmol 0,907 µl	3,63 µl
3x MSCVH3 (stock1:20→5pmol/µl)	3,403 pmol 0,681 µl	2,72 µl
4x MSCVH4 (stock1:20→5pmol/µl)	4,537 pmol 0,907 µl	3,63 µl
7x MSCVH5 (stock1:20→5pmol/µl)	7,940 pmol 1,588 µl	6,35 µl
2x MSCVH6 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
1x MSCVH7 (stock1:20→5pmol/µl)	1,134 pmol 0,227 µl	0,91 µl
2x MSCVH8 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
5x MSCVH9 (stock1:20→5pmol/µl)	5,671 pmol 1,134 µl	4,54 µl
2x MSCVH10 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
2x MSCVH11 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
2x MSCVH12 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
1x MSCVH13 (stock1:20→5pmol/µl)	1,134 pmol 0,227 µl	0,91 µl
2x MSCVH14 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
2x MSCVH15 (stock1:20→5pmol/µl)	2,268 pmol 0,454 µl	1,81 µl
5x MSCVH16 (stock1:20→5pmol/µl)	5,671 pmol 1,134 µl	4,54 µl
3,5x MSCVH17 (stock1:20→5pmol/µl)	3,970 pmol 0,794 µl	3,18 µl
0,7x MSCVH18 (stock1:20→5pmol/µl)	0,794 pmol 0,159 µl	0,64 µl
0,7x MSCVH19 (stock1:20→5pmol/µl)	0,794 pmol 0,159 µl	0,64 µl
<b>Schwerketten Primermix (rückwärts)</b>	60 pmol	
3x MSCG1ab-B (stock1:20→5pmol/µl)	36 pmol 7,2 µl	28,8 µl
1x MSCG3-B (stock1:20→5pmol/µl)	12 pmol 2,4 µl	9,6 µl
1x MSCM-B (stock1:20→5pmol/µl)	12 pmol 2,4 µl	9,6 µl

Komponente	Volumen [100 µl rxt]	4xMM (WGM1-3 & NK)
10x PCR buffer	10 µl	40 µl
10 mM dNTP mix	2 µl	8 µl
0,5 µl Ampli Taq DNA Polymerase	(0,5 µl)	0 µl
water	59,5 µl	238 µl
cDNA	4 µl	je 4 µl

Tabelle 22: Mastermix Murine Multiplex PCR IgkV.

Komponente	Volumen [100 µl rxt]	4xMM (WGM1-3 & NK)
<b>κ-Leichtketten Primermix (forwärts)</b>	60 pmol	
1x MSCVK1 (stock1:20→5pmol/µl)	0,945 pmol 0,189 µl	0,76 µl
2x MSCVK2 (stock1:20→5pmol/µl)	1,890 pmol 0,378 µl	1,51 µl
5x MSCVK3 (stock1:20→5pmol/µl)	4,724 pmol 0,945 µl	3,78 µl
3,5x MSCVK4 (stock1:20→5pmol/µl)	3,307 pmol 0,661 µl	2,65 µl
4x MSCVK5 (stock1:20→5pmol/µl)	3,780 pmol 0,756 µl	3,02 µl
7x MSCVK6 (stock1:20→5pmol/µl)	6,614 pmol 1,323 µl	5,29 µl
6x MSCVK7 (stock1:20→5pmol/µl)	5,670 pmol 1,134 µl	4,54 µl
1,5x MSCVK8 (stock1:20→5pmol/µl)	1,417 pmol 0,283 µl	1,13 µl
2x MSCVK9 (stock1:20→5pmol/µl)	1,890 pmol 0,378 µl	1,51 µl
3,5x MSCVK10 (stock1:20→5pmol/µl)	3,307 pmol 0,661 µl	2,65 µl
8x MSCVK11 (stock1:20→5pmol/µl)	7,559 pmol 1,512 µl	6,05 µl
8x MSCVK12 (stock1:20→5pmol/µl)	7,559 pmol 1,512 µl	6,05 µl
6x MSCVK13 (stock1:20→5pmol/µl)	5,670 pmol 1,134 µl	4,54 µl
2x MSCVK14 (stock1:20→5pmol/µl)	1,890 pmol 0,378 µl	1,51 µl
2x MSCVK15 (stock1:20→5pmol/µl)	1,890 pmol 0,378 µl	1,51 µl
1x MSCVK16 (stock1:20→5pmol/µl)	0,945 pmol 0,189 µl	0,76 µl
1x MSCVK17 (stock1:20→5pmol/µl)	0,945 pmol 0,189 µl	0,76 µl
<b>κ-Leichtketten Primermix (rückwärts)</b>	60 pmol	
2x MSCJK12B (stock1:20→5pmol/µl)	30 pmol 6 µl	24 µl
1x MSCJK4B (stock1:20→5pmol/µl)	15 pmol 3 µl	12 µl
1x MSCJK5B (stock1:20→5pmol/µl)	15 pmol 3 µl	12 µl
<b>10x PCR buffer</b>	10 µl	40 µl
<b>10 mM dNTP mix</b>	2 µl	8 µl
<b>0,5 µl Ampi Taq DNA Polymerase</b>	(0,5 µl)	0 µl
<b>Wasser</b>	59,5 µl	238 µl

Komponente	Volumen [100 µl rxt]	4xMM (WGM1-3 & NK)
cDNA	4 µl	je 4 µl

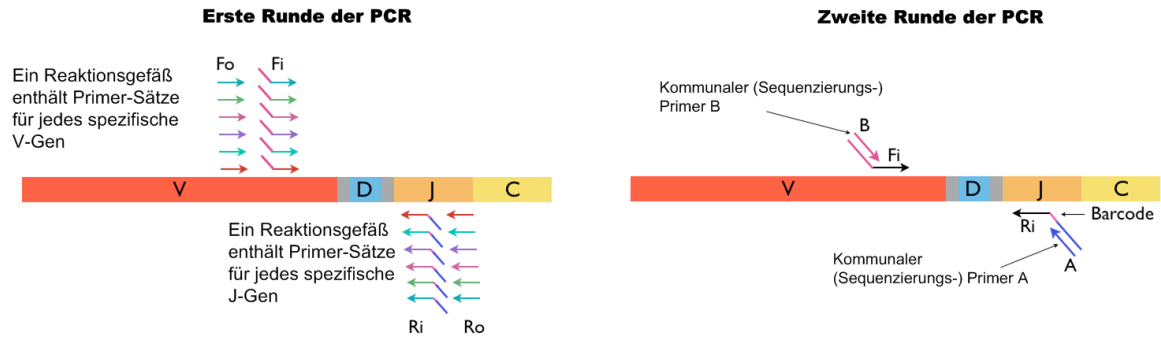
Tabelle 23: Zyklusbedingungen für die Murine Multiplex PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
94 °C	15 sec	1x
56 °C	Pause (0,5 µl Taq-Polymerase /rxt)	
72 °C	1 min 30 sec	1x
94 °C	15 sec	40x
56 °C	30 sec	
72 °C	1 min 30 sec	
72 °C	7 min	1x
4 °C	Pause	

Die entsprechenden 350 bp PCR Produkte wurden wie in Punkt 5.1.5 beschrieben sequenziert.

### 5.3.4 B Zellen – Repertoire aus Blut und Gewebe der Leichtkettengene mittels "next generation sequencing"

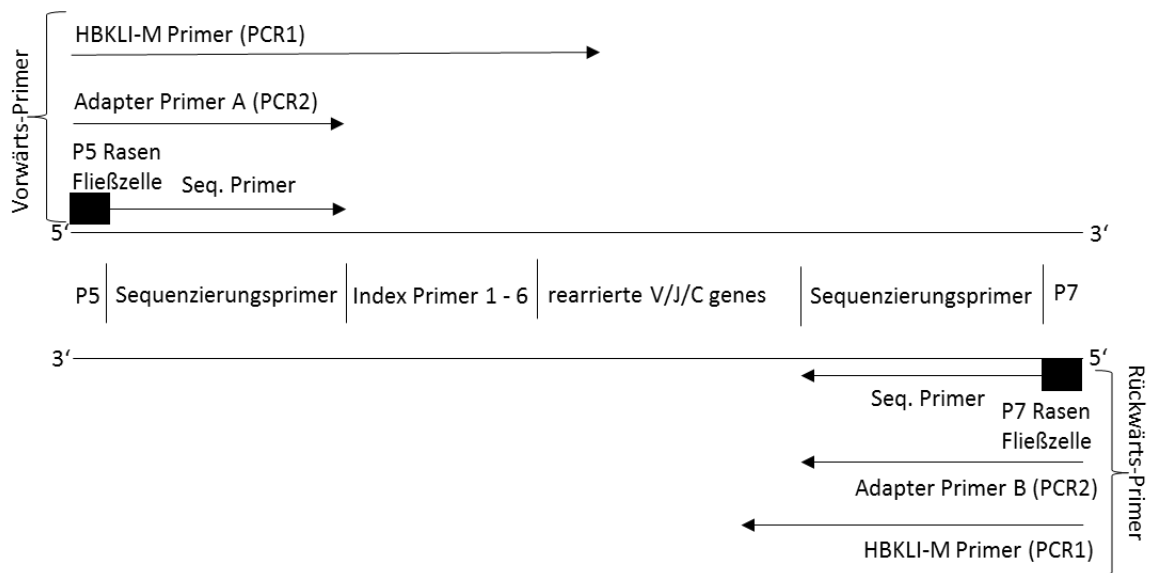
Derzeit werden viele Strategien und Plattformen für die ultra-schnelle DNA-Sequenzierung entwickelt. Eine davon ist die DNA-Polymerase-abhängige Methode der zyklischen, reversiblen Termination (CRT) (Metzker, 2005). Dabei werden DNA-Templates mit wiederholten Zyklen Polymerase-gerichteter Einzelbasenverlängerungen sequenziert. Um den schrittweisen Nukleotideinbau zu gewährleisten wurden vier verschieden markierte reversible Terminatorkleotide benutzt, die von Milton im Jahr 2004 patentiert wurden ((Milton et al., 2004) WO 2004/018497). Nach der Laser-induzierten Aufnahme der emittierten Fluoreszenz des neu eingebauten Nukleotids, wurde dessen Fluoreszenzfarbstoff mit einem Reagenz abgelöst, welches zusätzlich das 3'OH Enden des eingebauten Nukleotides regenerierte. Die Fluoreszenz jedes Molekülcluster auf der Oberfläche der Reaktionskammer bzw. Fließzelle wurde quantifiziert und mit dem Q-Score auf Qualität überprüft. Bei der Sequenzierung mit der zyklisch, reversiblen Terminationsmethode wird zur Amplifikation die Technologie der Arm-PCR ((Han, 2011) Patent Nr. 7,999,092) angewendet (Bentley et al., 2009). Diese wurde zur Erstellung eines B Zell Leichtkettengen Repertoires angewendet (Abb. 11).



**Abbildung 11: Arm-PCR Technologie zur Erstellung eines Immunglobulin-Gen Reperitoires (iR BCR Manual iReperitoire)**

In der ersten PCR werden verschaltete Primer benutzt, welche die IgkV/IgλV Gene (Vorwärts-Primer  $F_o$  und  $F_i$ ) und die IgkC/IgλC Gene (Rückwärts-Primer  $R_o$  und  $R_i$ ) unterschiedlich weit erfassen. Ein weitergefasster Bereich wird voramplifiziert, der dann von weiter innen liegenden Primern ( $F_i$  und  $R_i$ ) weiter vervielfältigt wird. Der innen liegende Primer  $F_i$  enthält eine Indexregion zur Zuordnung von Patientenproben. In der zweiten PCR werden durch die Verwendung von Primern A und B die verschiedenen Leichtkettengene semi-quantitativ amplifiziert, die in eingekürzter Weise den Sequenzierungsprimern entsprechen.

Mittels PCR werden verschiedene Regionen an die Leichtkettengene angefügt, die für die sogenannte paired-end Sequenzierung im MiSeq-Sequenzierapparat (Illumina) nötig sind (Abb. 12).



**Abbildung 12: Übersicht der verschiedenen Primer zur Generierung des Leichtkettengenreperitoires.**

Die Primer der Arm-PCR 1 (Vorwärts-Primer:  $F_o$  &  $F_i$ ; Rückwärts-Primer:  $R_o$  &  $R_i$ ) und -PCR2 (Adapter A und B) dienen der Amplifikation von IgLV-Genen. Laut Hersteller der Fließzelle bindet das Konstrukt über die P5 bzw. P7 Regionen an den Rasen der Fließzelle, sodass die Sequenzierung des Leichtkettengens mit dem Sequenzierungsprimer einschließlich der Index-Region für die Probenzuordnung stattfinden kann.

### 5.3.4.1 RNA Isolation (Gewebe & Blut)

Für die Erstellung eines Leichtkettengenreperitoires wurde RNA aus Nasengewebsbiopsien und Blutproben isoliert. Die RNA-Isolation aus Gewebe wurde mit dem Nucleo Spin RNA Kit (Macherey & Nagel) durchgeführt. Das Gewebe wurde mit einer sterilen Pinzette direkt

aus der RNAlater (zur Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 350  $\mu\text{l}$  Lysepuffer RA1 und 3,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol überführt. Mit einer Kanüle des Durchmessers 0,9 mm wurde die Biopsie in dieser Pufferlösung ausgiebig resuspendiert. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurde diese Lösung weiterverarbeitet und zunächst durch einen Filter zentrifugiert, um gröbere Zell und Gewebsreste vorab zu entfernen. Eluiert wurde die RNA in 40  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem  $\text{H}_2\text{O}$ , wobei die gelöste RNA ein zweites Mal durch die Säule zentrifugiert wurde, um die RNA-Konzentration zu erhöhen.

Für die RNA-Isolation aus Vollblut, welches bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert worden war, wurde das Nucleo Spin RNA Blood Midi Kit (Macherey & Nagel) verwendet. Zum Auftauen wurde das Blut etwa 1 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit möglichst gleichem Volumen an Lysepuffer inkubiert. Anschließend wurde es auf dem Rollermischer in möglichst gleichem Volumen an Lysepuffer bewegt bis es endgültig aufgetaut war. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurde weiter fortgefahren und die RNA am Ende in 100  $\mu\text{l}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert, re-eluiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Prinzip dieser Isolation beruhte auf der Bindung denaturierter Nukleinsäure unter hoher Ionenkraft an die Silikamembran, wobei die Grundidee von (Chomczynski und Sacchi, 1987) beschrieben wurde. Die DNA wurde auf der Säule durch Einsatz von DNasen verdaut. Ein Proteinase K Verdauschnitt denaturierte Proteine und erleichterte dessen Entfernung. Auf diese Weise konnte die RNA durch Waschen von störenden Zellbestandteilen gereinigt werden. Die RNA konnte mit Lösungsmitteln niedriger Ionenkraft eluiert werden.

Nach der RNA Isolation wurden die Proben zunächst auf Eis gelagert und die Konzentration am NanoDrop ermittelt. Falls das Volumen für die isolierte Menge an RNA zu groß war, wurden die Proben im Rotationsverdampfer für 15 – 30 min bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 240 g aufkonzentriert.

#### **5.3.4.2 Ein-Schritt RT PCR (PCR1)**

Es wurden iRepertoire primer (HBKLI-M, PCR1) benutzt, um spezifische cDNA herzustellen. Dabei wurde das Qiagen One-Step RT-PCR Kit benutzt. Der Enzyme Mix bestand aus zwei rekombinant hergestellten Reverse Transkriptasen und einer DNA Taq Polymerase. Die Reversen Transkriptasen waren dabei laut Herstellerangaben in der Lage 1 pg bis 2  $\mu\text{g}$  RNA zu prozessieren, wobei die Aktivierung der Hot Start DNA Taq Polymerase bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  gleichzeitig zur Inaktivierung der Reversen Transkriptasen führte, sodass beide Reaktionen getrennt voneinander in einem Ansatz ablaufen konnten.

Für jede Probe eines Patienten wurde die index Nummer des Primermixes notiert, um die Proben vereint sequenzieren zu können und im Nachhinein wieder zuordnen zu können. Da die Reagenzien temperaturempfindlich waren, wurden die PCR-Reaktionen (Tab. 24) auf Eis gehalten bis der Thermocycler T3  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht hatte. Da die Menge an isolierter RNA limitiert war, wurde die maximal mögliche RNA Menge oder 1000  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt

und laut Tabelle 25 vervielfältigt. Eine Kreuzkontamination der verschiedenen index Primer und RNA-Templates über den Mastermix wurde durch räumliche Trennung oder Sterilisationsmaßnahmen verhindert.

**Tabelle 24: Ein-Schritt RT PCR.**

Komponente	Volumen [25 µl rxt]
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	15-y µl
5x Buffer	5 µl
dNTP Mix	1 µl
Enzyme Mix	1 µl
iRepertoire Primers	3 µl
Template (isolated RNA ≤ 1 µg)	Y µl

**Tabelle 25: Zyklusbedingungen der Ein-Schritt RT PCR.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
50 °C	40 min	1x
95 °C	15 min	1x
94 °C	30 sec	15x
63 °C	2 min	
72 °C	30 sec	
94 °C	30 sec	10x
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1x
4 °C	Pause	

### 5.3.4.3 Vervielfältigung von IgLV über Adaptoren (PCR2)

Für die Vervielfältigung der verschiedensten Leichtkettengene in einer Patientenprobe mit den Adapter-Primern (Tab. 26-27) wurde ein vorgefertigter Mastermix (Multiplex Mastermix Qiagen) verwendet. Dieser enthielt HotStarTaq DNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs in einem speziellen Puffer. Um Kreuzkontaminationen der DNA Template über den Mastermix zu verhindern, wurde die DNA in einem separaten Bereich dazugegeben. Bei Patientenproben mit geringer RNA Konzentration wurde die PCR 2 entsprechend häufiger durchgeführt, um genug Material für die Sequenzierung zu erzeugen. Die spezifischen Produkte pro Probe von etwa 475-520 bp wurde im 2 % Agarosegel wie in Punkt 5.1.4.1 beschrieben aufgereinigt und in 10 µl Elutionspuffer eluiert und reeluiert. Zur Orientierung wurde ebenfalls der 10 kbp Marker (10 µl) verwendet.

Tabelle 26: Multiplex PCR.

Komponente	Volumen [25 µl rxt]	Volumen [50 µl rxt]
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	9 µl	18 µl
Multiplex MM	12,5 µl	25 µl
Adapter Primer	2,5 µl	5 µl
Template (PCR1 Produkt)	1 µl	2 µl

Tabelle 27: Zyklusbedingungen der Multiplex PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	15 min	1x
94 °C	30 sec	30x
72 °C	1,5 min	
72 °C	5 min	1x
4 °C	Pause	

### 5.3.4.4 Quantifizierung der DNA

Die exakte Quantifizierung der amplifizierten Leichtkettengene mittels qPCR durfte freundlicherweise anhand eines etablierten Protokolls im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck durchgeführt werden. Das PerfeCTa NGS Quantification Kit (Illumina ROX) wurde verwendet. Zunächst wurden die aufgereinigten Leichtkettengene einer Patientenprobe 1:10, 1:1000 und 1:10000 in 1x Dilutionspuffer (aus 10x mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O) verdünnt. Die letzte Verdünnung (1:1000 oder 1:10000) wurde in Doppelbestimmung mit dem Ansatz aus Tabelle 28 zusammen mit einer Negativkontrolle (kein Template) und 5 Standards im Thermozykler der Anatomie der Universität zu Lübeck (StepOne RealTime PCR System) analysiert (Tab.29).

Tabelle 28: Perfecta NGS qPCR.

Komponente	Volumen [20 µl rxt]
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	5,4 µl
PerfeCta SYBR green Super Mix (2x)	10 µl
vorwärts & rückwärts Sequenzierungsprimer (10 µM each)	0,6 µl
DNA-Probe (1:10000 oder 1:1000) bzw. Standard	4 µl

Tabelle 29: Zyklusbedingungen der Perfecta NGS qPCR.

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	5 min	1x
95 °C	20 sec	35x
60 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Aufnahme Dissoziationskurve		

Die aufgenommenen Daten wurden immer mit denselben, manuell adjustierten Einstellungen für Basislinie (ersten 3 bis 10 Zyklen) und Schwellenwert ( $0,2 \Delta Rn$ ) ausgewertet, um die Vergleichbarkeit aller Proben untereinander zu verbessern. Es wurden automatisch mit der StepOne Software Version 2.3 die Konzentrationen jeder Einzelbestimmung in einer Regressionsgeraden aus den 5 Standards der Konzentrationen 5 pM, 0,5 pM, 0,05 pM, 0,005 pM und 0,001 pM berechnet. Mit folgender Formel wurden die Größenunterschiede des PCR Produktes zum Standard (426 bp) korrigiert.

$$C(nM) = \left( \frac{426bp}{X \text{ bp(Probe im Agarosegel)}} \right) \times \text{Mittelwert}(C_{\text{Probe}}[nM]) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Kontrolle wurde das quantifizierte Produkt (5 µl aus jeder Doppelbestimmung mit 2 µl 6x Ladepuffer) zusammen mit der Negativkontrolle und 6 µl 100 bp Marker im 1,5%igen Agarosegel für 2 h bei 70 Volt aufgetragen. Leider wurden in einigen Proben nicht nur spezifische Produkte (etwa 475-520 bp) beobachtet, sondern besonders deutliche Banden (verkürzte Produkte) auf Höhe von etwa 150 bp.

#### 5.3.4.5 Library Preparation und MiSeq Sequenzierung

Freundlicherweise durfte die sogenannte Library Preparation und MiSeq Sequenzierung im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck durchgeführt werden. Als Vorbehandlung der Repertoiresequenzierung wurden die Proben verdünnt, denaturiert und gepoolt. Es wurde auf Eis gearbeitet und immer sorgfältig gemischt (Vortexer und Tischzentrifuge). Dazu wurde das MiSeq Reagent Kit V2 für 500 Zyklen in einer Standardfließzelle von Illumina benutzt. Die Reagenzienkartusche wurde für 1 h bei RT in einem Wasserbad aufgetaut, dann 10 Mal geschwenkt und auf eine luftblasenfreie Durchmischung der Lösungen überprüft. Bis zur Sequenzierung wurde sie bei 4 °C zwischengelagert. Der Hybridisierungspuffer HT1 wurde ebenfalls bei RT aufgetaut und dann bei 4 °C aufbewahrt. Für die Denaturierung der Proben wurden eine 1 N NaOH Lösung frisch unter Verwendung RNase-freien H<sub>2</sub>O auf 1 ml 0,2 N NaOH verdünnt. In zwei Sequenzierungen wurden je 6 Patientenproben sequenziert. Zunächst wurden die 400 bp, 500 bp und/oder 600 bp großen Produkte einer Patientenprobe zusammengeführt und mit 10 mM Tris-Cl (pH 8,5 mit 0,1 % Tween20) auf eine 20 µl umfassende 2 nM Lösung eingestellt. Dazu wurden zunächst die Stoffmengen der verschiedenen großen Produkte berechnet und dann die auf das gepoolte Volumen bezogene Konzentration ermittelt, deren molare Konzentration dann entsprechend mit Tris-Cl auf 2 nM verdünnt wurde. Die Berechnung beruhte auf diesen Formeln:

$$X \text{ nM} \times Y \text{ } \mu\text{l} = \frac{X \text{ nmol}}{10^6 \text{ } \mu\text{l}} \times Y \text{ } \mu\text{l} = Z \text{ nmol}$$

$$\frac{Z_1 \text{ nmol} + Z_2 \text{ nmol} + Z_3 \text{ nmol}}{Y_1 \text{ } \mu\text{l} + Y_2 \text{ } \mu\text{l} + Y_3 \text{ } \mu\text{l}} = U \text{ nmol/} \mu\text{l}$$

$$20 \text{ } \mu\text{l} \times \frac{2 \text{ nM}}{U \text{ nmol/} \mu\text{l} \times 10^6} = M \text{ } \mu\text{l}$$

$$2 \text{ nM} \triangleq M \text{ } \mu\text{l} \left[ U \frac{\text{nmol}}{\mu\text{l}} \right] + (20 - M) \mu\text{l} [\text{TrisCl}]$$

Bei der Probe G3 wurde das 500 bp große Produkt in einer Verdünnung von 2,8 nM in Tris-Cl hergestellt und das 400 bp große Produkt nicht sequenziert. Je 5  $\mu\text{l}$  wurde aus jeder der sechs Proben in einem neuen Reaktionsgefäß zusammengeführt. Davon wurden 5  $\mu\text{l}$  mit 5  $\mu\text{l}$  0,2 N NaOH für 5 min bei Raumtemperatur denaturiert. Analog dazu wurde die PhiX Kontrolle behandelt. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  10 nM PhiX mit 3  $\mu\text{l}$  10 nM Tris-Cl und 5  $\mu\text{l}$  0,2 N NaOH vermischt und dann für 5 min bei Raumtemperatur denaturiert. Die 1 nM denaturierte Patientenprobe wurde zunächst 1:1000 auf 10 pM in 4°C kaltem Hybridisierungspuffer HT1 verdünnt und anschließend auf 7,5 pM in HT1 weiterverdünnt:

$$10 \text{ } \mu\text{l} \text{ 1 nM Probe} + 990 \text{ } \mu\text{l} \text{ HT1}; \quad 450 \text{ } \mu\text{l} \text{ 10 pM Probe} + 150 \text{ } \mu\text{l} \text{ HT1}.$$

10  $\mu\text{l}$  der PhiX Kontrolle wurde 1:1000 mit 990  $\mu\text{l}$  kaltem HT1 Puffer verdünnt. Abschließend wurden 510  $\mu\text{l}$  der 7,5 pM Probe mit 90  $\mu\text{l}$  10 pM PhiX Kontrolle vereint. Die 6 Proben wurden nun in einer Konzentration von 6,375 pM in Form der 600  $\mu\text{l}$  mit der 1,5 pM PhiX Kontrolle in die entsprechende Öffnung der Sequenzierungskartusche pipettiert. Das MiSeq Gerät wurde mit der Software MSC V 2.6.2.1 bedient. Puffer, Fließzelle und Reagenzienkartusche wurden wie im MiSeqSystem User Guide beschrieben ins Gerät gebracht und die Sequenzierung entsprechend gestartet.

Die Standardfließzelle war für etwa 15 Millionen Reads ausgelegt, was bei einer Zyklusanzahl von 2 x 250 (250 paired end reads), einer Datenmenge von 7,5 Gigabyte entspricht. Dabei definierte laut dem Mi Seq System User Guide ein sogenannter Read eines einzelnen Zyklusses einen Cluster, der Illumina's Chastity Filterbedingungen erfüllt hatte, also eine eindeutige Sequenz eines einzelnen Brücken-amplifizierten Moleküls darstellte. Alle 6 Proben einer Sequenzierung wurden in einer Konzentration von je 2 nM vereint wie im MiSeq System User Guide vorgeschlagen wurde. Mit den wie oben

beschriebenen, verdünnten Konzentrationen wurde eine Anzahl von 2 Millionen Reads pro Probe bzw. der PhiX-Kontrolle angestrebt. Aus Erfahrungsberichten der T Zell Rezeptorsequenzierung im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck wurde diese Annahme abgeleitet (Li et al., 2017). Bei der PhiX-Kontrolle handelte es sich um eine Adapter-ligierte Library des PhiX Virusgenoms, die laut Hersteller zur Kontrolle der verschiedenen Sequenzierungsabläufe wie Annealing und Clustergeneration benutzt werden konnte. Die 15 Volumenprozent an 1,5 pM PhiX Kontrolle dienen unter anderem dem Erhalt der Diversität während der Sequenzierung, sodass die Basenzusammensetzung zufällig passieren konnte und nicht durch einen definierten Mangel verschoben worden wäre, wie im MiSeq System User Guide vorgeschlagen wurde. Dort wurde auch beschrieben, dass die Cluster in einer Kachel der gläsernen Fließzelle mit entsprechenden LED Filter Kombinationen für die 4 fluoreszierenden Nukleotideinbauten nacheinander ausgelesen werden.

#### 5.3.4.6 Datenprozessierung (→IMGT/highV-QUEST files)

Über einen BaseSpace Account bei Illumina konnte die Sequenzierung beobachtet werden und die fastq Dateien heruntergeladen werden. Freundlicherweise wurden die Rohdateien beider Sequenzierungen von Markus Niebuhr aus dem Institut für Anatomie in jeweils 6 kleinere Einzeldateien separiert. Dabei wurden vorwärts Reads nur mit 100%iger Adapterübereinstimmung entsprechend des Patientenindex mit den dazugehörigen rückwärts Reads sortiert. Für das Index splitting verwendete er die folgende Funktion: *FASTX Barcode splitter, Hannon Lab, Howard Hughes Medical Institute, USA*. Für die Identifikation des rückwärts Reads verwendete er die folgende Funktion, die die Koordinaten des Sequenzierers nutzt: *KIEL, Markus Schilhabel, Institut für klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*. Mein Beitrag lag darin diese fastq-Dateien mit pRESTO (Version 0.5.4 ;(Vander Heiden et al., 2014)) aufzubereiten, einem Werkzeug zur Prozessierung NGS-generierter Rohdaten eines Lyphozytenrezeptorrepertoires. Für die Installation von pRESTO auf einem Windows PC war die Installation folgender Programme notwendig: Python 3.4.0 in 32 Bit Version, NumPy 1.8, SciPy 0.14, pandas 0.15 und Biopython 1.65.

Die folgenden Befehle wurden über die Konsole eingegeben, teilweise nach Kommunikation mit einem der Autoren (Kleinsteins-Lab, Yale) des Python - Programms:

```
PairSeq.py -1 PfadZuFastqFileVorwärtsRead.fastq -2 PfadZuFastqFileRückwärtsRead.fastq --coord illumina
```

Die Sequenzen des vorwärts und rückwärts Reads wurden einander zugeordnet und sortiert entsprechend der Kodierung des Sequenzierungsapparates.

```
AssemblePairs.py align -1 PfadZuFastqFileVorwärtsReadPairPassed.fastq -2 PfadZuFastqFileRückwärtsReadPairPassed.fastq --rc tail --scanrev --coord illumina
```

Bildet aus den sogenannten paired end reads eine Konsensussequenz, wobei ggf. der reverse komplementäre Strang gebildet werden darf und ein Read den anderen komplett überfassen darf.

```
FilterSeq.py quality -s PfadZuFastqFileAssembliert.fastq -q 20
```

Filtrierte die Konsensussequenzen auf einen empfohlenen Qualitätsgrad der Sequenzierung

```
MaskPrimers.py score -s PfadZuFastqFileAssembliert&Filtriert.fastq -p primerVorwärts.fasta --mode mask --maxerror 1.0 --start 0
```

Ersetzt die Vorwärts-Primer durch N und trennt diese ab. Dabei musste auf einen Dummyprimer aus N zurückgegriffen werden, da der Primerhersteller nur die grobe Länge der Primer bekannt geben konnte.

```
MaskPrimers.py score -s PfadZuFastqFilePrimerMaskiert.fastq -p primerRückwärts.fasta --mode cut --revpr --maxerror 1.0 --start 0
```

Schneidet die Rückwärts-Primer ab. Dabei musste auf einen Dummyprimer aus N zurückgegriffen werden, da der Primerhersteller nur die grobe Länge der Primer bekannt geben konnte.

```
SplitSeq.py count -s PfadZuFilePrimerMaskiert&Cut.fastq -n 500000 --fasta
```

Wandelt die fastq-Datei in fasta-Dateien um mit jeweils 500000 Sequenzen. In diesem Format konnten die Daten mit dem online-Werkzeug IMGT/highV-QUEST (Alamyar et al., 2012; Giudicelli et al., 2015) ausgewertet werden.

Es gab eine Probe (B3), deren Rohdateien an vorwärts und rückwärts Reads zunächst auf Sequenzierungsqualität gefiltert werden musste und anschließend mit dem folgenden Befehl von verkürzten Sequenzen (<200bp) gesäubert werden musste, bevor der PairSeq.py Befehl ausgeführt werden konnte.

```
FilterSeq.py length -s PfadZuFileVorwärtsReadQualityPass.fastq -n 200
```

#### 5.3.4.7 Statistik

Die Daten der IMGT/highV-QUEST Analyse der IgLV Repertoire-Sequenzierung wurden anhand von Makrobefehlen in Excel hinsichtlich der Anteile einzelner Merkmale ausgewertet. Nach einem Ratschlag von PD Dr. Andreas Recke wurde der T-Test auf prozentuale Werte einzelner Proben angewendet. Bei genügend großer n-Zahl können prozentuale Werte einer Verteilung mit der kanonischen logit-Transformation in eine stetige Normalverteilung verwandelt werden (Trikalinos et al., 2013). Die Normalverteilung transformierter Werte wurde zusätzlich mit dem Kolmogorow-Smirnov Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % mit Graph Pad Prism 4 überprüft.

## **5.4 B Zell Differenzierungsfaktoren und ihre Effekte**

### **5.4.1 mRNA Transkriptionsanalyse von IL-21, IL-21 Rezeptor, Blimp-1 und IL-17A**

#### **5.4.1.1 PBMC & PMN Zellisolation aus Vollblut (EDTA)**

Für diese Zellisolation ist ein Standardprotokoll des Labors verwendet worden. Die Leukozyten können aus Vollblut mittels Zentrifugation im Dichtegradienten aus einem Polysucrose-Polymer in zwei Fraktionen separiert werden, die mononukleären Lymphozyten und Monozyten (PBMC) und die polymorphonukleären Granulozyten (PMN). Es war wichtig schnell und mit Endotoxin-freien Lösungen zu arbeiten, um die neutrophilen Granulozyten nicht künstlich zu aktivieren.

Zu diesem Zweck werden in einem 50 ml Röhrchen EDTA-Blut und steriles PBS im Verhältnis 1:1 vorsichtig gemischt. Dasselbe Volumen an Biocoll wurde in einem weiteren 50 ml Röhrchen vorgelegt und mit der Zellsuspension überschichtet. Nach Zentrifugation für 25 min bei 800 g und Raumtemperatur mit niedriger Beschleunigung bzw. Bremskraft bildete sich die typische Zellverteilung im kontinuierlichen Gradienten aus. Zunächst wurde die oberste, gelbliche Schicht aus Plasma und Thrombozyten abgesaugt. Die schmale, weiße Schicht aus Lymphozyten und Monozyten wurde in ein neues 50 ml Röhrchen pipettiert. Zum Waschen wurden die PBMC zwei Mal mit 50 ml sterilem PBS bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Wie in Punkt 5.3.3 beschrieben wurden die Zellen in definierter Anzahl in Lysepuffer zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert. Die Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten auf Grund der größten Dichte bis zum Boden des 50 ml Röhrchens. Daher wurde die darüberliegende, flüssige Schicht verworfen, um das Zellpellet in dem doppelten Volumen an 1%igem Polyvinylalkohol vorsichtig zu mischen. Nach 20 min bildete sich eine Schichtung aus sedimentierten Erythrozyten und aufliegenden Granulozyten, welche in einem neuen 50 ml Röhrchen separiert wurden. Ein Mal wurde mit 50 ml kaltem PBS bei einer Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 1000 Upm gewaschen. Zur Lyse restlicher Erythrozyten wurde das Pellet in 2 ml kaltem, sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Erst nach einer halben Minute wurde zwei Mal mit 50 ml kaltem PBS bei einer Zentrifugation von 1000 Upm bei 4 °C für 10 min gewaschen. Die Zellen wurden wieder in definierter Zellzahl im RNA-Lysepuffer bei -80 °C weggefroren. Nach RNA-Isolation wurde die Integrität im 1,5%igen Agarosegel überprüft.

#### **5.4.1.2 cDNA-Synthese**

Die isolierte RNA wurde für die qPCR mit dem iScript cDNA synthesis kit (Bio Rad) laut Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase ist eine modifiziertes MMLV Enzym mit RNase H<sup>+</sup> Aktivität. Als Primer wurden oligo(dT) und

hexamere Nukleotidabfolgen eingesetzt. Für die Etablierung der qPCR Primer wurde universale, humane RNA in cDNA umgeschrieben.

#### 5.4.1.3 Primerdesign

Zunächst wurden die Referenzsequenzen der mRNA-Varianten eines Targetgens (IL-21, IL21-R, Blimp-1) bei NCBI herausgesucht. Dann wurde im kodierenden Bereich, der bei allen Varianten gleich war, nach einem kurzen Exon gesucht, wobei ein Primer die äußere Exon-Exon-Junction überspannen sollte, damit genomische DNA auch durch ein übergroßes PCR Produkt auffallen würde. Mit dem Programm Primer3 konnten weitere Bedingungen festgelegt werden, wie eine GC-Klammer am 3'-Ende zur Erhöhung der Stabilität und eine Produktlänge von 100 – 250 bp. Unter den vorgeschlagenen Varianten wurden bevorzugt Primer mit einem GC-Gehalt < 55 %, einer ähnlichen Schmelztemperatur für Vorwärts- und Rückwärts-Primer um die 60 °C und einer niedrigen Struktur-bildenden Energie (freie Enthalpie  $\Delta G \geq 0$ ) ausgewählt. Abschließend wurde bei NCBI in den mRNA Referenzgenen geprüft, ob das Primerpaar für alle mRNA Varianten ein gleich großes Produkt ergibt und ob im humanen Transkriptom keine anderen mRNA spezifisch erkannt werden.

Die designten Primer wurden zunächst an universaler, humaner RNA mittels Temperaturgradienten PCR auf die optimale Primerbindungstemperatur hin untersucht, bei der eindeutige Dissoziationskurven mit einem Peak entstanden sein sollten (Tab. 30). Hierzu wurde ein Reaktionsvolumen von 15 µl gewählt und der SsoAdvanced SYBR Green Supermix (2x) von BioRad benutzt. Pro Reaktionsansatz wurden 6 pmol Vorwärts- und 6 pmol Rückwärts-Primer eingesetzt und 100 ng c-DNA. Die folgenden Temperaturen wurden in Doppelbestimmung getestet: 64 °C, 63,5 °C, 62,5 °C, 60,7 °C, 58,6 °C, 56,8 °C, 55,6 °C und 55 °C.

Für die Effizienzbestimmung der PCR wurde die Reaktion analog angesetzt. Sechs Verdünnungen an c-DNA wurden hergestellt, sodass 1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng und 31,25 ng in Doppelbestimmung eingesetzt wurden und bei der bestimmten Annealingtemperatur amplifiziert wurden. Zur Effizienzbestimmung wurde die Zykluszahl Cq auf der Y-Achse gegen den  $\log(\text{cDNAinput [ng]})$  aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Die Effizienz E wurde mit folgender Formel nach (Higuchi et al., 1993; Rasmussen, 2001) berechnet:

$$E = (10^{-\frac{1}{m}}) - 1 \quad m = \text{Steigung der Geraden}$$

Die Genprodukte wurden im 1,5%igen Agarosegel aufgetragen für 1 h bei 80 mV. Dazu wurden 10 µl 100 bp Marker (Quick load von New England Biolabs) aufgetragen sowie 10 µl Probe/Genprodukt vermischt mit 2 µl Ladepuffer.

**Tabelle 30: Zyklusbedingungen der qPCR.**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	3 min	1x
95 °C	10 sec	40x
X °C	10 sec	
72 °C	30 sec	
95 °C	10 sec	1x
65 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten	Jede Temperatur 5 sec	

#### 5.4.1.4 qPCR

Diese Art der PCR diente der Quantifizierung der Target mRNA relativ zu Haushaltsgenen. Das Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR green änderte sich nach Interkalation mit der doppelsträngige DNA, sodass die Fluoreszenzmessung in jedem Zyklus benutzt wurde, um die Anzahl an nötigen Zyklen bis zum Beginn der exponentiellen Phase (Ct-Wert) zu erfassen. Daher hat die Probe mit höherer Ausgangskonzentration an cDNA niedrigere Ct-Werte.

Jede Probe wurde in Doppelbestimmung mit einer cDNA Konzentration von 70 ng nach den Bedingungen der Effizienz-PCR gemessen. Nur für IL-17A wurde ein kommerziell, validierter Primer nach Herstellerangaben verwendet. Eine Negativkontrolle ohne cDNA wurde pro qPCR mitgeführt, die komplett negativ sein musste, um eine Kontamination der Reagenzien im Mastermix auszuschließen. Die Basislinie wurde immer in der automatischen Standardeinstellung belassen. Zusätzlich wurden in jeder Probe die Haushaltsgene GAPDH (NM\_002046.4) und 18SrRNA (NR\_003286.2) mitgemessen, die in der GPA nicht anders transkribiert werden als in Gesunden.

#### 5.4.1.5 Statistik

Die Standardabweichung der Doppelbestimmung der Ct-Werte musste < 0,2 sein. Zur Berechnung relativer Transkriptionsunterschiede wurden jeweils Mittelwerte der beiden Ct-Werte gebildet und die folgende Formel (Schmittgen und Livak, 2008) unter Einbezug der Effizienzen benutzt:

$$\Delta_{diff} = \frac{E_{target}^{Ct_{target}}}{E_{haushalt}^{Ct_{haushalt}}}^{-1}$$

Um Unterschiede zwischen GPA Patienten und gesunden Probanden statistisch zu determinieren wurde mit der Graph Pad Prism Software (Version 6) der unabhängige, zweiseitige Mann-Whitney-Test durchgeführt.

#### 5.4.2 IL-21 & IL-21R Fluoreszenzfärbungen nasaler Biopsien

Zur Darstellung spezifischer Moleküle in Formalin fixiertem Paraffingewebe der Nasenschleimhaut wurde die biologische Interaktion von Antikörpern mit ihren Antigenen ausgenutzt, wobei die Bindung durch die Fluoreszenzmarkierung des Antikörpers sichtbar gemacht wurde.

Fünf Nasenbiopsien von GPA Patienten und drei Nasenbiopsien von Patienten wurden mit chronischer Rhinosinosis untersucht wie in Tabelle 31 dargestellt.

Zunächst wurden die Gewebsschnitte in Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Das Max Block Autofluorescence Reducing Reagent Kit von Dianova wurde entsprechend der Protokollempfehlungen des Herstellers eingesetzt, um die Autofluoreszenz des Gewebes und der Fixierungsmittel im Hintergrund zu reduzieren ohne die spezifische Fluoreszenz der Färbung zu beeinträchtigen. Für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wurden die Gewebspräparate 15 min lang in einer speziellen Lösung mit pH 9 gekocht, um die Quervernetzungen der Fixierung soweit aufzuheben, dass das Antigen renaturieren konnte (Cattoretti, 1994). Der Image-iT FX Signal Enhancer von Life Technologies wurde benutzt, um die unspezifische Interaktion negativ geladener Fluoreszenzfarbstoffe mit Gewebstrukturen zu verhindern. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden unspezifische Bindestellen mit dem sogenannten Proteinblock-Reagenz abgesättigt. Zusätzlich wurde vor jedem Inkubationsschritt mit Primärantikörper mit Serum der Spezies des jeweiligen sekundären Detektionsantikörpers blockiert. Es wurden Sekundärantikörper verwendet, die nur aus dem F(ab')<sub>2</sub> Teil bestehen. Die Nachfixierung fand in 3%igem Paraformaldehyd in PBS statt. Die DAPI-Kernfärbung geschah in dem Eindeckmedium ProLongGold Antifade Reagent. Kontrollpräparate für den Sekundärantikörper (ohne Primärantikörper) und den Primärantikörper in Form der Isotypenkontrolle (Ig der Spezies des Primärantikörpers statt Primärantikörper) wurden durchgeführt sowie während der Etablierung die Autofluoreszenzkontrolle (ohne Antikörper).

**Tabelle 31: Protokoll für die IL-21/IL-21R Immunfluoreszenzfärbung.**

Komponente	Zeit	Anmerkung
Xylol	10 min	2 Mal
100 % Ethanol	5 min	2 Mal
95 % Ethanol	5 min	
80 % Ethanol	5 min	
70 % Ethanol	5 min	
Max Block Reagent A	5 – 20 min	
60 % Ethanol	1 min dippen	
Aqua dest.	5 min	
1x Target Retrieval Solution pH 9	15 min kochend	

Komponente	Zeit	Anmerkung
	20 min abkühlend	
<b>Aqua dest</b>	spülen	
<b>PBS</b>	spülen	
<b>Image-iT FX Signal Enhancer</b>	30 min	
<b>PBS</b>	1 min	2 Mal
<b>Proteinblock</b>	15 min	
<b>5 % Eselserum in PBS</b>	15 min	
<b>PBS</b>	1 min	3 Mal
<b>Kaninchen anti-human IL-21 bzw. normal rabbit IgG (beide 2 µg/ml)</b>	Über Nacht 4 °C	Ab jetzt Abdunkeln
<b>PBS</b>	spülen	
<b>Esel F(ab')<sub>2</sub> α-Kaninchen IgG (H+L) – Alexa Fluor 488 (1,5 µg/ml)</b>	15 – 20 min	
<b>PBS</b>	spülen	
<b>5 % Eselserum in PBS</b>	20 min	
<b>PBS</b>	1 min	3 Mal
<b>Ziege anti-human IL-21R (1:75) bzw. Ziegen IgG Isotypenkontrolle (1,7 µg/ml)</b>	Über Nacht 4 °C	
<b>PBS</b>	spülen	
<b>Esel F(ab')<sub>2</sub> α-Ziege IgG (H+L) – Alexa Fluor 594 (1,5 µg/ml)</b>	15 – 20 min	
<b>PBS</b>	spülen	
<b>3 % PFA in PBS</b>	10 min	
<b>PBS</b>	1 min	4 Mal
<b>Aqua dest</b>	5 min	
<b>Max Block Reagent B</b>	5 min	
<b>Aqua dest</b>	2 min	3 Mal
In Pro Long Gold Antifade Reagent + DAPI eindecken; bei RT 24 h trocknen lassen; Lagerung 4 °C		

Ausgezählt wurden etwa 200 Zellen pro Patient in der Vergrößerung des 100er Objektivs. Der zweiseitige, exakter Fischer Test wurde unter einem Signifikanzniveau von 5 % angewendet und das Odds Ratio und der adjustierte Kontingenzkoeffizient berechnet<sup>12</sup>, um Unterschiede in der IL-21R Expression aufzuzeigen.

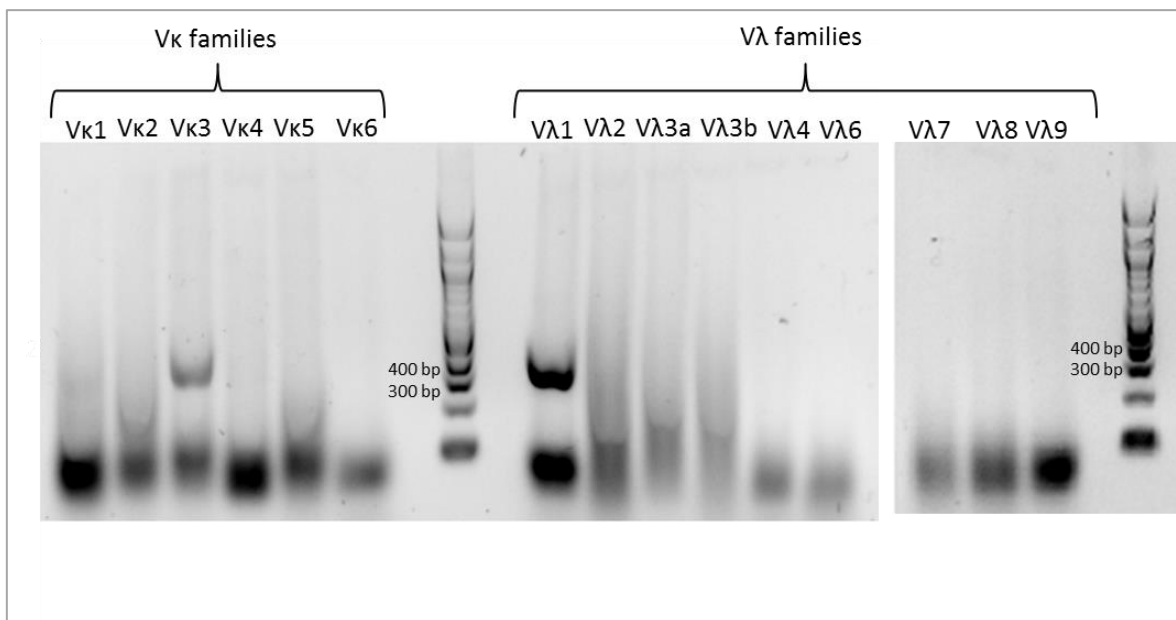
<sup>12</sup> Interactive Statistical Pages project (ohne Jahr)  
JavaStat -- 2-way Contingency Table Analysis  
<http://statpages.info/ctab2x2.html>  
(Stand: 12.06.2018)

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Klonierung und rekombinante Expression von IgHV & IgLV Genpaaren aus einzelnen B Zellen im entzündeten Gewebe bei der GPA

#### 6.1.1 Darstellung zusammengehörender IgLV & IgHV Genpaare aus einzelnen gewebständigen B Zellen

IgLV- und IgHV-Genpaare von CD138<sup>+</sup> B-Zellen (n=4) in der Nasenschleimhaut bei der GPA und einer CD20<sup>+</sup> B-Zelle in der Niere bei der GPA wurden in Vorarbeiten generiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres IgLV und IgHV Genpaar von einer CD138<sup>+</sup> B-Zelle aus der Nasenschleimhaut bei der GPA gewonnen. Die Grundlage dafür bildet eine immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten für CD138 bzw. CD20 mit anschließender Laser-unterstützter Mikrodissektion. Insgesamt wurden etwa 250 einzelne CD138<sup>+</sup> B-Zellen von drei verschiedenen Patienten dissektiert. Ein Agarosegel einer Leichtkettengen-PCR ist beispielhaft gezeigt (Abb. 13).



**Abbildung 13: IgLV Einzelzell-PCR mit Resultat: L5.**

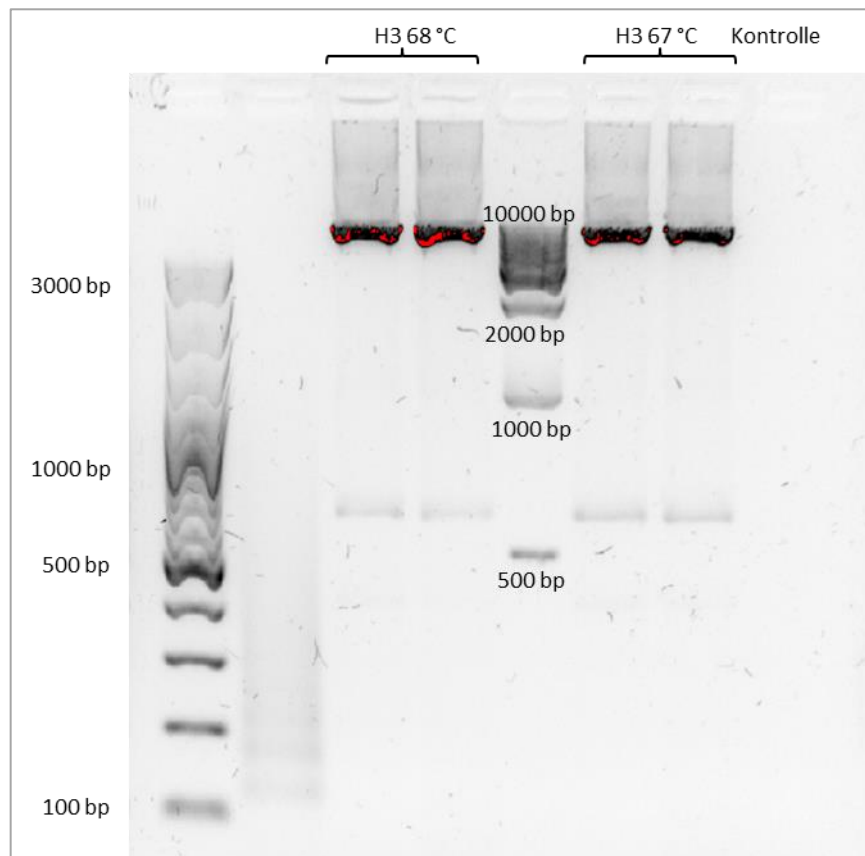
IgkV3 analysiert als produktives Immunglobulingen und IgλV als unspezifischer Abschnitt auf Chromosom 21 nach TOPO-TA Klonierung für die Sanger-Sequenzierung; 1,5 %iges Agarosegel mit 10 µl Probe und 100 bp DNA Leiter

Nach Sequenzierung ergab das IgkV3 Produkt laut IMGT/V-QUEST eine produktive Leichtkette, das IgλV1 Produkt ist jedoch kein Immunglobulingen, sondern liegt laut NCBI in einen kurzen Abschnitt im humanen Chromosom 21. Der humane IgλV-Lokus liegt auf Chromosom 22 (siehe Punkt 3.1.6.1). U. a. auf Grund zahlreicher unspezifischer Produkte zeigte die Suche nach produktiven Leicht- und Schwerekettenpaaren aus Einzelzellen eine geringe Ausbeute und war sehr arbeitsaufwendig. Für molekularbiologische

Hochdurchsatz-Analysen wurde daher auf das Ausgangsmaterial RNA gewechselt (siehe Punkt 5.3.4).

### 6.1.2 Darstellung der Transfervektorkonstrukte

Die jeweiligen IgLV und IgHV Genpaare (n=6) wurden in entsprechende Transfervektoren (pVTC gp37 für IgHV, pVTC $\kappa$  für IgkV, pVTC $\lambda$  für Ig $\lambda$ V) kloniert. Desweiteren wurden eine Deletions- bzw. eine Substitutions – PCR durchgeführt, um Fehler in der DNA-Sequenz zu korrigieren. Ein Agarosegel mit den Amplifikaten der Substitutions – PCR von H3 wird beispielhaft gezeigt (Abb. 14). Das erwartete Produkt von 7924 bp (siehe Tab. 15) ist bei beiden getesteten Anlagerungstemperaturen für die Primer entstanden. Das unspezifische Produkt bei etwa 800 bp wurde auf Grund der geringen Konzentration ignoriert. Die Deletion oder Substitution im korrekten H3 Transfervektorkonstrukt wurde per Sequenzierung überprüft.

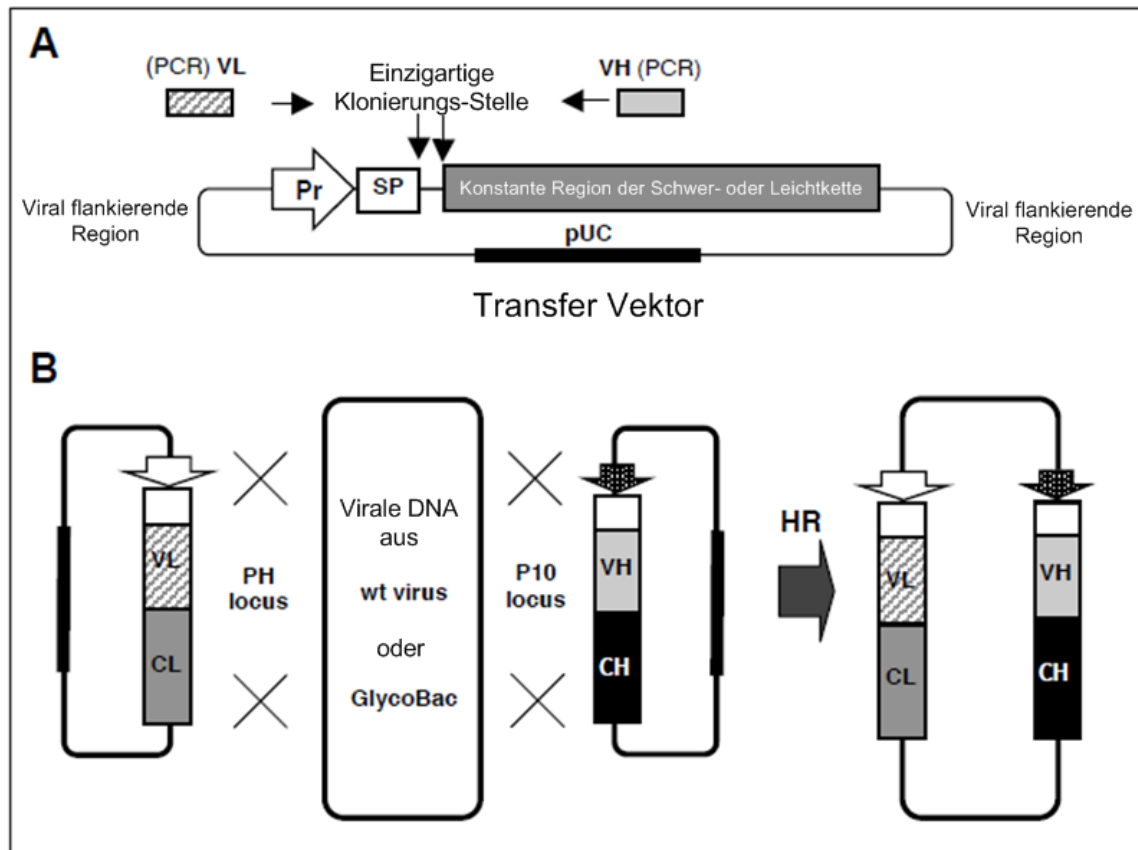


**Abbildung 14: Amplifikate der Substitutions-PCR.**

Mit H3 und dazugehöriger Kontrolle vor der enzymatischen KLD-Reaktion zur Rezirkulation des Vektors bei zwei passenden Anlagerungstemperaturen für die designten Primer; 1,5 %igen Agarosegel mit 5  $\mu$ l Probe, einer 100 bp DNA-Leiter und einer 10 kbp DNA-Leiter

### 6.1.3 Homologe Rekombination und rekombinante Expression von IgG

Die homologe Rekombination von Leicht- und Schwerketten-Transfervektorkonstrukten in bakulovirale DNA innerhalb der Wirtszelle (Sf9) wurde, wie in Abbildung 15 gezeigt, durchgeführt und nach Selektionierung viraler Klone mittels lytischem Plaque-Assay per PCR von unseren Kooperationspartnern in Frankreich (Dr. Martine Cérutti, Baculovirus et Thérapie, Station de Recherche, CNRS, 30380 Saint Christol Lèz Alès, France) nochmals überprüft.



**Abbildung 15: Verschiedene Schritte bei der Konstruktion rIgG-expressierender Baculoviren (Juliant et al., 2013)**

Generelle Organisation spezifischer Transfervektorkonstrukte zur Expression inserierter IgLV und IgHV Genen mit Signalpeptid (SP) abwärts des viralen Promotors (Pr) (**A**); Homologe Rekombination in Sf9 Insektenzellen der entsprechenden beiden Transfervektorkonstrukte mit nicht-infektöser viraler DNA im nicht-essentiellen P10 oder Polyhedrin (PH)-Gen (GlycoBac = enthält Glycosyltransferasen zur Humanisierung der Ig) (**B**)

Anhand der Produktgröße der amplifizierten DNA des rekombinanten viralen Klones mit vektorständigen Primern wurde der Einbau der V-Region im Agarosegel sichtbar. Diese Schritte habe ich während meines Praktikums an einem rIgG selbst nachvollzogen. Zusätzlich haben unsere Kooperationspartner die Insertionsstelle mittels Southern Blot überprüft und den viralen Überstand der Insektenzellkultur mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 16).

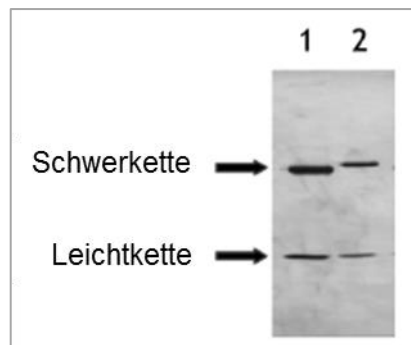


Abbildung 16: Polyacrylamid-Gel in Silberfärbung der aufgereinigten Antikörper aus viralem Sf9-Kulturüberstand (1) mit humanem Kontrollantikörper (2) (Cérutti und Golay, 2012)

#### 6.1.4 Identifizierung von rekombinanten IgG1

Ein IgG1-ELISA ergab, dass die Klonierung und Expression von IgLV- und IgHV-Genpaaren humaner Immunglobuline vom IgG1-Typ gebildet hat. Die IgG1 Konzentrationen der viralen Zellkulturüberstände (rlgG Nr. 1, 2, 4, 5 und 6) lagen zwischen 0,2 – 0,8  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 17).

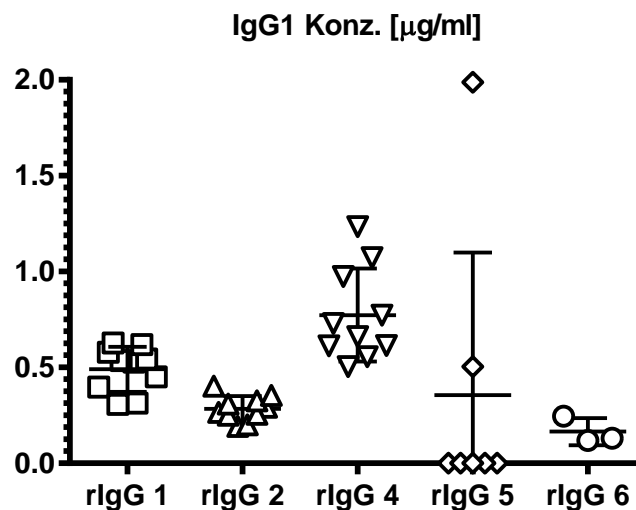


Abbildung 17: IgG1 Bestimmung in viralen Insektenzellkulturüberständen.

Gemessen wurden Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 (rlgG1,2,4: n=10, rlgG5 n=7, rlgG6 n=3) jeweils mit Mittelwert und Standardabweichung (Graph Pad Prism 6); an Kontrollen angepasste und den Messbereich umfassende Regressionen zur Auswertung des IgG1-ELISA (n=4) ergaben jeweils Werte von  $R^2$  im Bereich von 0,97 bis 0,99. Die Regressionsgerade wurde auf die Mediumkontrolle (TGV3) normalisiert, indem die höchste Absorption des Mediums auf die Konzentration 0 gesetzt wurde.

Unverdünnter viraler Zellkulturüberstand eignete sich nicht zur Konzentrationsbestimmung, da bestimmte Werte (rlgG 1, 2 und 4) auf einen Sättigungseffekt schließen ließen (etwa 0,01-0,02  $\mu\text{g/ml}$ ). Der rlgG3 wurde nicht als viraler Zellkulturüberstand gemessen, daher fehlt der Wert für rlgG3 in Abbildung 17. Lagerungseffekte (4  $^{\circ}\text{C}$ , -20  $^{\circ}\text{C}$  und -80  $^{\circ}\text{C}$ ) der viralen Insektenzellkulturüberstände wurden mit einigen rlgGs (Nr. 1, 2 und 4) in der Verdünnung 1:100 getestet und waren vernachlässigbar. Eine Lagerung bei -20  $^{\circ}\text{C}$  erschien

am geeignetsten. Insgesamt wurden alle sechs klonierten und exprimierten Proteine als IgG1 identifiziert. Tabelle 32 zeigt die Konzentration und die Ausbeute der aufgereinigten rIgGs.

**Tabelle 32: rIgG-Konzentration der Aufreinigung im großen Maßstab, durchgeführt vom Kooperationspartner.**

<b>rIgG Nr.</b>	<b>Konzentration (µg/ml)</b>	<b>Volumen (ml)</b>
<b>rIgG 1</b>	1200	1,2
<b>rIgG 2</b>	1000	2,0
<b>rIgG 3</b>	1100	1,4
<b>rIgG 4</b>	1800	0,8
<b>rIgG 5</b>	1050	0,4
<b>rIgG 6</b>	1000	1,6

## **6.2 Spezifitätstestung rekombinanter IgG aus gewebständigen B Zellen bei der GPA**

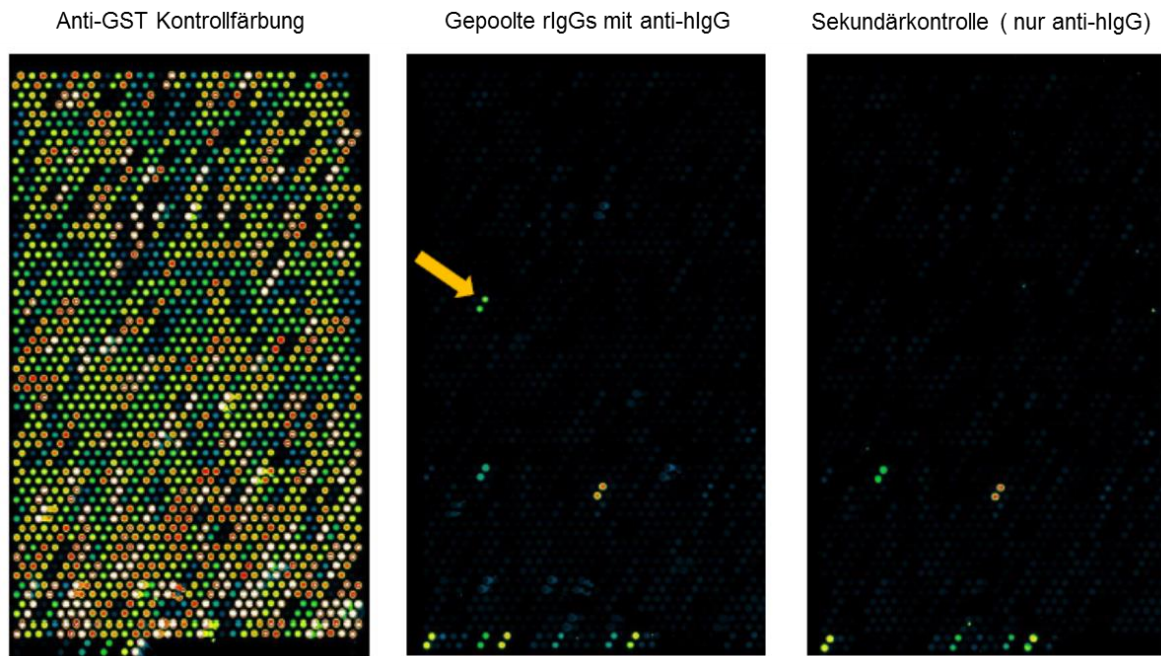
### **6.2.1 Die rIgG1 reagieren nicht mit humaner PR3**

Um die Reaktivität der rIgGs mit dem Hauptautoantigen der GPA, d. h. der PR3, zu testen wurde ein kommerzieller PR3-ANCA ELISA (Euroimmun) benutzt (siehe Punkt 5.2.1). Zur Kontrolle der Sensitivität wurde ein kommerzieller anti-PR3-Antikörper (Klon 12.8) in verschiedenen Verdünnungen (0,3 µg/ml = 5 RE/ml, 1 µg/ml = 15 RE/ml und 2 µg/ml = 40 RE/ml) gemessen. Zur weiteren Validierung wurden aus PR3-ANCA<sup>+</sup> Seren aufgereinigte IgGs (Verdünnung 1:2, laborinterne Vorarbeiten per FPLC) gemessen, deren Konzentrationen über dem kalibrierten Bereich lagen. Die IgG1-enthaltenden virale Zellkulturüberstände von rIgG1,2,4,5 und 6 (unverdünnt, 1:2) enthielten keine PR3-ANCA Ig (0 RE/ml). Die aufgereinigten rIgGs (Nr. 1-6) wurden auf 7-12 µg/ml verdünnt und enthielten ebenfalls keine PR3-ANCA IgG (0 RE/ml).

### **6.2.2 Die rIgG1 reagieren mit bestimmten humanen Autoantigenen**

Ein kommerzieller humaner Proteom-Mikroarray (HuProt, Fa. Cambridge Protein Arrays) wurde verwendet, um herauszufinden ob die rIgGs (n=6, gepoolt) humane Autoantigene erkennen. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Studienberichtes aufgeführt. Der Array bietet die Möglichkeit > 20 000 rekombinante, humane Proteine auf einem einzigen Träger auf spezifische Interaktionen mit Immunglobulinen zu untersuchen. Damit werden etwa 75 % des Protein – kodierenden Genoms erfasst. Dies ist zur Zeit die größtmögliche Anzahl humaner Proteine, die mit einem kommerziellen Array untersucht werden können. Die

Probe zeigte gut auswertbare Signal-zu-Rausch Verhältnisse (Abb. 18). Es kann allerdings nicht unterschieden werden, ob die Ergebnisse sechs spezifische Reaktivitäten oder weniger Reaktivitäten zuzüglich Kreuzreaktivitäten repräsentieren. 15 Proteine entsprachen den im Methodenteil beschriebenen Auswertungskriterien und sind in Tabelle 34 aufgelistet.



**Abbildung 18: HuProt Array-Färbung am Beispiel des Subarrays Nr. 5 von 24 verschiedenen Subarrays innerhalb des Gesamt-Arrays.**

Der gelbe Pfeil im mittleren Panel markiert das Autoantigen CRACR 2B (grüne Punkte, Doppelbestimmung)

Zwei der 15 möglichen Interaktionspartner aus Tabelle 33 haben ähnliche Funktionalitäten. FBXO2 und TRIM21 sind beides Komponenten in Ubiquitin Ligase Komplexen, interagieren aber nicht miteinander. TRIM21 ist nicht nur Autoantigen im Sjögren Syndrom, SLE und RA, sondern ebenfalls ein intrazellulärer Fc-Rezeptor. Daher kann die starke Interaktion von TRIM21 die spezifische Reaktivität eines rIgGs über den Fab-Teil bedeuten, aber auch die kombinierte Bindung der rIgGs an den Fc-Rezeptor. NAA10 und NAA40 sind beides N-terminale Acetylasen, wobei NAA10 generelle Acetylierung vornimmt und NAA40 Histon-spezifisch agiert. Obwohl sie eine ähnlich lange Aminosäuresequenz haben, sind die Sequenzen so verschieden, dass man die spezifische Erkennung von zwei rIgGs annehmen könnte. BHLHA15 kann ein starker Interaktionspartner der rIgGs sein, da es einen auffällig hohen i-Score (siehe Punkt 5.2.2) aufwies.

**Tabelle 33: Mögliche Hauptinteraktionspartner der sechs gepoolten rIgGs mit einem z-Score > 3,75.**

Die Proteinbezeichnungen entsprechen der HUGO Gen-Nomenklatur; mehrere z-Scores eines Proteins stellen interne Arraykontrollen dar; Quellen folgender Charakteristika in den Kommentaren: Sequenzen & Strukturen (UniProt), zelluläre Lokalisation (HPA, humaner Protein Atlas), Interaktionen (BioGRID), Autoantigenität und Literatur (PubMed); Tabelle abgewandelt aus Studienreport HuProt

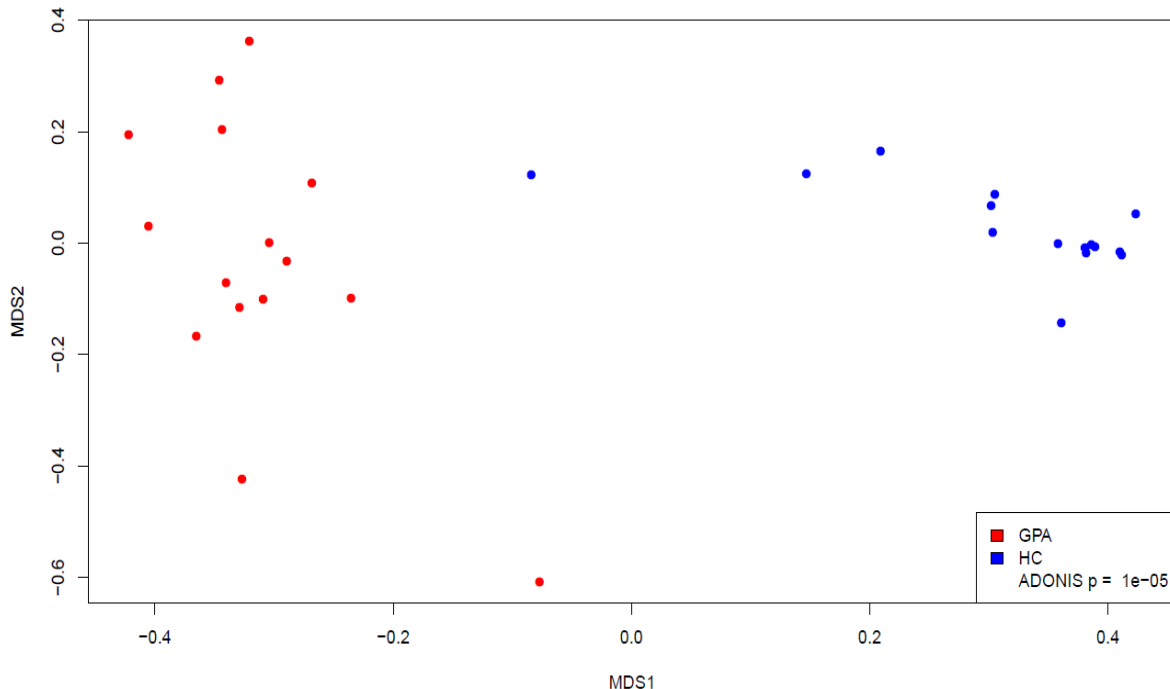
Symbol	z-Score	i-Score	Protein-Name	Kommentare
FBXO2	5,6	1,65	F-box protein 2	Komponente des SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplex; berichtet als Autoantigen in RA (Mizutani et al., 2013); nukleäre und zytosolische Lokalisation (HPA)
CRACR2B	5,3	1,20	calcium release activated channel regulator 2B	reguliert den Calcium-Kanal der Plasmamembran
PUF60	5,23 4,73 4,36	0,94 0,51 0,36	poly(U) binding splicing factor 60	identifiziert als neues Autoantigen im Sjögren Syndrom (SS), SLE, RA und Dermatomyositis (Fiorentino et al., 2016; Zhang et al., 2018); Assoziation mit anti-Ro52 (anti-TRIM21) in SS; auch nachgewiesen bei gastrointestinalem Krebs (Kobayashi et al., 2016), nukleäre Lokalisation (HPA)
TRIM21	5,04	5,18	tripartite motif containing 21	E3 Ubiquitin-Protein Ligase; Komponente des cullin-RING-based SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 Ubiquitin-Protein Ligase Komplex; intrazellulärer Fc Rezeptor für IgG; Teil des Ro/SSA Ribonukleoprotein und Hauptautoantigen im Sjögren Syndrom; SLE und RA, nukleäre Lokalisation (HPA)
SLC44A3	5,01	2,95	solute carrier family 44 member 3 (Choline transporter-like protein 3)	
ZNF783	4,84	0,59	zinc finger family member 783	Plasmamembran und zytosolische Lokalisation; gesprenkelte Färbung mit Antikörpern (HPA)
NAA10	4,79	0,55	N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit	azetyliert N-terminale Proteine, zytosolische Lokalisation (HPA)
NAA40	4,78	3,12	N(alpha)-acetyltransferase 40, NatD catalytic subunit	spezifische N-terminale Azetylierung von Histonen; Lokalisation in Kernkörperchen
BPHL	4,77	0,59	biphenyl hydrolase like	Serinhydrolase; mitochondriale Lokalisation (HPA)
SMARCC2	4,58 3,37	0,53 0,17	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of	nukleäre Lokalisation (HPA); Teil des Chromatin remodelierenden Komplexes; möglicher Transkriptionsfaktor

Symbol	z-Score	i-Score	Protein-Name	Kommentare
			chromatin subfamily c member 2	
BHLHA15	4,44	25,99	basic helix-loop-helix family member a15	Expression in der Speicheldrüse (HPA), nukleäre Lokalisation (HPA)
RAD23A	4,34 3,65	0,31 0,14	RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein	involviert in die DNA Reparatur und Ubiquitinierung; RAD23B (55 % Homologie) ist ein Autoantigen im NZB Mausmodell in SLE (Thebault et al., 2002); nukleäre Lokalisation (HPA); RAD23B interagiert mit PUF60 (BioGRID)
MAS1	4,27	3,92	MAS1 proto-oncogene, GPCR	Rezeptor für Angiotensin (1-7); Membranprotein
BPGM	4,23	0,28	bisphosphoglycerate mutase	Lokalisiert in Nukleoli (HPA); rotes Zell Enzym; reguliert Hämoglobin Affinität
SYNJ2BP	3,8	0,44	synaptojanin 2 binding protein	Mitochondriale Lokalisation (HPA)

### 6.3 Meta-Analyse des Immunglobulingenrepertoires (IgHV & IgLV) im entzündeten Gewebe bei der GPA

#### 6.3.1 Unterschiede im IgHV Genrepertoire zwischen GPA und HC

Für die Testung der Unterschiedlichkeit funktioneller IgHV Gene im entzündeten Gewebe bei der GPA (n=15/231 Klone) und des peripheren Blutes Gesunder (n=15/244.353 Klone) wurde die Jaccard Distanz benutzt (Abb. 19).

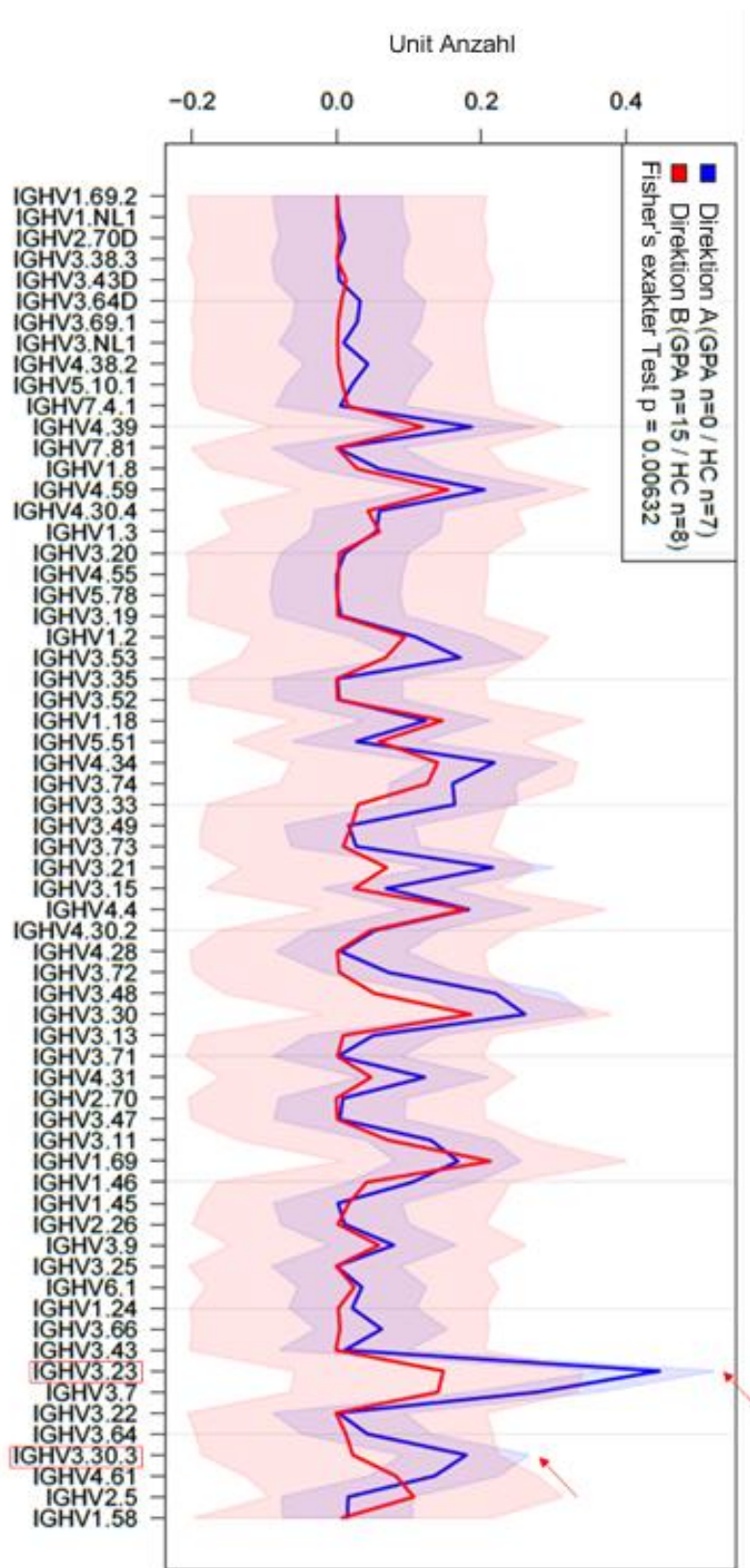


**Abbildung 19: Produktive, klonale IgHV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien (n=231) von 15 GPA Patienten (dargestellt als 15 rote Vektorpunkte) unterscheiden sich von peripheren, produktiven, klonalen IgHV Genen aus 15 Gesunden (n=244353, dargestellt als 15 blaue Vektorpunkte).** Nach der Methodik der multidimensionalen Skalierung (MDS) unter Verwendung der Jaccard Distanz als Diversitätskriterium und dem ADONIS Signifikanztest (multivariate Varianzanalyse von Distanzmatrizen aus dem R-Paket VEGAN [R Cran Version 2.4-6; (Anderson, 2001)], berechnet von PD Dr. Andreas Recke

Mit einem P-Wert von 0,00001 lagen enorme Unterschiede zwischen den IgHV Sequenzen aus Gesunden und GPA-Patienten vor, die offenbar primär auf der Erkrankung beruhen. Unterschiedliche Organquellen und Sequenzierungstechniken können die Unterschiede beeinflusst haben. Da die gesunden Probanden in Alter und Geschlecht an die GPA-Patienten angepasst wurden (jeweils 8 weibliche und 7 männliche Probanden; HC Median = 75 Jahre im Bereich von 31-87 Jahren; GPA Median = 55 Jahre im Bereich von 28 bis 82 Jahren), wird ein Einfluss von Alter und Geschlecht ausgeschlossen. Auf diesen Daten beruhend werden im Folgenden weitere Analysen vorgestellt, die mit Hilfe von PD Dr. Andreas Recke und Olena Ohlei, M.Sc. mit R programmiert bzw. berechnet worden sind. Die Bestimmung der Klone ist von Olena Ohlei berechnet worden unter Einbezug der Funktion GeneUsage aus dem R-Paket bcrep (Bischof und Ibrahim, 2016).

### **6.3.2 Veränderte Muster von IgHV und IGHJ Genfrequenzen zwischen GPA und HC**

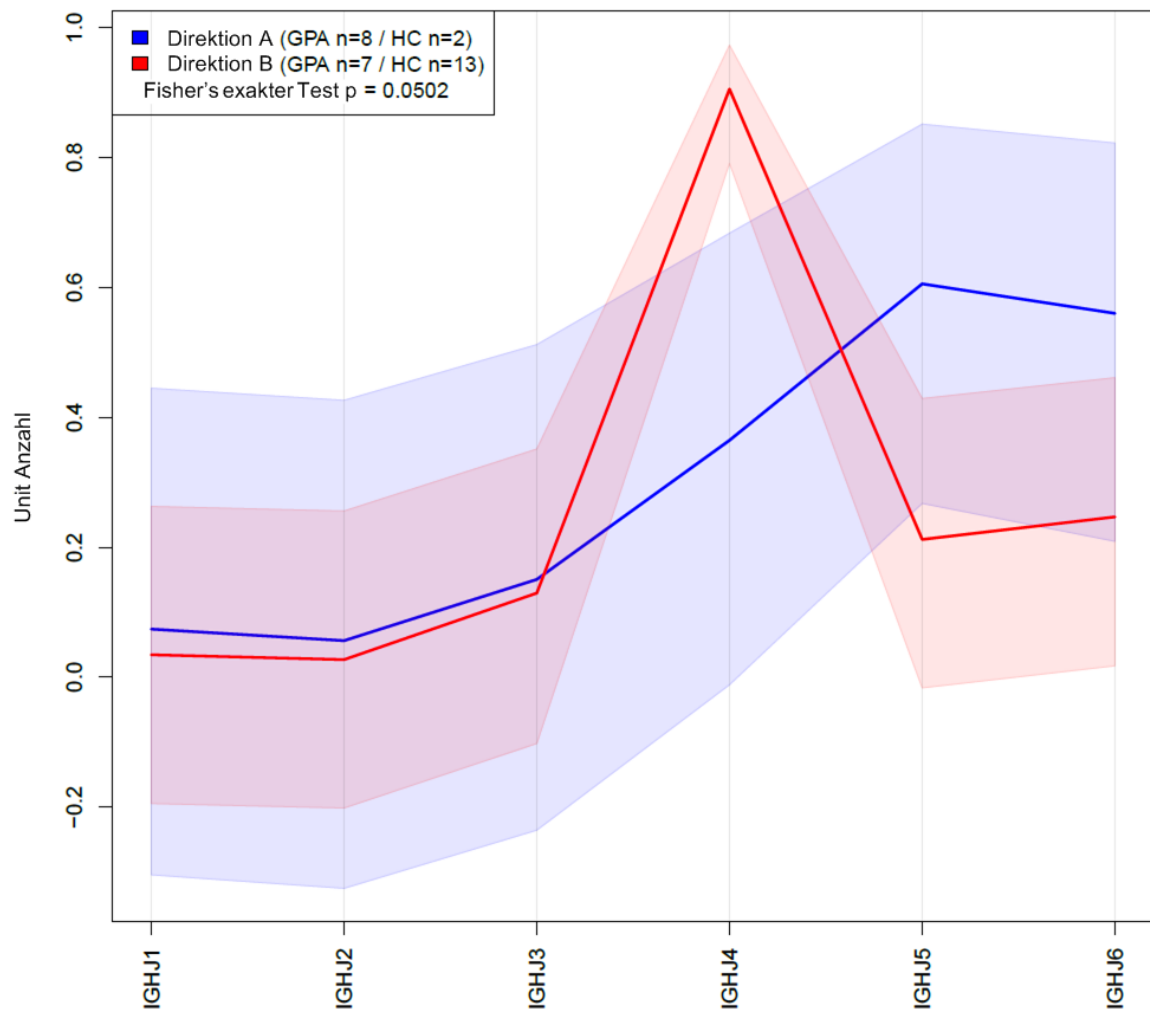
Produktive, klonale IgHV Gene aus nasalen Schleimhaut- und Lungenbiopsien bei der GPA waren in 39 verschiedenen Subfamilien der IGHV Keimbahngene vertreten (Tabelle im Anhang). Periphere, produktive, klonale IGHV Gene aus gesunden Probanden zeigten mit 64 verschiedenen Subfamilien an IGHV Keimbahngenen eine größere Diversität (Tabelle im Anhang). Um Verteilungsunterschiede in der IgHV Genfrequenz der beiden Datensätze zu untersuchen, wurde ein ungerichtetes, gemischtes Kugelmodell basierend auf Textmining Algorithmen verwendet. Dabei wurden Probanden und Patienten in einer ungerichteten Weise basierend auf der maximalen Wahrscheinlichkeit für ähnliche IgHV-Frequenzen zu je zwei Datengruppen (Direktionen A & B) zusammengefasst, die sich mit einem P-Wert  $< 0,01$  laut der von MisesFisher Verteilung unterschieden (Abb. 20). Die gesunden Probanden teilten sich zu gleichen Teilen in Direktionen A & B auf. Die Proben der GPA Patienten wurden interessanterweise nur in Direktion B eingeteilt und wiesen u. a. einen geringeren Anteil an IgHV3-23 und IgHV3-30-3 auf. Insgesamt betrachtet sind IgHV Subfamiliengene veränderter Frequenzen beider Direktionen hauptsächlich in abwärtiger genetischer Lokalisation zu finden.



**Abbildung 20: Unterschiedliche IgHV Subfamiliengen – Frequenzen zwischen GPA und HC (Daten der Tabelle im Anhang) aufgelistet entsprechend ihrer genetischen Lokalisation (laut IMGT/V-QUEST & ENSEMBL; Ruiz et al 1999) auf der X-Achse.**

Die ersten 14 IgHV Gene von links stellen copy number variations (Watson und Breden, 2012; Watson et al., 2013) dar und zeigen eine deutlich niedrigere Frequenz; berechnet von PD Dr. Andreas Recke anhand eines ungerichteten, gemischten Kugelmodell basierend auf Textmining Algorithmen und der von Mises Fisher Verteilung movMF [Version 0.2.2 R Cran; (Banerjee et al., 2005)]

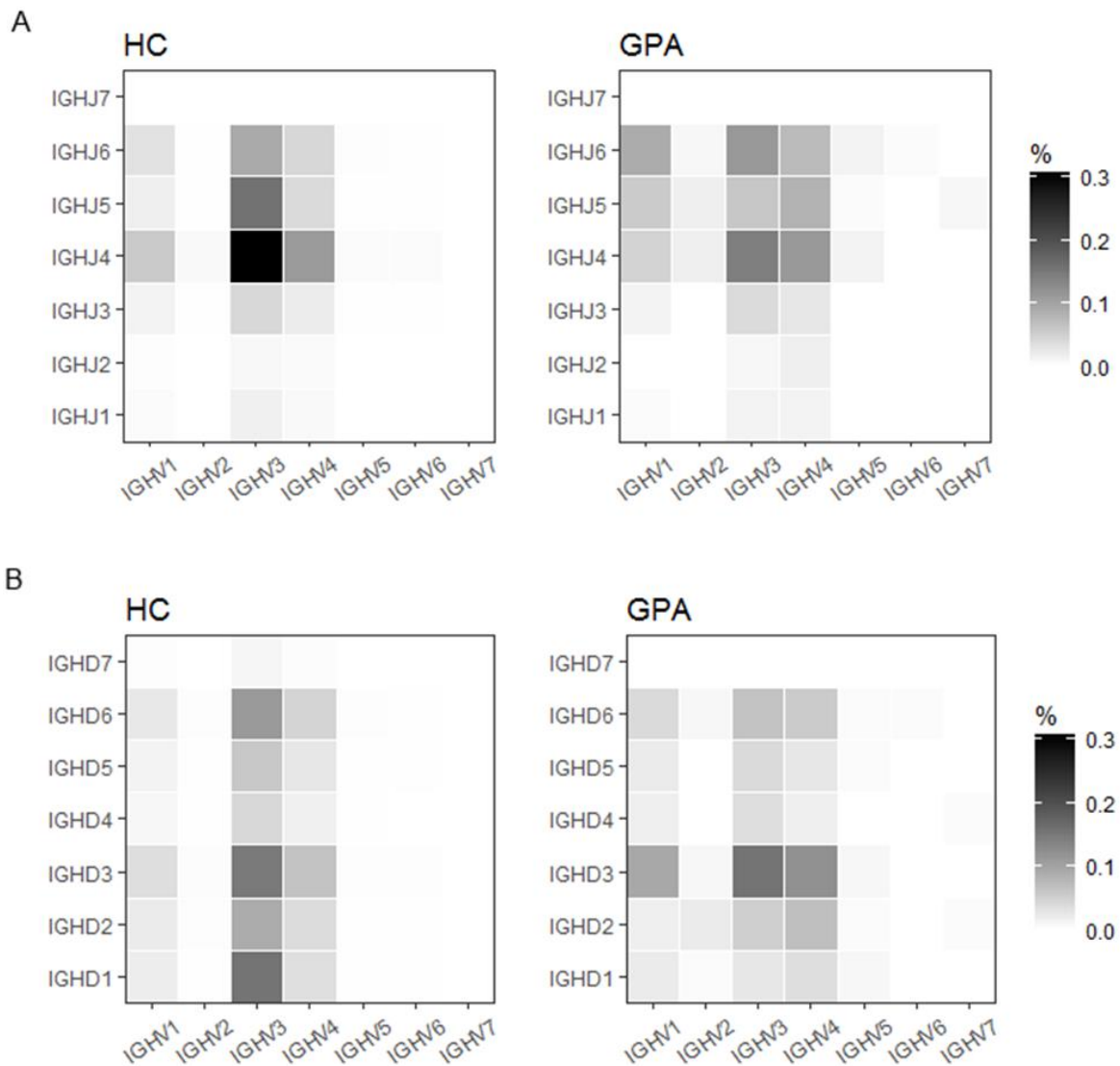
Verteilungsunterschiede in der IgHJ-Genfrequenz wurden analog zu den Verteilungsunterschieden in der IgHV-Genfrequenz untersucht. Die beiden Direktionen A und B unterschieden sich diesmal mit einem P-Wert von 0,0502 laut der von MisesFisher Verteilung (Abb. 21). In Direktion A fanden sich mehr als die Hälfte der GPA Patienten und zwei Gesunde, bei denen im Vergleich zu Direktion B eine Verschiebung von IgHJ4 zu IgHJ5 und IgHJ6 auftrat.



**Abbildung 21: Unterschiedliche IgHJ Familiengen – Frequenz zwischen peripheren, klonalen, produktiven IGHV Genen (n=244353/15) gesunder Probanden und klonalen, produktiven IGHV Genen (n=231/15) aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA.**

Berechnet von PD Dr. Andreas Recke anhand eines ungerichteten, gemischten Kugelmodells basierend auf Textmining Algorithmen und der von Mises Fisher Verteilung movMF (Version 0.2.2 R Cran; (Banerjee et al., 2005))

Die Heatmaps der IgHJ/IgHV Verteilung (Abb. 22 A) stehen in Einklang mit den Daten der IgHJ Familiengenfrequenz (Abb. 21). Die Heatmaps der IgHD/IgHV Verteilung (Abb. 22 B) zeigen weniger deutliche Unterschiede zwischen HC und GPA.

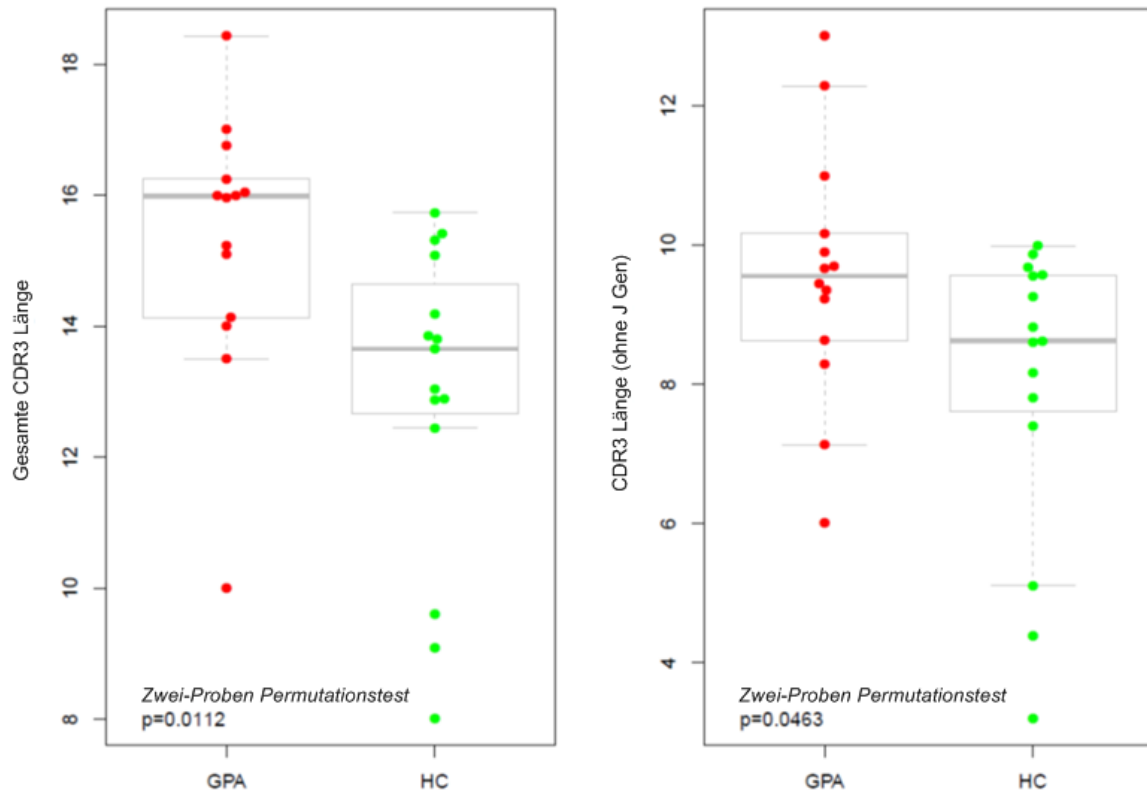


**Abbildung 22:** Heatmaps mit Verteilungsmustern und Häufigkeiten (%) von IgHJ/IgHV Gen-Gen-Kombinationen (A) und von IgHD/IgHV Gen-Gen-Kombinationen (B) von peripheren, funktionellen, klonalen Sequenzen gesunder Probanden (n=244353/15) und von funktionellen, klonalen Sequenzen aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (231/15).

Berechnet von Olena Ohlei unter Einbezug der Funktion `sequences.geneComb` aus dem R-Paket `bcprep` (Bischof und Ibrahim, 2016)

### 6.3.3 Verlängerte CDR3-Region bei der GPA mit und ohne Berücksichtigung der IgHJ-Gensegmente

Die IgHV Gene zeigten eine Verlängerung der CDR3-Region bei der GPA im Vergleich zu Gesunden (Abb. 23). Die Daten weisen darauf hin, dass die Veränderungen im IgHJ-Genrepertoire dazu beitragen. Die Verlängerung der CDR3-Region bei der GPA im Vergleich zu HC ohne Berücksichtigung des IgHJ Genanteils war weiterhin signifikant unterschiedlich, sodass andere Einflussfaktoren nicht auszuschließen sind.



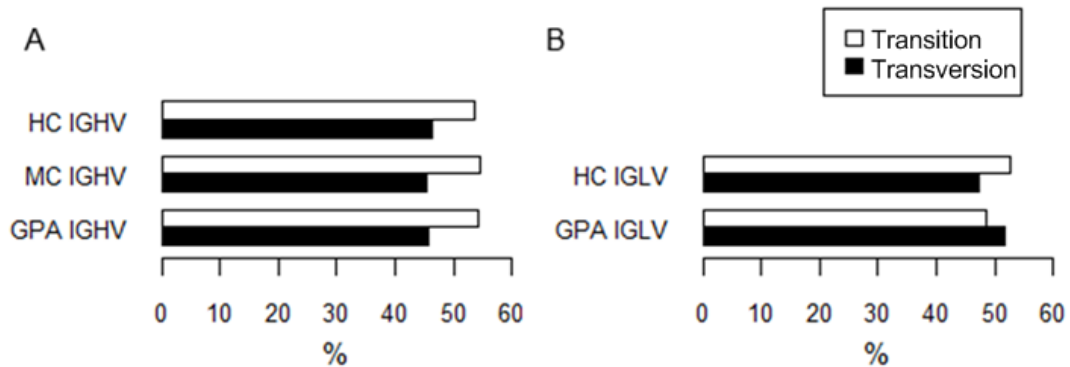
**Abbildung 23: Verlängerte CDR3-Region in Aminosäuren mit und ohne Einschluss der IGHJ Region in klonalen, funktionellen IgHV Genen aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (n=231/15) im Vergleich zu peripheren, klonalen, funktionellen IgHV Genen aus gesunden Probanden (n=244353/15).**

Berechnet von PD Dr. Andreas Recke mit dem Permutationstest aus dem R-Paket perm (Version 1.0 – 0.0 R Cran, (Fay und Shaw, 2010)) und der Funktion permTS

#### 6.3.4 Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Art und Anzahl der Nukleotidmutationen zwischen GPA und HC

Im Hinblick auf die Häufigkeit und das Muster von Transitions- und Transversionsmutationen fanden sich zwischen HC und GPA keine Unterschiede (Abb. 24). Funktionelle, klonale IgLV Gene bei der GPA zeigten mehr Transversionen als Transitionen, aber dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant. Hinsichtlich der Anteile der vier Nukleotide an den Mutationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen funktionellen oder nicht funktionellen IgHV/IgLV Genen bei der GPA und Gesunden (Abb. 25). Auf die Darstellung nicht-funktionaler IgLV Gene bei der GPA wurde auf Grund der geringen Zahlen verzichtet (drei Sequenzen mit drei Mutationen zu T).

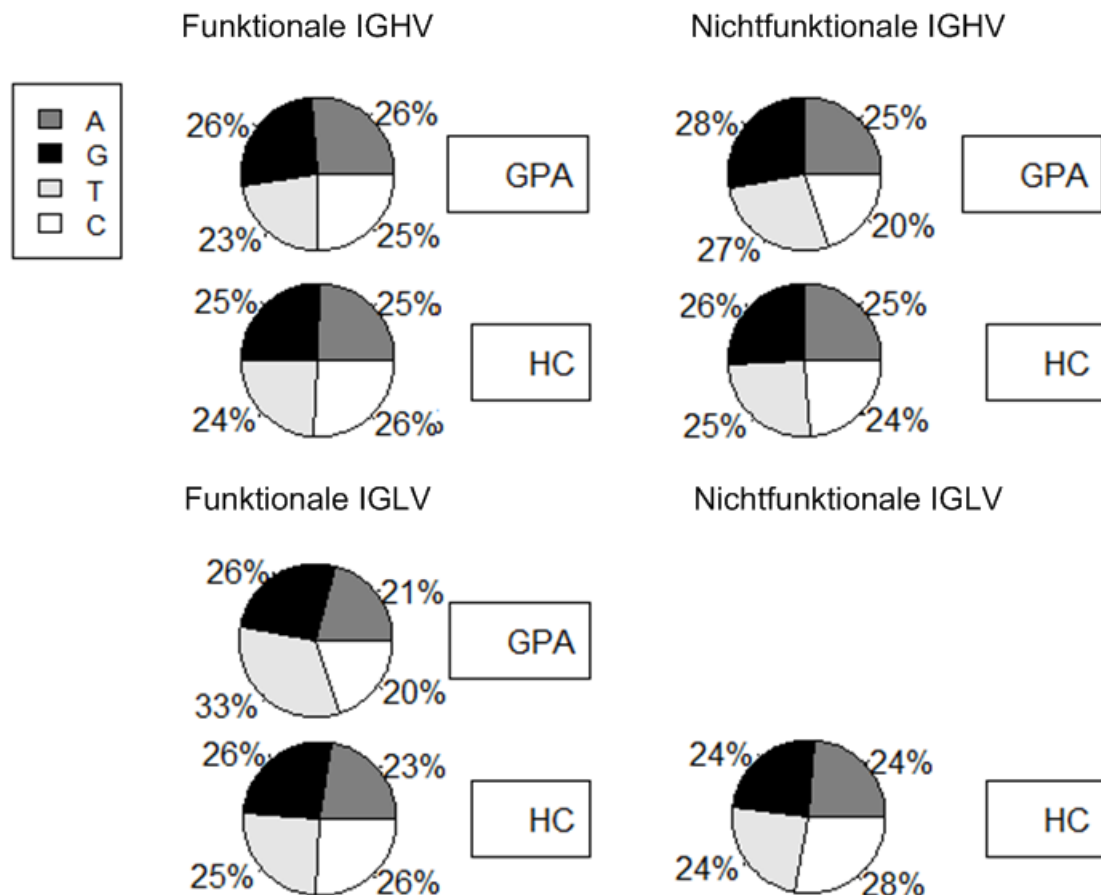
Die exakten Ergebnisse des Pearsons  $X^2$  Testes unter einem Signifikanzniveau von 5 % mit Odds Ratio und Kontingenzkoeffizienten zur Beurteilung der Effektrichtung bzw. -stärke befinden sich im Anhang und wurden mit einem online calculator<sup>13</sup> ermittelt.



**Abbildung 24: Transitions- und Transversionsmutationen (%) folgender Gruppen.**

Klonale, funktionelle, periphere IgHV Gene von Gesunden (n=244353/15); Funktionale IgHV Gene aus der Darmmukosa gesunder Probanden (n=29/8) (Quelle: (Boursier et al., 1999)); Klonale, funktionelle IgHV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (n=231/15); Funktionelle, klonale IGLV Gene aus dem Knochenmark und Blut gesunder Probanden (n=148/5) (Quelle: (Abraham et al., 2007)); Klonale, funktionelle IGLV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien bei der GPA (n=18/7); Berechnet von Olena Ohlei mit der Funktion `basen_mutation` aus dem R-Paket `BCellIMA` (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016)) in Analogie zu (Zuckerman et al., 2010)

<sup>13</sup> Interactive Statistical Pages project (ohne Jahr)  
 JavaStat -- 2-way Contingency Table Analysis  
<http://statpages.info/ctab2x2.html>  
 (Stand: 12.06.2018)

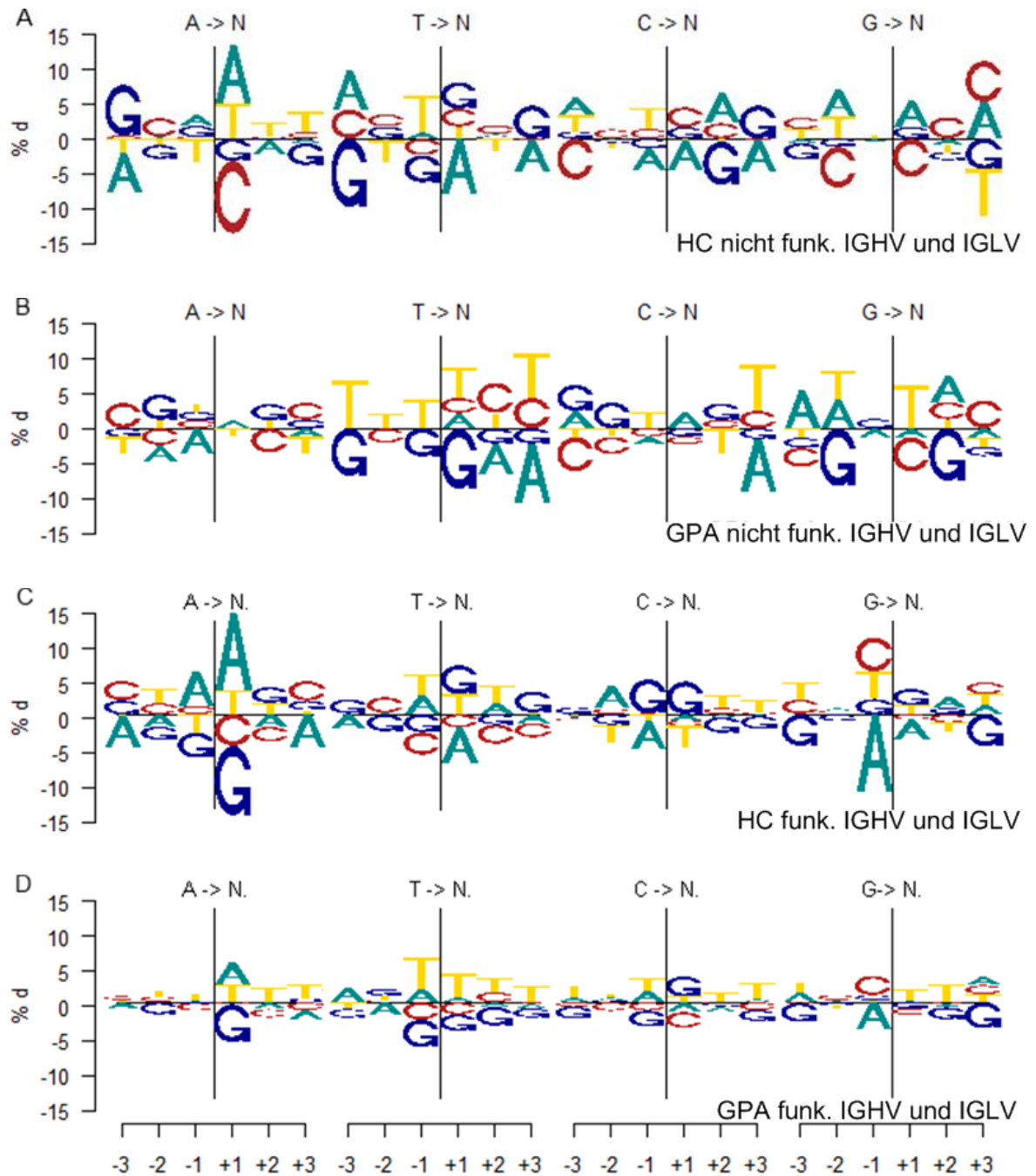


**Abbildung 25: Nukleotidmutationen (%) folgender Gruppen.**

Mit # Anzahl aller Mutationen: klonale, funktionelle, periphere IgHV Gene von Gesunden (n=244353/15, #4922892); klonale, funktionelle IgHV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (n=231/15, #3715); funktionelle, klonale IGLV Gene aus dem Knochenmark und Blut gesunder Probanden (n=148/5, #2270) (Quelle: (Abraham et al., 2007)); klonale, funktionelle IGLV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien bei der GPA (n=18/7, #157); nicht-funktionale, periphere IgHV Gene von Gesunden (n=439433/15, #8774508); nicht-funktionale IgHV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (n=20/6, #298); nicht-funktionale IGLV Gene aus Blut und Knochenmark von Gesunden (n=23/5, #398); berechnet von Olena Ohlei mit der Funktion `basen_mutation` aus dem R-Paket `BCellMA` (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016)) in Analogie zu (Zuckerman et al., 2010)

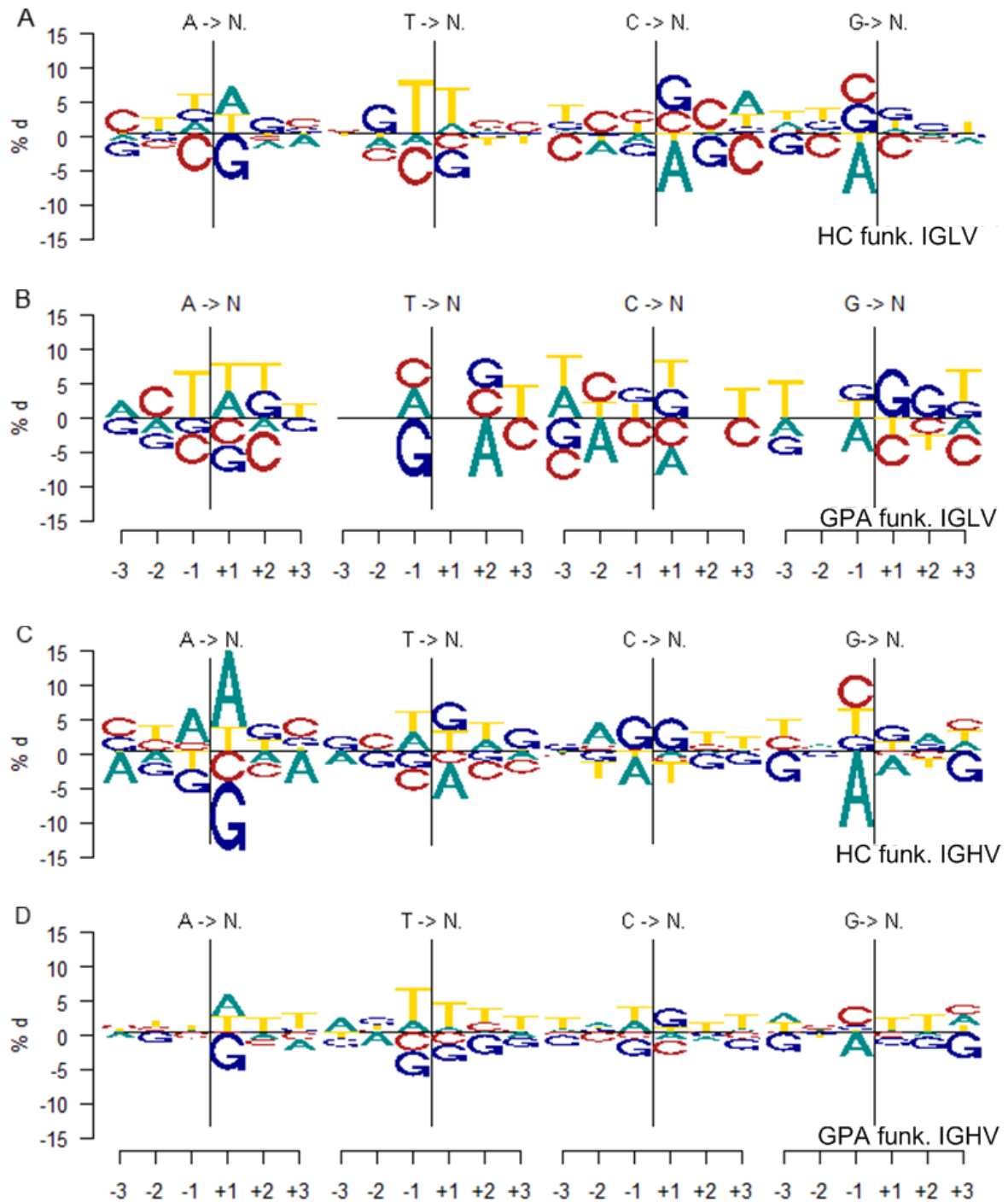
### 6.3.5 Hot Spot Motive in IgHV/IgLV Genen bei der GPA und der HC

Die Anwesenheit von DNA Motiven (sechs Basen um eine zentrale, definierte Punktmutation, sogenannte "Hot Spots") wurde analog zu der beschriebenen Herangehensweise bei (Zuckerman et al., 2010) untersucht. Für die Punktmutationen von „A“ bzw. „T“ sind die Hot Spot Motive  $W\bar{A}$  bzw.  $\bar{I}W$  oder  $W\bar{A}W$  bzw.  $W\bar{I}W$  bekannt (Spencer und Dunn-Walters, 2005; Zuckerman et al., 2010). Für die Punktmutationen „C“ bzw. „G“ sind die Hot Spot Motive  $WR\bar{C}H$  und  $DG\bar{Y}W$  bekannt und gelten als bessere Vorhersage als  $WRCY$  bzw.  $RGYW$  (Rogozin und Diaz, 2004). Um den Einfluss von selektiver Anpassung an (Auto-)Antigene auf die Herausbildung von Hot Spots zu erfassen, wurden nicht-funktionelle und funktionelle IgHV/IgLV Gene untersucht. Funktionelle IgHV und IGLV Gene wurden sowohl zusammengefasst (Abb. 26) als auch separat (Abb. 27) betrachtet.



**Abbildung 26: DNA Motive (sechs Nukleotidbasen um eine zentrale, definierte Punktmutation, Hot Spots):  $WAW$ ,  $WTW$ ,  $WRCH$  und  $DGYW$  in nicht-funktionellen (A, B) oder funktionellen (C, D) IGHV und IGLV Genen von Gesunden oder GPA Patienten.**

Auf der X-Achse werden die Positionen drei Basen vor (+1, +2, +3) und drei Basen nach (-1, -2, -3) der zentralen Punktmutation „A“, „T“, „C“ oder „G“ dargestellt. Auf der Y-Achse wird die prozentuale Differenz (%d) in Form der Größe jeder Base angegeben. Der Wert gibt an wie oft die Base an der entsprechenden Position abweichend vom Keimbahnen vorkommt, dabei bedeuten positive Werte einen relativen Überschuss und negative Werte einen relativen Mangel. A: (n=439433 IgHV; n=23 IGLV), B: (n=20 IgHV, n=3 IGLV), C: (n=244353 IgHV, n=148 IGLV), D (n=231 IgHV, n=18 IGLV); IUPAC Nomenklatur der Basen: W (A/T), R (A/G), Y (C/T), H (T/C/A), D (A/G/T); berechnet von Olena Ohlei mit Funktionen aus dem R-Paket BCellMa (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016))

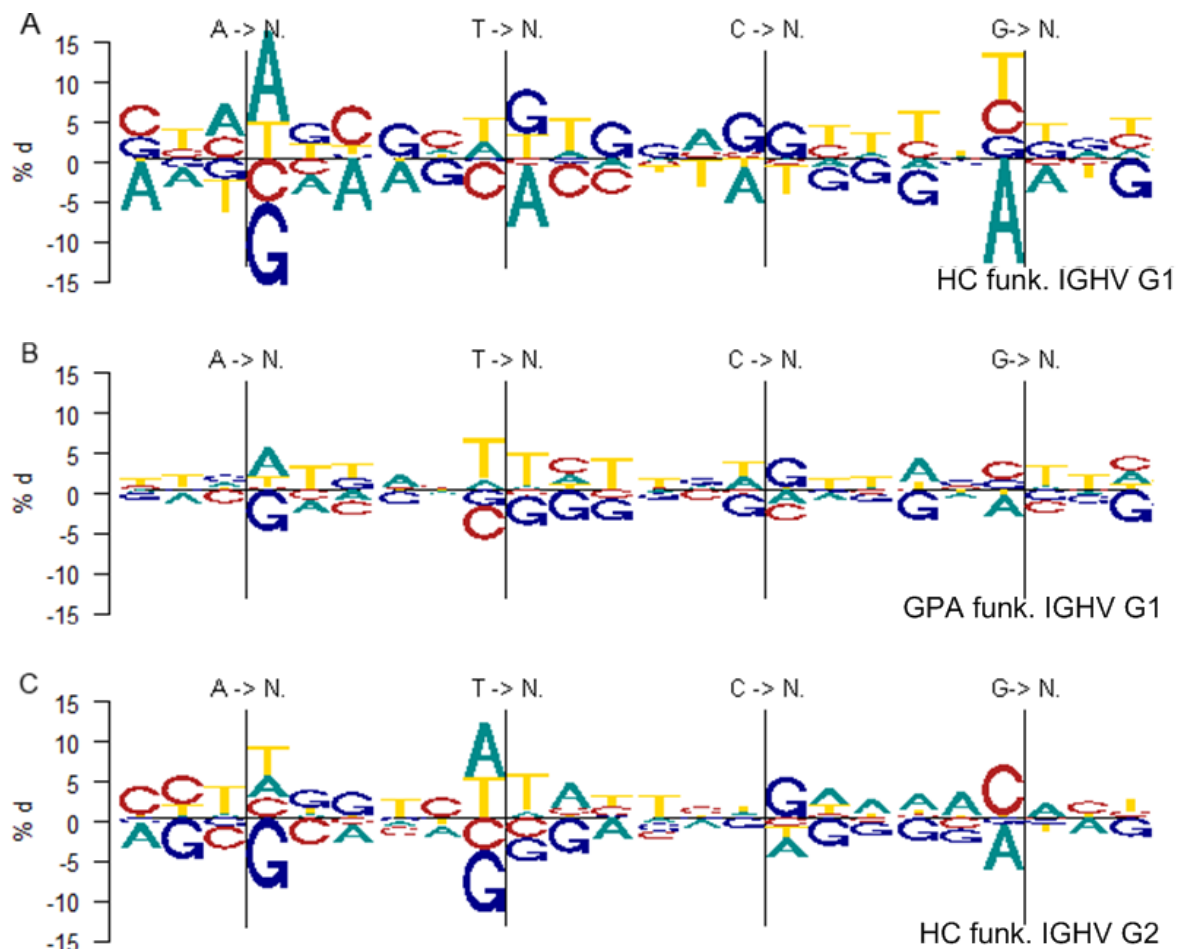


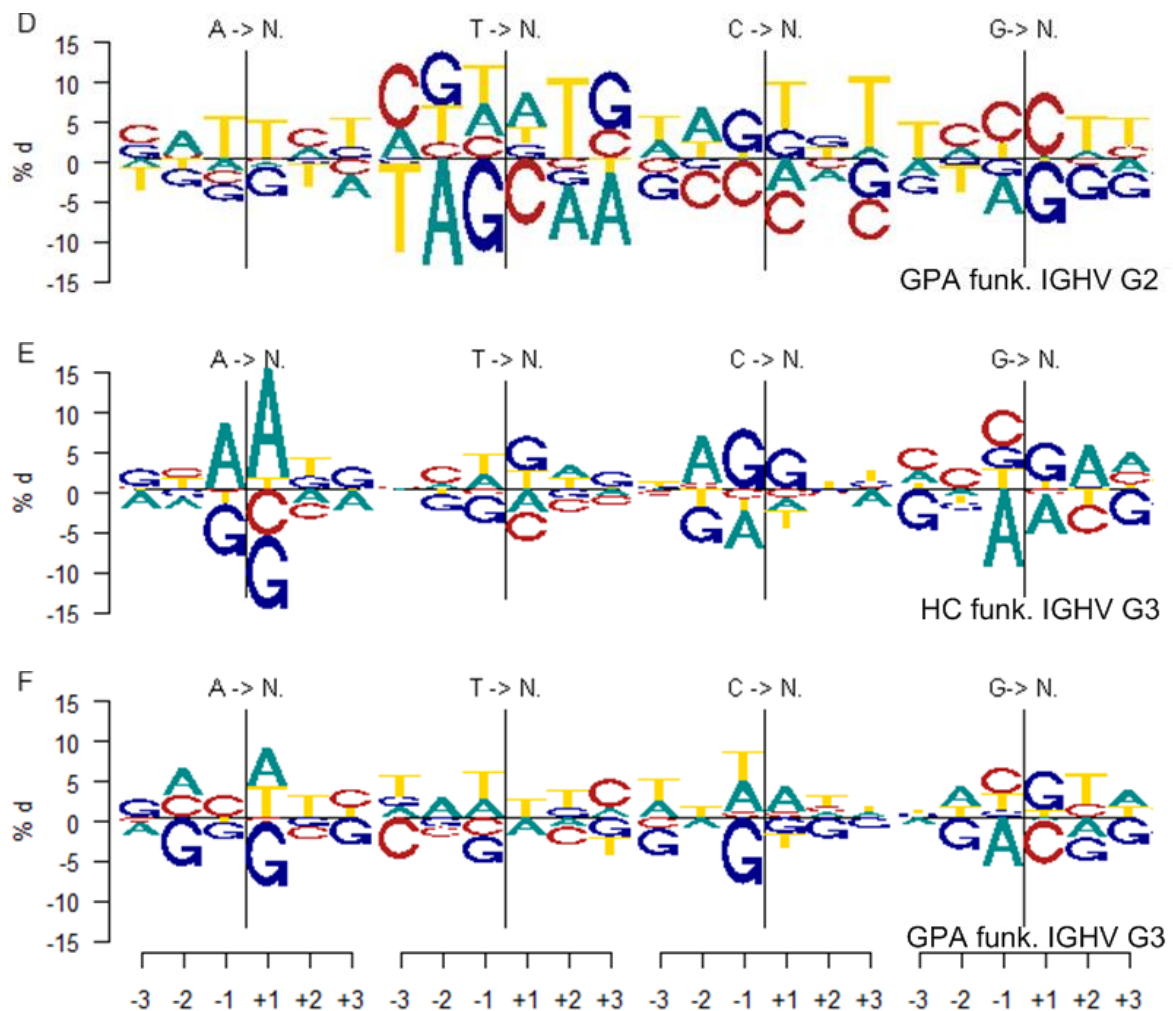
**Abbildung 27: DNA Motive von sieben Basen mit einer zentralen, definierten Punktmutation überprüft auf die Anwesenheit bekannter Hot Spots: WAW, WTW, WRCH und DGYW in funktionellen IgHV und IgLV Genen von Gesunden oder GPA Patienten.**

Auf der X-Achse werden die Positionen drei Basen vor (+1, +2, +3) und drei Basen nach (-1, -2, -3) der zentralen Punktmutation „A“, „T“, „C“ oder „G“ dargestellt. Auf der Y-Achse wird die prozentuale Differenz (%d) in Form der Größe jeder Base angegeben. Der Wert gibt an wie oft die Base an der entsprechenden Position abweichend vom Keimbahngen vorkommt, dabei bedeuten positive Werte einen relativen Überschuss und negative Werte einen relativen Mangel. A: (n=148), B: (n=18), C: (n=244353), D (n=231); IUPAC Nomenklatur der Basen: W (A/T), R (A/G), Y (C/T), H (T/C/A), D (A/G/T); berechnet von Olena Ohlei mit Funktionen aus dem R-Paket BCellMa (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016))

Das Motiv WAW findet sich sowohl in den funktionellen als auch den nicht-funktionellen IgHV und IgLV Genen bei Gesunden, wobei an der Position -1 ein Mangel von „T“ vorlag

(Abb. 26). Im Gegensatz dazu war das Motiv WAW in den nicht-funktionellen bzw. funktionellen IgHV und IgLV Genen bei der GPA nicht bzw. kaum vorhanden. Das Motiv WAW war in den funktionellen IgLV Genen bei der GPA vorhanden (Abb. 27), möglicherweise in Zusammenhang mit einer signifikant (\*) erhöhten Punktmutationsrate zu „T“ (Abbildung 25 und Anhang). Das Motiv WTW bildete sich in nicht-funktionellen und funktionellen IgHV und IgLV Genen bei Gesunden und bei der GPA heraus (Abb. 26). Bei Gesunden lag ein Mangel von „A“ an der Position +1 vor. Die Herausbildung der spiegelbildlichen Motive WRCH und DGYW in nicht-funktionellen und funktionellen IgHV und IgLV Genen bei Gesunden und GPA-Patienten wurde kaum beobachtet. Nur in nicht-funktionellen IgHV und IgLV Genen bei der GPA bildete sich das Motiv DGYW klarer heraus (Abb. 26), möglicherweise in Zusammenhang mit mehr Mutationen zu "D" (Abb. 25). Um herauszufinden, ob die gemischte Analyse von Immunglobuling-Genen die Herausbildung von Hot Spot Motiven verdeckt bzw. beeinflusst, wurden funktionelle IgHV Gene bei der GPA entsprechend Ihrer Herkunftszelle in drei Gruppen separiert: G1 (Gewebe), G2 (CD20<sup>+</sup> B-Zellen) und G3 (CD138<sup>+</sup> B-Zellen). Als gesunde Kontrollen wurden gleichfalls die Gruppen G1-3 gebildet, die in Alter, Geschlecht und Probandenanzahl angepasst waren (Abb. 28).





**Abbildung 28:** DNA Motive von sieben Basen mit einer zentralen, definierten Punktmutation überprüft auf die Anwesenheit bekannter Hot Spots: WAW, WTW, WRCH und DGYW in funktionellen IgHV und IgLV Genen von Gesunden (n=244353) oder GPA Patienten (n=321) sortiert in drei Gruppen entsprechend Ihrer Herkunftszelle bei der GPA: G1 (Gewebe), G2 (CD20+ B-Zellen) und G3 (CD138+ B-Zellen).

Als gesunde Kontrollen wurden drei Gruppen gebildet, die in Alter, Geschlecht und Probandenanzahl angepasst waren. Auf der X-Achse werden die Positionen drei Basen vor (+1, +2, +3) und drei Basen nach (-1, -2, -3) der zentralen Punktmutation „A“, „T“, „C“ oder „G“ dargestellt. Auf der Y-Achse wird die prozentuale Differenz (%d) in Form der Größe jeder Base angegeben. Der Wert gibt an wie oft die Base an der entsprechenden Position abweichend vom Keimbahngen vorkommt, dabei bedeuten positive Werte einen relativen Überschuss und negative Werte einen relativen Mangel. IUPAC Nomenklatur der Basen: W (A/T), R (A/G), Y (C/T), H (T/C/A), D (A/G/T); berechnet von Olena Ohlei mit Funktionen aus dem R-Paket BCellMa (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016))

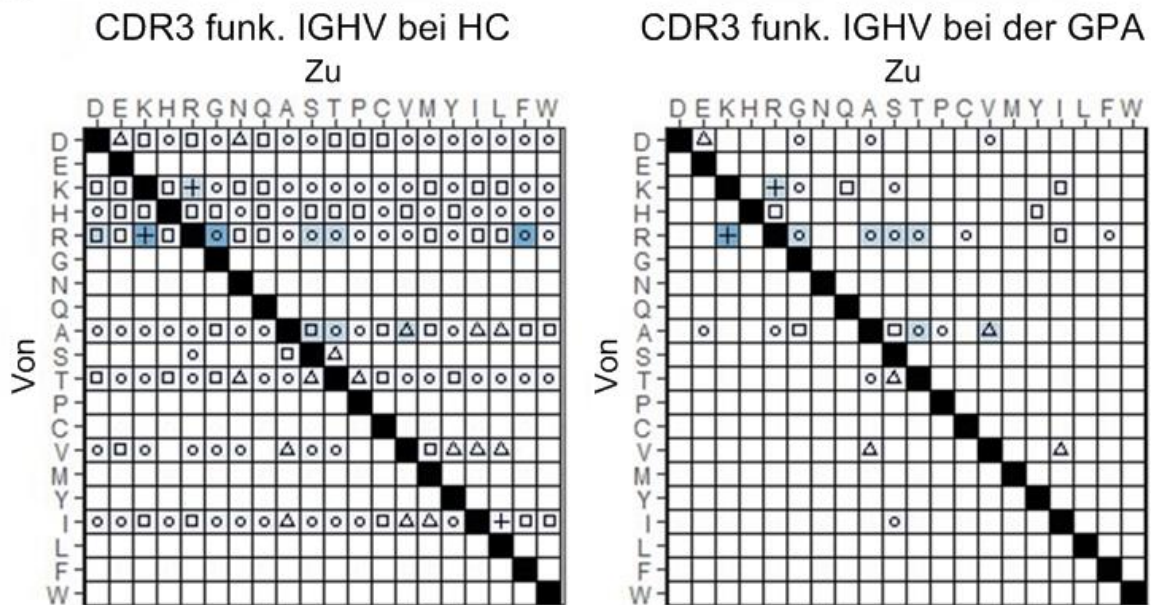
Das Motiv WAW war in allen Gruppen der IgHV Gene von Gesunden zu finden mit einem leichten Mangel von "T" an der Position -1. Bei der GPA wurde WAW in Gruppe G2 (CD20+ B-Zellen) nachgewiesen (Abb. 28), wobei besonders an der Position -1 "W" nicht in den Gruppen G1 (Gewebe) und G3 (CD138+ B-Zellen) gefunden wurde. Das Motiv WTW konnte in den separaten Gruppen G1-3 funktioneller IgHV und IgLV Gene bei der GPA und bei Gesunden gefunden werden, wobei ein gewisser Mangel von "A" an der Position +1 vorlag (Abb. 28). Das Motiv WRCH war abwesend in funktionellen IgHV Genen bei Gesunden der Gruppen G1 und G2, zeigte sich jedoch teilweise in Gruppe G3 (Abb. 28). Bei der GPA

zeigte sich das Motiv WRQH bedingt in den funktionellen IgHV Genen der Gruppe G2 (CD20<sup>+</sup> B-Zellen) und teilweise in Gruppe G3 (CD138<sup>+</sup> B-Zellen), jedoch nicht in Gruppe G1 (Gewebe). Punktmutationen von „G“ führten nur teilweise zur Herausbildung des Motivs DGYW in IgHV Genen bei Gesunden in den Gruppen G1 und G3, fehlte jedoch vollständig in Gruppe G2 (Abb. 28). Innerhalb der GPA Gruppen G1 bis G3 funktioneller IgHV Gene war das Motiv DGYW gerade in G2 (CD20<sup>+</sup> B-Zellen) vorhanden, wobei an Position -1 D nicht zu erkennen war.

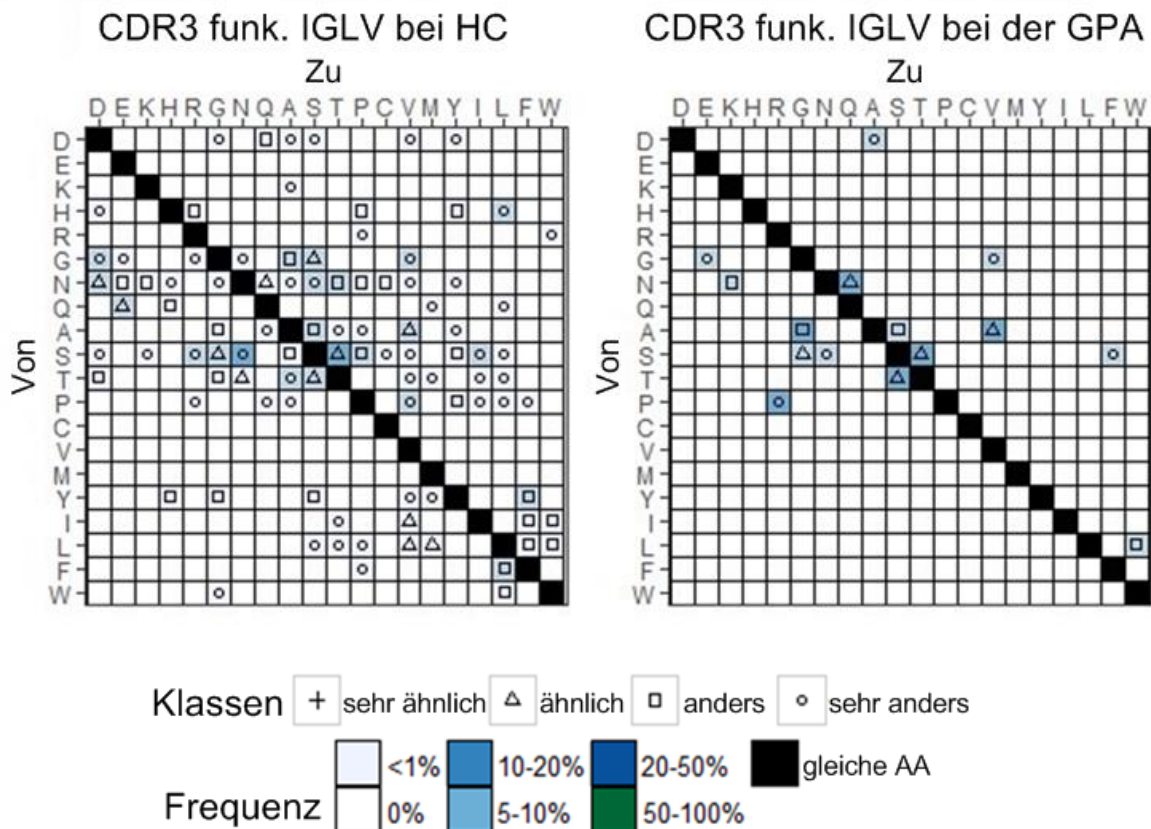
### 6.3.6 Aminosäureaustausche in der CDR3 von IgHV & IgLV-Genen bei der GPA und der HC

Aminosäureaustausche bzw. Substitutionen von Aminosäuren wurden mit einer in der Literatur beschriebenen Herangehensweise (Zuckerman et al., 2010) untersucht. Dabei wurden die Substitutionen mit einer Frequenz  $\geq 5\%$  in der CDR3-Region von IgHV und IgLV zwischen HC und GPA verglichen (Abb. 29, tabellarische Übersicht im Anhang).

A



B



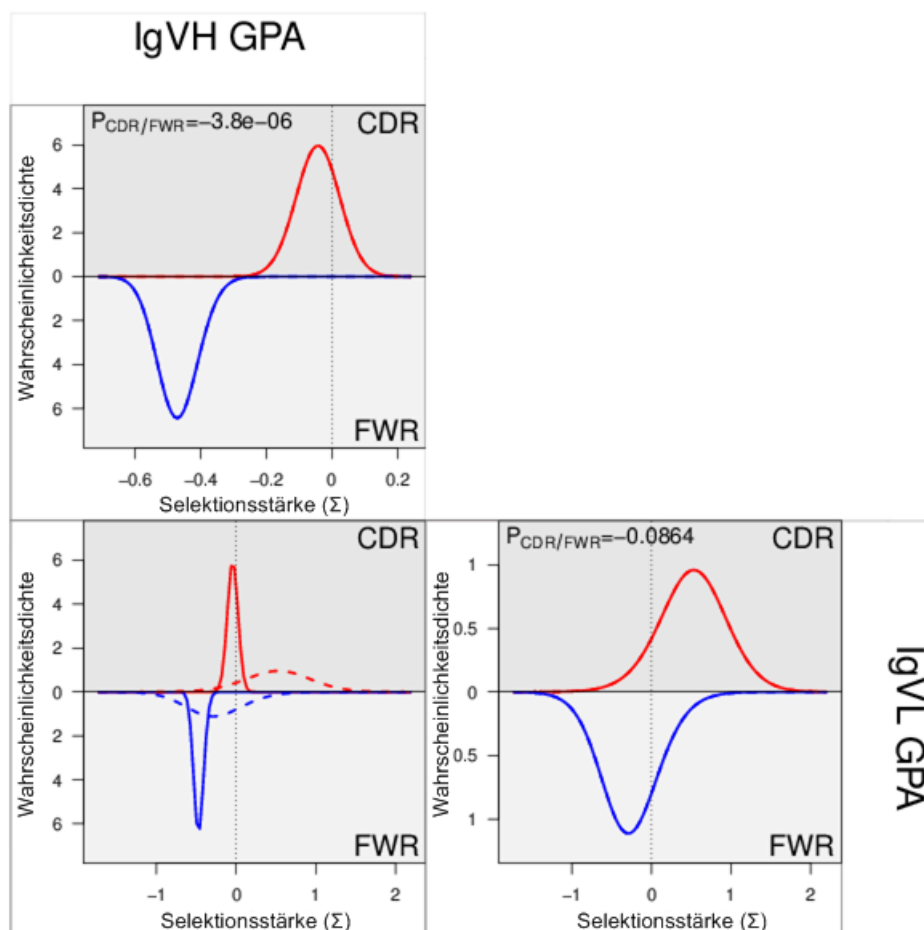
**Abbildung 29: Frequenz der Substitutionen funktioneller IgHV und IgLV Gene aus den folgenden Gruppen.**

Periphere, klonale IgHV Gene gesunder Probanden (n=244353/15); Klonale IgHV Gene nasaler Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (n=231/15); Klonale IgLV Gene aus Blut und Knochenmark gesunder Probanden (n=148/5); Klonale IgLV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien bei der GPA (n=18/7); die Reihen zeigen die bestehende Aminosäure und die Spalten die resultierende Aminosäure, die nach der Hydrophobizität entsprechend der Oktanolkala (IMGT/V-QUEST) sortiert wurden; die Zuordnung der Substitutionen in Klassen wurde anhand physikochemischer Eigenschaften (IMGT/V-QUEST) getroffen; die Farbe der Quadrate repräsentiert die durchschnittliche Frequenz dieses Aminosäuren-Austausches normalisiert auf die Länge und Anzahl der Sequenzen; berechnet von Olena Ohlei mit Funktionen aus dem R-Paket BCellMa (Version 0.3.4 R Cran, (Ohlei, 2016))

Bei den IgHV Genen war eine der acht Substitutionen mit einer Frequenz  $\geq 5\%$  bei der GPA im Vergleich zu Gesunden erhöht. Bei den IgLV Genen waren neun der fünfzehn Substitutionen mit einer Frequenz  $\geq 5\%$  bei der GPA im Vergleich zu Gesunden erhöht, wobei drei dieser Substitutionen zu negativ oder positiv geladenen Aminosäuren führten. Eine weitere Aminosäure-Austausch mit einer Frequenz  $\geq 5\%$  bei der GPA war bei den Gesunden nicht vorhanden. Eine anderer Aminosäure-Austausch der fünfzehn Substitutionen mit einer Frequenz  $\geq 5\%$  bei der GPA war im Vergleich zu HC verringert, vier Substitutionen mit einer Frequenz  $\geq 5\%$  waren zwischen HC und GPA unverändert.

### 6.3.7 Negative Selektion in der Rahmenregion von IgHV Genen bei der GPA

Unter Selektion versteht man eine signifikante Abweichung in der Anzahl an Austauschmutationen einer Region von IgHV/IgLV Genen in Folge eines Anpassungsprozesses an ein Antigen. Um die Selektionsstärke von Mutationen zu quantifizieren wurde der Baseline-Algorithmus Version 1.3 (Yaari et al., 2012, 2013) benutzt. Grundsätzlich war die negative Selektion in der Rahmenregion (FWR) von IgHV Genen aus entzündetem GPA-Gewebe mit  $P \leq 0,005$  (Abb. 30, Tab. 34) am deutlichsten. IgLV Gene aus entzündetem GPA-Gewebe zeigten mit  $P > 0,1$  nur einen Trend zur positiven Selektion in der komplementaritäts determinierender Region (CDR) (Abb. 30, Tab. 35), was an der niedrigen Sequenzanzahl ( $n=18$ ) liegen könnte.



**Abbildung 30: Selektionsstärke  $\Sigma$  dargestellt als Wahrscheinlichkeitsfunktion in der CDR (rote Linie) und in der FWR (blaue Linie) funktioneller IgHV Gene (oben links) und IgLV Gene (unten rechts) aus entzündetem GPA Gewebe mit dem Baseline Algorithmus.**

Unten links ist eine Zusammenfassung funktioneller IgHV (durchgezogene Linie) und IgLV Gene (gestrichelte Linie)

**Tabelle 34: P-Werte der quantifizierten Selektion in IgHV Genregionen (FWR, CDR) nach dem Baseline-Algorithmus.**

pos. Selektion = erhöhte Rate an Austauschmutationen; neg. Selektion = erniedrigte Rate an Austauschmutationen; FWR: Rahmenregion; CDR: komplementäre, determinierende Region

Gruppe	neg. Selektion in FWR	neg. Selektion in CDR	pos. Selektion in CDR
<b>GPA Gewebe, n=177</b>	≤0,005	>0,1	
GPA Gewebe, n=69, Krankheitsdauer <2 Jahre	≤0,005	≤0,005	
GPA Gewebe, n=108, Krankheitsdauer > 2 Jahre	≤0,005		>0,1
<b>B Zellen (CD20<sup>+</sup>), n=38</b>	>0,1		>0,1
B Zellen (CD20 <sup>+</sup> ), n=27, Krankheitsdauer < 2 Jahre	>0,1	>0,1	
B Zellen (CD20 <sup>+</sup> ), n=11, Krankheitsdauer > 2 Jahre	>0,1		>0,1
<b>Plasmazellen (CD138<sup>+</sup>), n=38, Krankheitsdauer &lt;2 Jahre</b>	≤0,05	>0,1	
<b>alle GPA IgHV Gene, n=253</b>	≤0,005	>0,1	

**Tabelle 35: P-Werte der quantifizierten Selektion in IgLV Genregionen (FWR, CDR) nach dem Baseline-Algorithmus.**

pos. Selektion = erhöhte Rate an Austauschmutationen; neg. Selektion = erniedrigte Rate an Austauschmutationen; FWR: Rahmenregion; CDR: komplementäre, determinierende Region

Gruppe	neg. Selektion in FWR	pos. Selektion in CDR	pos. Selektion in FWR
<b>B Zellen (CD20<sup>+</sup>), n=12</b>	>0,1	>0,1	
B Zellen (CD20 <sup>+</sup> ), n=6, Krankheitsdauer < 2 Jahre		>0,1	>0,1
B Zellen (CD20 <sup>+</sup> ), n=7, Krankheitsdauer > 2 Jahre	≤0,005	>0,1	
<b>Plasmazellen (CD138<sup>+</sup>), n=5, Krankheitsdauer &lt;2 Jahre</b>	>0,1	>0,1	
<b>alle GPA IgLV Gene, n=18</b>	>0,1	>0,1	

Sortierte man die IgHV/IgLV Gene entsprechend der Krankheitsdauer der GPA Patienten und/oder ihrer Herkunftszelle in die drei Gruppen G1 (Gewebe), G2 (CD20<sup>+</sup> B-Zellen) und G3 (CD138<sup>+</sup> B-Zellen), wurden weitere Effekte sichtbar. Die negative Selektion in der Rahmenregion von IgHV Genen verschwand in G2 (CD20<sup>+</sup> B-Zellen), blieb jedoch in G1 (Gewebe) und G3 (CD138<sup>+</sup>) signifikant. Mit fortschreitender GPA-Erkrankung (> 2 Jahre) konnte ein Trend (P>0,1) zur positiven Selektion in der CDR von IgHV Genen beobachtet werden. Bei den IgLV Genen konnte mit fortschreitender GPA-Erkrankung (> 2 Jahre) in Gruppe G2 (CD20<sup>+</sup> B-Zellen) ein Wechsel in der Rahmenregion (FWR) von eher positiver Selektion (P>0,1) zu negativer Selektion (P≤0,005) beobachtet werden.

### 6.3.8 Keine erhöhte Anzahl von *S. aureus* spezifischen IgHV Genen im entzündeten Gewebe bei der GPA (*in-silico* Analyse)

IgHV Gene aus entzündlichem GPA-Gewebe, IgHV Gene aus gesunder Darmmukosa und periphere IgHV Gene gesunder Probanden wurden *in silico* auf eine mögliche, spezifische Interaktion der Rahmenregion im Fab-Teil mit der Domäne D des Virulenzfaktors SpA aus *S. aureus* untersucht. Zum Vergleich herangezogen wurde ein identisches Aminosäure-Muster an spezifischen Stellen humanen IgHV Genen, welche involviert ist in die Erkennung der *S. aureus* Domäne D des SpA Peptides (Graille et al., 2000). Das spezifische Erkennungsmuster für *S. aureus* in der Aminosäuresequenz von IgHV Genen wurde zur einheitliche Klassifizierung und Nummerierung nach Kabat angegeben. Daher wurden die zu vergleichenden IgHV Genen mit dem frei verfügbaren ANARCI online-Werkzeug (Dunbar und Deane, 2016) nach der Klassifizierung von Kabat durchnummeriert. Da 7 % der IgHV Sequenzen aus dem Blut gesunder Probanden, 38 % der IgHV Sequenzen aus der Darmmukosa gesunder Probanden und 87 % der IgHV Sequenzen aus GPA-Gewebe nach der ersten Aminosäure des Motivs H15 begannen, wurde auch der Anteil eines verkürzten Motivs untersucht.

**Tabelle 36: Überblick absoluter (abs.) und relativer (rel.) Anteile nicht-klonalen IgHV Gene mit dem Erkennungsmuster für *S. aureus* (Graille et al., 2000) nach Kabat Nummerierung (Dunbar und Deane, 2016) verschiedener Gruppen.**

HC Blut (Brezinschek et al., 1995), HC Duodenum (Boursier et al., 1999), GPA Gewebe (Mueller et al., 2014; Voswinkel et al., 2006, 2008a); H15 fehlt = erste Aminosäure des Motivs fehlte bei nachfolgendem Sequenzbeginn und sonst identischem Motiv

	periphere CD19 <sup>+</sup> B-Zellen				Darmmukosa				entzündliche Gewebsläsionen in GPA-Patienten			
	gesundes Probanden (n=68)		Probanden		gesunder Probanden (n=29)		Probanden		GPA-Patienten (n=247, n=6 nicht Kabat identifiziert)		GPA-Patienten	
	identisch	H15 fehlt	identisch	H15 fehlt	identisch	H15 fehlt	identisch	H15 fehlt	identisch	H15 fehlt	identisch	H15 fehlt
Familie	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
alle	42	62 %	2	3 %	1	3 %	-	-	4	2 %	54	22 %
IgHV1	6	9 %	1	1 %	-	-	-	-	-	-	10	4 %
IgHV2	2	3 %	-	-	-	-	-	-	2	1 %	-	-
IgHV3	27	40 %	1	1 %	-	-	-	-	-	-	32	13 %
IgHV4	7	10 %	-	-	1	3 %	-	-	-	-	12	5 %
IgHV5	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1 %	-	-
IgHV6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgHV7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Der Anteil an IgHV Genen mit dem *S. aureus* Motiv im Blut gesunder Probanden mit 62 % am höchsten (Tab. 36). In der Darmmukosa gesunder Probanden zeigten nur 3 % der IgHV Gene ein solches Muster. Betrachtet man die IgHV Gene aus entzündlichem GPA-Gewebe, so sind nur 2 % mit einem solchem Muster versehen, wobei 22 % das Motiv auf Grund

eines nachfolgenden Sequenzbeginns bis auf die erste Aminosäure H15 aufwiesen. Wie bei (Graille et al., 2000) beschrieben, kam das Motiv am häufigsten in Familie IgHV3 vor.

#### 6.4 Humane und murine anti-hPR3 Ig ähneln sich im V(D)J Rearrangement und unterscheiden sich in der CDR3 Aminosäuresequenz

Die von murinen Hybridomzellen sezernierten IgM und IgG (WGM1, WGM2, WGM3) sind als anti-PR3-Antikörper bekannt (Braun et al., 1996; Csernok et al., 1990). WGM1-3 wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer IgHV und IgLV Gene analysiert. Die IgHV und IgLV Gene der monoklonalen IgM (WGM1) und IgG (WGM2, WGM3) Antikörper wurden mit bekannten humanen, monoklonalen IgM Antikörpern verglichen, welche ebenfalls die humane PR3 erkennen. Im Detail war es ein Fab Fragment des 5/7 Idiotyps, generiert aus einem GPA-Patienten (WGH1) und in der Literatur beschrieben (Davis et al., 1998; Voswinkel et al., 2008c). Desweiteren wurde ein aus dem Blut eines gesunden Probanden (PR3 M2) generierter Antikörper zum Vergleich benutzt (Finnern et al., 1995) sowie drei Antikörper, produziert von Patienten-generierten, klonierten Lymphoblastoid Zelllinien (WG-2, WG-3, WG-4) beschrieben in der Literatur von (Sibilia et al., 1997). Zusätzlich wurden Autoantikörper des primären Sjögren Syndrom zum Vergleich herangezogen in Form von kompilierten Sequenzen anti-humaner Ro60 IgGs generiert mittels Massenspektroskopie spezifisch isolierter IgGs aus Serum (Wang et al., 2016). Wie in Tabelle 37 gelistet gehören alle drei murinen WGM1-3 Antikörper als humanes Homolog der IgHV1 Familie an. Bezüglich der V(D)J Rearrangierung von IgHV und IgLV Genen zeigte sich zwischen WG-3 und dem humanen Homolog von WGM2 eine große Übereinstimmung. FWR oder CDR wiesen in IgHV oder IgLV Genen der murinen anti-hPR3 Antikörper WGM1, WGM2 und WGM3 maximal fünf Austauschmutationen auf.

**Tabelle 37: V(D)J Verwendung laut IMGT/V-Quest (Brochet et al., 2008) in IgHV und IgLV Genen von sieben Antikörpern, welche die humane PR3 erkennen.**

**A:** humane Homologe der verwendeten V(D)J Gensegmente in murinen monoklonalen anti-PR3 IgM (WGM1) und IgG (WGM2, WGM3) im Vergleich zu humanen monoklonalen anti-PR3 IgM (WGH1) (Davis et al., 1998; Voswinkel et al., 2008c). **B:** V(D)J Verwendung in IgHV und IgLV Genen von GPA-Patienten generierten anti-PR3 IgM (WG-2, WG-3, WG-4) (Sibilia et al., 1997)

A

IgHV	WGM1	WGM2	WGM3	WGH1
<b>V-Gen</b>	IGHV1-69-2*01	IGHV1-2*02	IGHV1-2*02	IGHV3-30*03
<b>D-Gen</b>	IGHD5-12*01	IGHD3-22*01	IGHD3-16*02	IGHD3-3*01
<b>J-Gen</b>	IGHJ4*01	IGHJ4*03	IGHJ3*01	IGHJ4*02
IgLV	WGM1	WGM2	WGM3	WGH1
<b>V-Gen</b>	IGKV7-3*01	IGKV4-1*01	IGKV4-1*01	IgL2-14*01
<b>J-Gen</b>	IGKJ1*01	IGKJ1*01	IGKJ3*01	IgLJ3*01

B

IgHV	WG-2	WG-3	WG-4
V-Gen	IGHV4-59*01	IGHV1-2*02	IGHV3-23*01
D-Gen	IGHD3-3*01	IGHD3-22*01	IGHD2-2*02
J-Gen	IGHJ4*02	IGHJ4*02	IGHJ4*02
IgLV	WG-2	WG-3	WG-4
V-Gen	IGKV1-17*01	IGKV4-1*01	IGKV4-1*01
J-Gen	IGKJ4*01	IGKJ3*01	IGKJ3*01

Die CDR3-Region (abgeleitete Aminosäuren) in den IgHV und den IgLV Genen der PR3-spezifischen Autoantikörper ist divers, wobei in den IgHV Genen eine Aminosäure einheitlich ist und in den IgLV Genen drei Aminosäuren ein Muster formen (Tab. 38). Dies könnte an der Existenz verschiedener konformationeller Epitope der hPR3 liegen (van der Geld et al., 2004). Betrachtet man die abgeleitete Aminosäuresequenz von IgHV und IgLV Genen der anti-hPR3 und anti-hRo60, waren viele einzelne Aminosäuren und kleine Motive aus mehreren Aminosäuren in der FWR identisch (Tab. 39), was für eine konservierte Rahmenregion unabhängig von Spezies und Antigen in Autoimmunerkrankungen sprechen könnte.

**Tabelle 38: Abgeleitete Aminosäure-Sequenz der CDR3 in IgHV und IgLV Genen muriner (WGM1, WGM2, WGM3) und humaner monoklonaler Antikörper (hAK), welche die hPR3 erkennen (Davis et al., 1998; Finnern et al., 1995; Sibilia et al., 1997; Voswinkel et al., 2008c) und humaner anti-Ro60 IgG (Wang et al., 2016).**

grüne Buchstaben = identisch in 8 anti-hPR3 mAK; blaue Buchstaben = identisch in 7 anti-hPR3 mAK; violette Buchstaben = identisch in 6 anti-hPR3 mAK; \_ = Lücken nach IMGT einheitlicher Nummerierung; antiRo60 = kompilierte IgGs, welche Ro60 erkennen im primären Sjögren Syndrom (Wang et al., 2016); X = kompilierte Sequenzen zeigen drei alternative Varianten an diesen Positionen; XXX = IgD Region nicht bekannt

	CDR3 IgHV	CDR3 IgLV
<b>WGM1</b>	ARSGGYPYYTMDY	QQNNEDPWT
<b>WGM2</b>	APFYYYGSPAWFAY	QQHYSTPWT
<b>WGM3</b>	ARRETSLLG	QQDYSSPFT
<b>WGH1</b>	AKSQMSYYDFWSGYYRDQYYFDY	SSYTSSSTEV
<b>PR3 M2</b>	ARGRSWQSSAYMDV	nicht vorhanden
<b>WG-2</b>	ARGEIDFWSGYFREGLVGPVGTIDY	LQHNSYPLT
<b>WG-3</b>	ARGIFEGSGYYALDD	QQYYGTPFT
<b>WG-4</b>	AKSRGTSCYMSCDC	QQHYGTPFT
<b>αRo60 IGHV1-18</b>	TR   XXX   DAFDV NWFDS YYYYYGMDV	QQYNSYSYT SFL SL
<b>αRo60 IGHV3-23</b>	AR   XXX   DAFDV NWFDS YYYYYGMDV	QQYGSSPRYT RFL RL
<b>αRo60 IGHV3-74</b>	AK   XXX   DAFDV NWFDS YYYYYGMDV	NSRDSSGNHYT HFL HL

**Tabelle 39: Abgeleitete Aminosäure-Sequenz der FWR in IgHV und IgLV Genen muriner (WGM1, WGM2, WGM3) und humaner monoklonaler Antikörper (mAK), welche die hPR3 erkennen (Davis et al., 1998; Finnern et al., 1995; Sibilias et al., 1997; Voswinkel et al., 2008c) und humaner anti-Ro60 IgG (Wang et al., 2016).**

Die Sequenzen der FWR1 werden nicht gezeigt, da sie die Primer-bindende Region enthalten. grüne Buchstaben = identisch in 8 anti-hPR3 mAK; blaue Buchstaben = identisch in 7 anti-hPR3 mAK; violette Buchstaben = identisch in 6 anti-hPR3 mAK; \_ = Lücken nach IMGT einheitlicher Nummerierung; antiRo60 = kompilierte IgGs, welche Ro60 erkennen im primären Sjögren Syndrom (Wang et al., 2016); X = kompilierte Sequenzen zeigen drei alternative Varianten an diesen Positionen

IgHV			
	FWR2	FWR3	FWR4
WGM1	MKWVVKQSHGKSLEWIGD	FYNQKFK_GKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYC	WGQGSTVTVSS
WGM2	MNWVVKQRPGQGLEWIGG	DYNEKFK_GKATLTVDTSSSTAYMDLSLTSEDSAVYYC	WGQGTLLVTVSA
WGM3	MHWVVKQRPEQGLEWIGR	KYDPKFQ_GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYC	WGQGTLLVTVSA
WGH1	MHWVVRQAPGKGLEWVAV	YYADSVK_GRFITISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	WGQGTLLV
PR3 M2	MSWVVRQAPGKGLEWVSA	YYADSVK_GRFITISRDNSKNTLYLQMNSLRVDDTAIYYC	WGKGTKVTVL
WG2	WSWIRQPPGKGLEWIGY	NYNPSLK_SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC	WGQGTLLVTVSSG
WG3	IHWVVRQAPGQGLEWVGW	NYAQNFK_GRVMTTRDTSITAYMELSRRLRYDDTAVYYC	WGQGTLLVTVGGG
WG4	ISWLRQAPGKGLEWVSV	YYADSVK_GRFITISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	WGPRTLTVTVSSG
αRo60 IGHV1-18	ISWVVRQAPGQGLEWMGR	NYAQKLQ_GRVTMTTDTSTAYMELRSLRADDTAVYF <sup>C</sup> CC	WGQGTMTVTVSS LVA T
αRo60 IGHV3-23	MSWVVRQAPGQGLEWMSR SS	FYADSVR_GRFITISRDNSKNTVYLQLDSLRAEDTAVYY <sup>C</sup>	WGQGTMTVTVSS LVA T
αRo60 IGHV3-74	MHWVVRQAPGQGLEWVSR	YYADSVR_GRFITISRDNAKNTLYLQMDSLRADDTAVYY <sup>C</sup> F	WGQGTMTVTVSS LVA T

IgLV			
	FWR2	FWR3	FWR4
WGM1	MHWYQQKPGQPPELLIY	NLESGVP_ARFSGSG__SRTDFLTIDPVEADDAATYYC	FGGGTKLEIK
WGM2	VAWYQQKPGQSPKLLIY	TRHTGVP_DRFTGSG__SGTDYTLTISSVQAEDLALYYC	FGGGTKLEIK
WGM3	VAWYQQKPGQSPKLLIY	NRYTGVP_DRFTGSG__YGTDFFTISTVQAEDLAVYFC	FGSGTKLEIK
WGH1	VSWYQQHPGKAPKLLMIY	NRPSGVS_NRFSGSK__SGNTASLTISGLQAEDAADYYC	FGGGTKLTVL
WG2	LGWYQQKPGKAPKRLIY	SLQSGVP_SRFSGSG__SGTEFTLTISLQPEDFATYYC	FGGGTKVEI
WG3	LAWYQQKPGQPPELLIY	TRESGVP_DRFSGSG__SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	FGPGTKVDIKR
WG4	LAWYQQKPGQPPELLIY	TRESGVP_DRFSGSG__SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	FGPGTKVDIKR
αRo60 IGKV1-5	LSWYQQRPGKAPNLLIY PQL	TLESGVP_SRFSGSG__SGTEFTLTISRLOPDDFATYYC K	FGQGTNLEIK LAVL PGTKVD GGT
αRo60 IGKV3-20	LSWYQQRPGQAPRLLIS	RRAPGIP_ARFSGSG__SGTESSLTISKLEPEDFAVYYC T	FGQGTNLEIK LAVL PGTKVD GGT
αRo60 IGLV3-19	VSWYQQKGGQSPVLVIY	NRPSGIP_DRFSGSS__SGNTASLTITGARAEDAADYYC	FGQGTNLEIK LAVL PGTKVD GGT

Desweiteren wurden die anti-PR3 Antikörper mit den 231 klonalen IgHV Genen und 18 klonalen IgLV Genen aus entzündetem GPA-Gewebe hinsichtlich identischer oder

ähnlicher V(D)J Rearrangierungen verglichen. Bei den IgHV Genen wurde kein identisches Rearrangement gefunden, jedoch acht Sequenzen, welche zumindest in zwei rearrangierten Genen mit einem anti-PR3 Antikörper übereinstimmten. Bei den IgLV Genen wurden zwei identische Rearrangierungen des  $\lambda$ -Typs (WGH1) gefunden. Ein direkter, linearer Vergleich der CDR3-Region in den 231 klonalen IgHV Genen mit den anti-PR3 Antikörpern mittels NCBI Blast zeigte keine signifikant hohe Übereinstimmung und ein manuelles Vergleichen der acht ähnlich rearrangierten IgHV Gene mit den anti-PR3 Antikörpern zeigte nur wenig Übereinstimmung in einzelnen Aminosäuren der CDR3-Region (siehe Anhang).

## 6.5 High-Throughput IgLV Repertoire in entzündetem Gewebe und Blut bei der GPA ergab VJ-Rearrangierungen, die bei anti-PR3- IgLV Genen vorkommen

Um nach genetischen Anzeichen für eine anti-PR3-B-Zellantwort bei der GPA zu suchen, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren des sogenannten „Next generation sequencing“ etabliert und angewandt. Dazu wurden Leichtkettengenrepertoire von zusammengehörenden Gewebs- und Blutproben bei Patienten mit GPA erstellt und analysiert. Die Anzahl produktiver IgLV Gene nach Validierung mittels pRESTO lag dabei zwischen ca. 1.500 und  $6,3 \times 10^6$  (Tab. 40). Die große Abweichung in der Anzahl produktiver IgLV Gene (besonders bei Probe B5) beruht mutmaßlich auf technischen Problemen bei der RNA Isolierung.

Erklärung der Definitionen von IMGT/highV-QUEST in Tab. 41:

Bei unbekanntem und unproduktivem IgLV Gen lag meist eine niedrige Identität (etwa 60-85 %) der V-Region vor, die potentielle Nukleotid-Insertionen oder -Deletionen indiziert und von IMGT/highV-Quest nicht näher behandelt werden. Bei unbekanntem IgLV Gen lag keine identifizierte Rearrangierung (z. T. Stopcodons) oder Junktion vor. Bei unproduktivem IgLV Gen wurde eine Rearrangierung mit Stopcodon identifiziert und/oder die Zuordnung der konservierten Aminosäure PHE118 der V-Domäne fehlte, wobei die Junktion teilweise nicht in-frame war oder gefunden wurde. Sequenzen ohne identifiziertes V oder J Segment, wurden der Rubrik "kein IGLV Gen" zugeordnet.

**Tabelle 40: Absolute Anzahl an Gensequenzen (n) des IgLV Repertoires (IMGT/highV-Quest) in korrespondierenden Proben von Gewebe (n=5) und Blut (n=4) bei der GPA.**

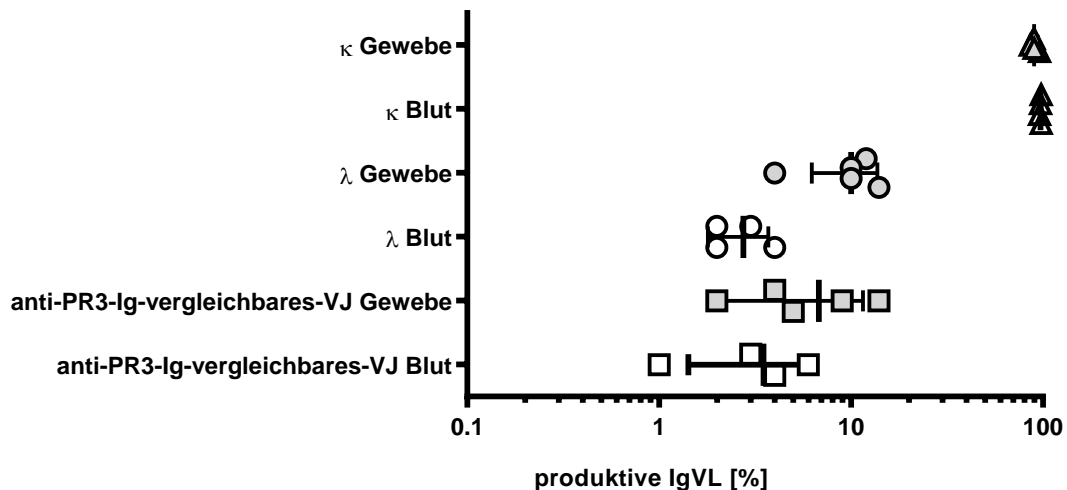
		<b>produktive IGLV Gene</b>	<b>unproduktive IGLV Gene</b>	<b>unbekannte IGLV Gene</b>	<b>keine IGLV Gene</b>
<b>GPA-Gewebe</b>	G1	1.227.296	486.033	440.329	1.230.643
	G2	282.913	286.949	269.371	633.675
	G3	1.898.655	174.415	267.540	218.752
	G4	586.995	177.616	167.513	1.606.249
	G5	738.281	159.858	128.164	1.248.805
<b>GPA-Blut</b>	B1	134.224	218.855	221.845	486.445
	B2	1.047.641	461.339	325.222	841.797
	B3	6.321.900	321.916	15.306	9.659
	B5	1.408	199.423	169.990	1.758.017

**Tabelle 41: Relative Anteile verschiedener Merkmale des IgLV Repertoirs in korrespondierenden Proben von Gewebe und Blut bei der GPA (absolute Zahlen in Klammern).**

Die rechte Spalte umfasst den Anteil von Rearrangierungen, die bei monoklonalen PR3-Antikörpern vorkommen (siehe Tabelle 37, Seite 108); einschließlich alternativ, rearrangierter J<sub>L</sub> Gensegmente in anti-PR3 Ig, die von IMGT/V-QUEST als gleich wahrscheinlich eingestuft wurden.

		Anteil produktiver IgkV Gene [%]	Anteil produktiver IGLV Gene [%]	Anteil von - mit anti-PR3 Ig vergleichbaren - VJ-Rearrangierungen in den produktiven IgLV Genen [%]
<b>GPA-Gewebe</b>	G1	88 (1.075.248)	12 (152.048)	9 (107.349)
	G2	90 (255.838)	10 (27.075)	4 (11.985)
	G3	96 (1.824.392)	4 (74.263)	14 (261.791)
	G4	86 (504.294)	14 (82.701)	5 (31.635)
	G5	90 (665.794)	10 (72.487)	2 (12.912)
<b>GPA-Blut</b>	B1	97 (130.174)	3 (4.050)	3 (4.663)
	B2	96 (1.005.628)	4 (42.013)	4 (42.367)
	B3	98 (6.189.040)	2 (132.860)	6 (358.323)
	B5	98 (1.385)	2 (23)	1 (17)

Nach einem Ratschlag von PD Dr. Andreas Recke wurde für einen Vergleich der prozentualen Werte der einzelnen Proben (Tab. 41, Abb. 31) der T-Test angewendet. Bei genügend großer n-Zahl können relative Werte einer Verteilung mit der kanonischen logit-Transformation in eine stetige Normalverteilung verwandelt werden (Trikalinos et al., 2013). Im Anhang wird eine Tabelle der transformierten Daten gezeigt. Die Normalverteilung transformierter Werte wurde zusätzlich mit dem Kolmogorow-Smirnov Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % überprüft (Graph Pad Prism 4). Unterschiede zwischen den verschiedenen Anteilen der IgLV-Genen in Blut und Gewebe wurden mit dem zweiseitigen gepaarten T-Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % (Graph Pad Prism 4) untersucht. Der Anteil an produktiven IgLV Genen des  $\lambda$ -Typs ist im Gewebe erhöht ( $P=0,0209$ ) und demzufolge ist der Anteil an produktiven IgLV Genen des  $\kappa$ -Typs im Gewebe erniedrigt ( $P=0,0209$ ). Tendentiell höher im Gewebe ist auch der Anteil an produktiven IgLV Genen mit einer anti-PR3-Ig vergleichbaren Rearrangierung ( $P=0,0776$ ).



**Abbildung 31: Erhöhter Anteil produktiver IgLV-Gene des  $\lambda$ -Typs und tendentiell erhöhter Anteil produktiver IgLV Genen mit einer anti-PR3-Ig vergleichbaren Rearrangierung im Gewebe im Vergleich zum Blut bei der GPA.**

Vergleich der Merkmale aus Tab. 41 zwischen Blut und Gewebe bei der GPA mit Mittelwert und Standardabweichung (Graph Pad Prism 6).

Setzt man die produktiven IgLV Gene des anti-PR3-Ig-ähnlichen VJ-Rearrangements im Gewebe oder Blut als 100 %, so lässt sich der Anteil der Verwendung individueller IGLV-Gene des anti-PR3-Ig-VJ-Typs bestimmen (siehe Tab. 37, Seite 108). Innerhalb der produktiven IgLV Gene des anti-PR3-Ig-VJ-Typs beträgt der Anteil von IG $\kappa$ V4-1\*01 Genen im Gewebe durchschnittlich 98 % (n=7.985 - 261.315), während im Blut ein Wert von durchschnittlich 94 % (n=5 - 339.464) ermittelt wurde. Innerhalb der produktiven IgLV Gene des anti-PR3-Ig-VJ-Typs beträgt der Anteil von IG $\lambda$ V2-14\*01 Genen im Gewebe durchschnittlich 1 % (n=4 - 3.757), während im Blut ein Wert von 3 % (n=0 - 6246) auftritt. Der Anteil an anti-PR3-Ig-ähnlich-rearrangierten IgLV Gene im Gewebe scheint in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität zu variieren. Bei aktiver GPA (n=2) war der prozentuale Anteil an rearrangierten IgLV Genen des anti-PR3-Ig-Typs höher (9 %, 14 %). In Remission (n=3) war der prozentuale Anteil an rearrangierten IgLV Genen des anti-PR3-Ig-Typs geringer (2-5 %).

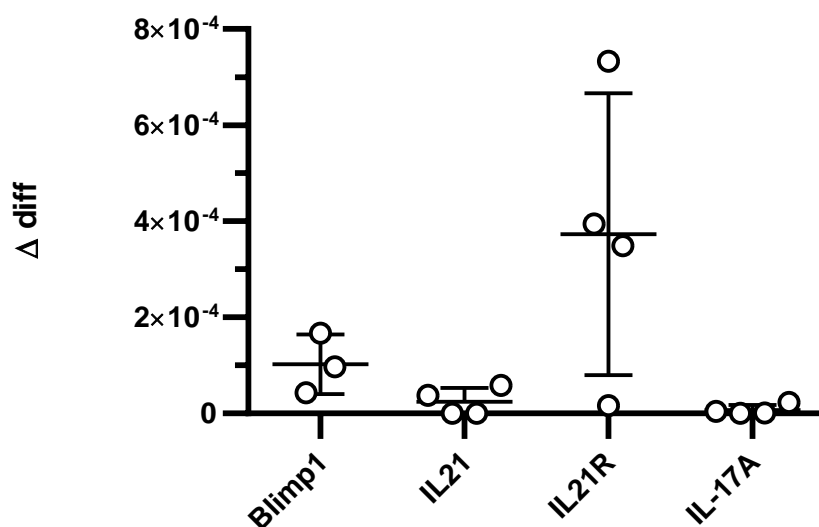
## 6.6 IL-21, IL-21 Rezeptor, Blimp1 und IL-17A werden in entzündetem Gewebe und im Blut bei der GPA exprimiert

Um zu testen, in wie fern B Zell Differenzierungsfaktoren im Hinblick auf eine Entwicklung autoreaktiver B-Zellen in Blut und Gewebe bei der GPA nachweisbar sind oder sich die Transkription oder Expression von Gesunden unterscheiden, wurden IL-21, IL-21R, Blimp1 und IL-17A untersucht. Dabei wurde eine IL-21 abhängige Induktion der Expression von Blimp1 (Kwon et al., 2009) in Betracht gezogen. Desweiteren können proinflammatorische

$T_H$  17 Zellen unter Beteiligung von IL-21 entwickelt werden und reziprok gelten  $T_H$  17 Zellen unter den  $CD4^+$  T Zellen als stärkste Produzenten von IL-21 (Korn et al., 2007).

### 6.6.1 IL-21, IL-21R, Blimp1 und IL-17A mRNA Expression im entzündeten Gewebe bei der GPA

In nasalen Schleimhautbiopsien bei der GPA lässt sich mRNA für IL-21, IL-21R, Blimp1 und IL-17A nachweisen. Die mRNA wurde isoliert (siehe Punkt 5.3.4.1), wobei der Großteil für das NGS-Experiment verwendet wurde. Die Patientencharakterisierung findet sich unter der Rubrik NGS G1 bis G5. Die mRNA-Mengen von IL-17A und IL-21 sind im Vergleich zur Blimp1 mRNA und insbesondere zur IL-21R mRNA erniedrigt (Abb. 32). Daher wird für die IL-17A mRNA ein Bild des Agarosegels mit einer Bande für das 104 bp Amplikon im Anhang gezeigt.

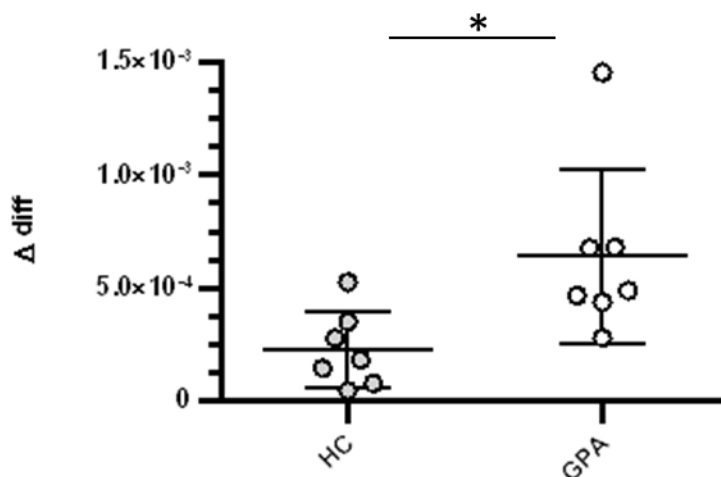


**Abbildung 32: relative mRNA Expressionen von Blimp1, IL-21, IL-21R und IL-17A in nasalen Schleimhautbiopsien von GPA Patienten (n=4 bzw. n=4) im Verhältnis zueinander.**

Auf die Haushaltsgene 18SrRNA und GAPDH wurde normalisiert; die Standardabweichung der Doppelbestimmung der Ct war  $< 0,2$ , mit denen unter Einbezug der Effizienzen die relative mRNA-Expression berechnet worden ist; dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (Graph Pad Prism 6)

### 6.6.2 Erhöhte mRNA Expression von Blimp1 in PBMC bei der GPA

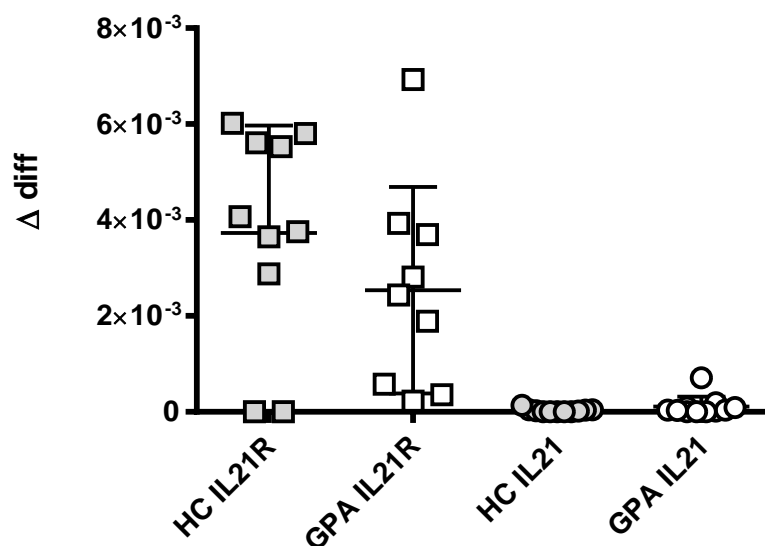
Die RNA von PBMC und PMN (zusammen PBL) wurde wie in Punkt 5.4.1 beschrieben auf relative Transkriptionsunterschiede von IL-21, IL-21R und Blimp1 untersucht. Interessanterweise zeigte sich bei der GPA eine erhöhte Menge von Blimp1 mRNA in den PBMC (Abb. 33).



**Abbildung 33: relative mRNA Transkription von Blimp1 in PBMC von 7 GPA Patienten im Vergleich zu 6 Gesunden.**

Auf die Haushaltsgene 18SrRNA und GAPDH wurde normalisiert; die Standardabweichung der Doppelbestimmung der Ct war  $< 0,2$ , mit denen unter Einbezug der Effizienzen die relativen mRNA-Level berechnet worden sind; dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (Graph Pad Prism 6); der ungepaarte, zweiseitige Mann-Whitney-Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % ergab einen P-Wert von 0,0111

Analog zum entzündeten Gewebe ist die zirkuläre IL-21R Transkription im Vergleich zum IL-21 Liganden bei der GPA erhöht (Abb. 32 und 34).

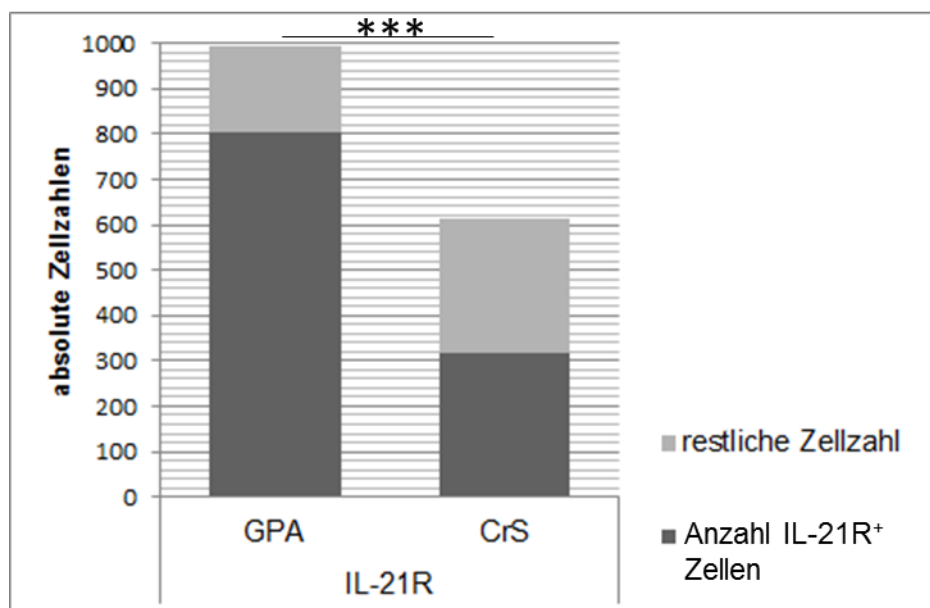


**Abbildung 34: relative mRNA Transkription von IL-21 und IL-21R in PBL von GPA Patienten (IL-21 n=11; IL-21R n=9) im Vergleich zu Gesunden (IL-21 n=11; IL-21R n=10).**

Auf die Haushaltsgene 18SrRNA und GAPDH wurde normalisiert. Die Standardabweichung der Doppelbestimmung der Ct war  $< 0,2$ , mit denen unter Einbezug der Effizienzen die relativen mRNA-Level berechnet worden sind; dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (Graph Pad Prism 6); der ungepaarte, zweiseitige Mann-Whitney-Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % ergab entsprechend einen P-Wert von 0,2090 (IL-21) und 0,2685 (IL-21R)

### 6.6.3 Erhöhte Anzahl von IL-21R<sup>+</sup> Zellen im entzündeten Gewebe bei der GPA

Um die Expression von IL-21 und IL-21R in den nasalen Schleimhautbiopsien von 5 GPA Patienten auch im Hinblick einer Kolo-kalisation zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen (wie in Punkt 5.4.2 beschrieben) durchgeführt. Als Vergleichsgewebe wurden nasale Schleimhautbiopsien von 3 Patienten mit chronischer Rhinosinosis herangezogen. Die Patienten sind im Materialteil unter der Rubrik IF klinisch charakterisiert. Die vermehrte IL-21R Expression in nasalen Schleimhautbiopsien bei der GPA im Vergleich zu Crs ist in Abbildung 35 und 36 ersichtlich. Es ist ebenfalls die Kolo-kalisation von IL-21 und IL-21R zu erkennen, möglicherweise in Form von Rezeptor gebundenem IL-21. Abbildung 37 zeigt die entsprechenden Isotypenkontrollen.



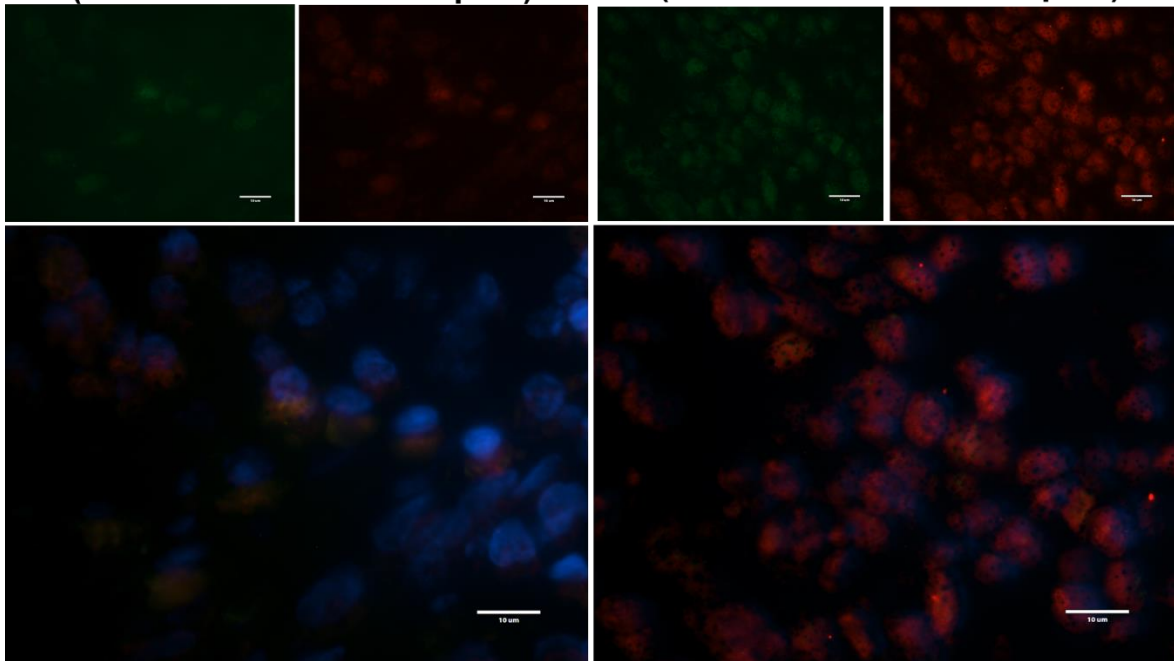
**Abbildung 35: Verteilungsunterschied zwischen nasalen Schleimhautbiopsien von GPA Patienten (n=5) und Crs Patienten (n=3) hinsichtlich der IL-21R Proteinexpression.**

Ausgezählt wurden etwa 200 Zellen pro Patient in der Vergrößerung des 100er Objektivs. zweiseitiger, exakter Fischer Test unter einem Signifikanzniveau von 5 % und  $P < 0,0001$  (Odds Ratio = 3,905 & adjustierter Kontingenzkoeffizient = 0,413)<sup>14</sup>

<sup>14</sup> Interactive Statistical Pages project (ohne Jahr)  
JavaStat -- 2-way Contingency Table Analysis  
<http://statpages.info/ctab2x2.html>  
(Stand: 12.06.2018)

**IL-21<sup>+</sup> & IL-21R<sup>+</sup> Zellen in CrS  
(nasale Schleimhautbiopsie)**

**IL-21<sup>+</sup> & IL-21R<sup>+</sup> Zellen in GPA  
(nasale Schleimhautbiopsie)**

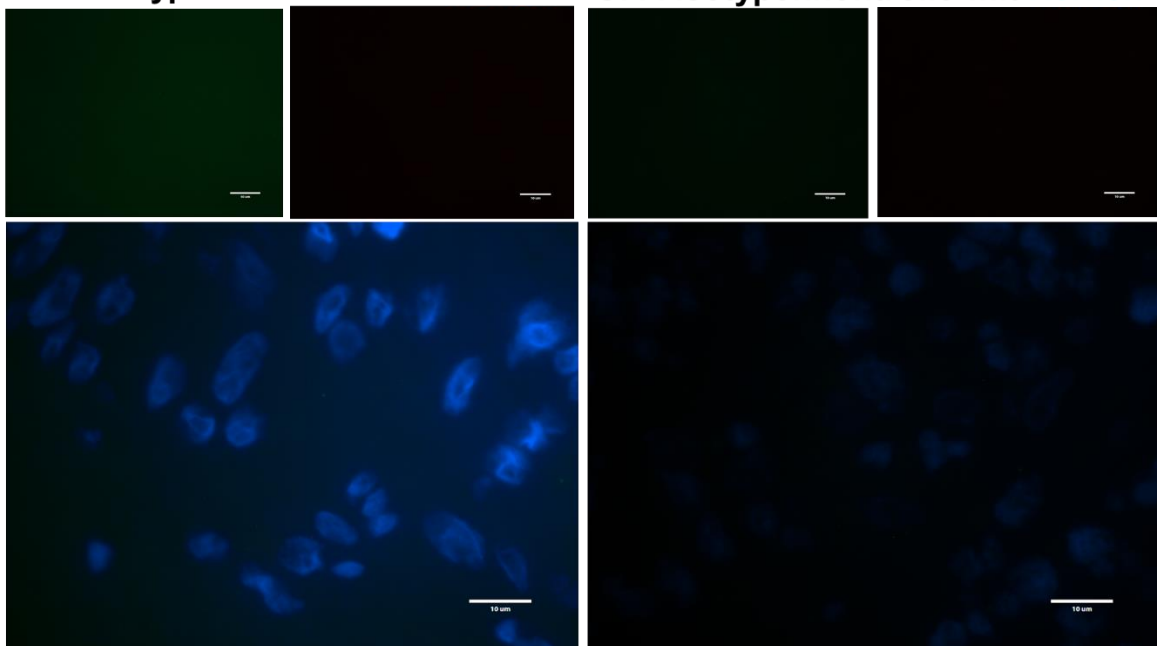


**Abbildung 36: Immunfluoreszenzaufnahmen mit dem 100er Objektiv am EVOS Fluoreszenzmikroskop der IL21/IL-21R – Färbung.**

Am Beispiel eines möglichst repräsentativen GPA Präparates (V458-14) aus 5 GPA Patienten und einer repräsentativen Aufnahme (CrS3925-08) aus 3 CrS Patienten, Lichtintensitäten: 50 % GFP & 60 % Texas Red

**CrS-Isotypenkontrolle mit **Kernen****

**GPA-Isotypenkontrolle mit **Kernen****



**Abbildung 37: Immunfluoreszenzaufnahmen der Isotypenkontrollen mit dem 100er Objektiv der IL21/IL-21R – Färbung für GPA (V458-14) und CrS (CrS3925-08).**

Lichtintensitäten: 50 % GFP & 60 % Texas Red

## 7 Diskussion

### 7.1 Plasmazellen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA produzieren Auto-Antikörper

Bei der GPA wurden im entzündlichen Gewebe B-Zell-reiche, Follikel-ähnliche Bereiche in Nachbarschaft zu PR3-exprimierenden Zellen und Plasmazellen dargestellt, die eine Anwesenheit autoreaktiver, PR3-ANCA produzierender B-Zellen in der granulomatösen Entzündung suggerieren (Voswinkel et al., 2006). Eine autoreaktive Immunantwort in der granulomatösen Entzündung bei der GPA wurde mit dem Nachweis von Autoantikörpern aus einzelnen CD20<sup>+</sup> B-Zellen bestätigt, wobei die Autoantikörper Tetraspanin7 und Transmembranprotein 9B erkannt haben (Thurner et al., 2011).

In dieser Arbeit wurden sechs rekombinante Antikörper, basierend auf IgHV- und IGLV-Genpaaren von fünf gewebsständigen Plasmazellen und einer CD20<sup>+</sup> B-Zelle kloniert und exprimiert. Es wurde ein ungerichteter Ansatz benutzt, um Antikörper von B- und Plasmazellen aus dem Gewebe zu generieren. Unabhängig von Erwartungen gibt deren Spezifität die Richtung einer Immunantwort im Gewebe an. Die Identifikation lokal sezernierter Autoantikörper kann neue Ideen für die Analyse des Krankheitsprozesses oder der Krankheitsursache liefern, was z. B. im Zusammenhang mit Plasmazell-Infiltrationen im entzündlichen Synovialgewebe bei Rheumatoider Arthritis postuliert wurde (Mizutani et al., 2013). Zur Expression kompletter, humaner Immunglobuline wurde ein Bakulovirus/Insektenzell-System verwendet. Dies gilt als sehr sicher, da Baculoviren ein eingegrenztes Wirtsspektrum haben und nicht pathogen für Pflanzen oder Säugetiere sind. Weitere Vorteile dieses Expressionssystems sind der geringe Kostenfaktor und die Schnelligkeit, in der mit stabil-rekombinanten Baculoviren in Insektenzellen funktionelle Immunglobuline angepasster Glycosylierung hergestellt werden können. Die Produktion und Sekretion von Glykoproteinen in Insektenzellen wurde durch vielfache Modifizierungen optimiert, wie beispielsweise durch die Verwendung alternativer Promotoren. Für die Humanisierung der Glycanstruktur von rekombinanten Immunglobulinen aus Insektenzellen wurden fehlende Glycosyltransferasen (GNT-I, GNT-II und  $\beta$ 1-4-Glycosyltransferase) in das baculovirale Genom eingebaut (Cérutti und Golay, 2012). Die Glycosylierung kann Produktion, Sekretion und Funktion der Immunglobuline beeinflussen (Cérutti und Golay, 2012) und spielt auch bei der GPA eine Rolle (Lamprecht et al., 2018), ist jedoch für die Spezifitätstestung von vernachlässigbarer Relevanz. Die komplette Struktur der humanen IgG wird im Hinblick auf die Spezifitätstestung als vorteilhaft angenommen, da keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Spezies auftreten können. Dies kann ein Nachteil von Immunglobulinen aus murinen Hybridomkulturen sein. Bei der Verwendung des Phage-Display (Hammers und Stanley, 2014) werden Schwer- und Leichtketten der Fab Fragmente zufällig zugeordnet, sodass der *in-vivo* Zustand nur bedingt wiedergegeben

wird. Der Fc-Teil ist nötig für die vollständige Funktionsweise eines Antikörpers und komplettiert die Assemblierung und Faltung eines Antikörpers beispielsweise über die Ausbildung von Disulfidbrücken in der Gelenkregion (Murphy, 2012). Obwohl das Fab Fragment die gleichen Antigen-bindenden Eigenschaften wie der Originalantikörper hat (Murphy, 2012), stabilisiert der Fc-Teil die Struktur eines Antikörpers *in-vivo*.

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, aus Patientenblut-gewonnene Gedächtnis B-Zellen per Transduktion zu immortalisieren und unter definierten Zellkulturbedingungen in eine stabile Langzeit-Kultur zu verwandeln, die im Überstand monoklonale Antikörper enthält (Kwakkenbos et al., 2010, 2016). Diese Technik kann theoretisch auch für gewebständige Plasmazellen etabliert werden oder für eine parallele Untersuchung von Antikörpern aus selektionierten, peripheren Gedächtnis B-Zellen. Verbreitet ist die kommerzielle Herstellung therapeutischer Antikörper mit Säugetierzellen wie den ovariellen Zellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen), wobei die rekombinate Expression in CHO-Zellen im Vergleich zu Insektenzellen zeit- und kosten-intensiver ist. Dies liegt vor allem an dem aufwendigen Prozess der Isolation und Charakterisierung geeigneter Klone einer stabilen Transfektion. Mit der transienten Genexpression kann der zeitliche Aufwand etwas reduziert werden (Cérutti und Golay, 2012). In HEK-Zellen, humanen embryonalen Nierenzellen, wurde ein transientes Expressionssystem für Immunglobuline etabliert. Dabei wurden schrittweise alle Systemkomponenten optimiert und drei Proteinhancer zur Expression eingebaut (Vink et al., 2014). Dies veranschaulicht den enormen methodischen Aufwand bei der Verwendung von Säugetierzellen, wobei die Glycanstruktur rekombinanter Proteinen, die beispielsweise in CHO-Zellen exprimiert wurden, der humanen zwar sehr ähnlich ist, aber nicht identisch (Cérutti und Golay, 2012). Rekombinante Proteine, wie Immunglobuline können auch in anderen eukaryotischen Expressionssystemen, die auf Hefezellen, filamentösen Pilzkulturen oder Pflanzenzellen basieren, hergestellt werden (Frenzel et al., 2013). Die Etablierung eines Expressionssystems für Immunglobuline erfordert jedoch immer die richtige Prozessierung und Faltung kompletter Schwer- und Leichtketten, die nicht aggregieren dürfen (Cérutti und Golay, 2012). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein bestehendes Expressionssystem für Immunglobuline in Insektenzellen von Kooperationspartnern eingesetzt. Da Prokaryoten der Apparat für post-translationale Modifikationen fehlt, können Bakterien zur Expression von Antikörperfragmenten zwar benutzt werden, wurden aber als methodische Alternative nicht in Erwägung gezogen, da sie den *in-vivo* Zustand weniger gut nachbilden. Komplette Immunglobuline können kaum in Bakterien exprimiert werden. Die Faltung eines Antikörpers braucht eine oxidierende Umgebung für die Ausbildung von Disulfidbrücken. Wenn gram-negative Bakterien wie *E. coli* zur Expression verwendet werden, können die gefalteten Antikörperfragmente nur aus dem periplasmatischen Spalt

isoliert werden. Bei gram-positiven Bakterien fehlt die äußere Membran und die Antikörperfragmente können aus dem Überstand isoliert werden (Frenzel et al., 2013).

In einem humanen Proteom-Mikroarray wurden fünfzehn potentielle Interaktions- bzw. Bindungspartner der sechs gepoolten rIgG identifiziert. In weiteren Versuchen muss herausgefunden werden, welche dieser fünfzehn Kandidaten tatsächlich als Autoantigen von einem oder mehreren der sechs rIgG erkannt wird.

Der humane Proteom-Mikroarray erfasst laut Studienprotokoll zwar etwa 75 % des Proteinkodierenden Genoms, aber nicht alle humanen Proteine mit ihren posttranslationalen Modifizierungen. Eine undetektierte Erkennung konformationeller Epitope wegen Konformationsänderungen des Antigens in Folge einer Paraformaldehydfixierung (Mizutani et al., 2013) kann ausgeschlossen werden, da laut Studienprotokoll nur mit Kälte fixiert wurde. Die eingesetzte Antigenaufreinigung zielte laut Studienprotokoll auf den Erhalt der Proteinaktivität ab. Dennoch müssen beim Bedrucken des Arrays mit Antigenen physiologische Bedingungen mit Eigenschaften zur Immobilisation wie Viskosität und Oberflächenspannung kombiniert werden, damit die Proteine in hydratisierter stabiler und gefalteter Form getestet werden können (Stoevesandt et al., 2009). Da die Struktur der Proteine (Antigen und Antikörper) von Ionenkomposition und pH-Wert beeinflusst wird, kann eine abgewandelte Konformation zwischen Testsystem und *in-vivo* Situation nicht ausgeschlossen werden. Im entzündeten Gewebe, aus welchem die rIgGs generiert worden sind, liegt ein saurer pH-Wert vor (McLure und Rubin, 2005) und als Arraypuffer wurde PBS verwendet. Aus diesem Grund sollte die Testung der rIgG im PR3-ANCA ELISA unter angesäuerten Bedingungen wiederholt werden.

Die folgende Diskussion konzentriert sich auf diejenigen Kandidaten, für die bereits eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen beschrieben wurde. Einer der im humanen Proteom-Mikroarray identifizierten möglichen Interaktionspartner der rIgG aus entzündlichem Gewebe bei der GPA ist PUF60. PUF60 wurde als neues Autoantigen in verschiedenen Erkrankungen wie Sjögren Syndrom, Systemischen Lupus Erythematosus und Dermatomyositis beschrieben (Fiorentino et al., 2016). Mit dem Nachweis von PUF60 Autoantikörpern im Serum bei der idiopathischen entzündlichen Myositis, RA, SLE und SS wurde dies bestätigt (Zhang et al., 2018). Im primären Sjögren Syndrom lag eine Assoziation von PUF60 Autoantikörpern mit anderen klinischen Parametern vor (Fiorentino et al., 2016). Interessanterweise konnte bei der Dermatomyositis ebenfalls ein gleichzeitiges Auftreten von anti-PUF60 und Hautulzerationen festgestellt werden, sowie gesenkte PUF60-Autoantikörper Konzentrationen in der Remission (Zhang et al., 2018). Daher ist es wahrscheinlich, dass das klinische Bild einer anti-PUF60 Autoantikörper assoziierten Erkrankung im Zusammenspiel mit anderen Einflüssen wie genetische Faktoren, Umweltfaktoren und anderer Antigen-spezifischen Immunantworten geformt wird

(Fiorentino et al., 2016). Dies wurde im Zusammenhang einer assoziativen Untersuchung der Autoimmunantwort bei Sklerodermie und der sich-selbst-erhaltenden Gewebszerstörung ebenfalls postuliert (Joseph et al., 2014). Der Grundgedanke der Bedeutung von Einflußfaktoren und spezifischen Autoimmunantworten für das klinische Erscheinungsbild einer Erkrankung wurde von (Casciola-Rosen et al., 2005) gefasst. Autoantigene von systemischen Autoimmunerkrankungen werden ubiquitär exprimiert und weisen eine konservierte, nicht-gewebsspezifische Funktion auf. Initial für die Pathogenese können entzündliche und regenerative Prozesse im Gewebe sein, die eine Mikroumgebung mit spezifischer Überexpression der Antigene hervorruft. In Folge von DNA-Schäden kann es beispielsweise zur Überexprimierung von Reparaturproteinen kommen (Casciola-Rosen et al., 2005). So ist die Expression von PUF60 in Myoblasten höher als in ausdifferenzierten Zellen. PUF60 funktioniert bei der RNA-Spleißung zusammen mit dem bekannten La Autoantigen im Sjögren Syndrom, was in diesem Fall ein Epitopespreading vermuten lässt (Fiorentino et al., 2016). Da PUF60 eine Splicevariante von FIR ist, einem *c-myc* Transkriptionsrepressor, können anti-PUF60 Antikörper auf eine *c-myc* Aktivität hinweisen. Anti-FIR Antikörper wurden in frühen Formen des colorektalen Krebs in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen, die nach Entfernung des Tumors verschwanden. Der Nachweis von PUF60 bzw. FIR Antikörpern kann ein Hinweis auf das begleitende Auftreten von Tumoren sein und auf diese Weise möglicherweise bei der Behandlung einer GPA nützlich sein (Kobayashi et al., 2016). AAV-Patienten haben unter Therapie mit Cyclophosphamid ein erhöhter Risiko für Krebs, wobei in einer Meta-Analyse keine signifikante Assoziation mit colorektalem Krebs nachgewiesen wurde (Shang et al., 2015). Neben PUF60 Antikörpern im Serum (Zhang et al., 2018) wurden in der Rheumatoiden Arthritis im entzündlichen Synovialgewebe Autoantigene beschrieben (Mizutani et al., 2013), die unter den potentiellen Interaktionspartnern der sechs rIgG1 waren. Dabei handelt es sich um FBXO2 und TRIM21. FBXO2 ist eine Ubiquitin abhängige E3 Ligase und reguliert den proteasomalen Abbau von Glycoproteinen im Zytoplasma (Yoshida et al., 2002). Über die Assoziation von FBXO2 mit Rheumatoider Arthritis ist wenig bekannt (Mizutani et al., 2013). In einer aktuellen Studie wurde die Prävalenz von anti-Ro/SSA/TRIM21 in einer Kohorte aus Patienten mit Autoimmunerkrankungen und gesunden Probanden untersucht. Im Vergleich zu Gesunden lagen signifikant höhere Titer bei Sjögren Syndrom, Systemischem Lupus Erythematosus, Antiphospholipid Syndrom, Systemischer Sklerose und primärer, biliärer Zirrhose vor. Eine Korrelation zwischen anti-TRIM21 und Antikörpern gegen Zytomegalovirus, Toxoplasma und Epstein-Barr Virus wurde festgestellt. Die Exposition dieser infektiösen Agentien kann in empfänglichen Individuen möglicherweise über die Entwicklung von anti-TRIM21 ein initialer Faktor von Autoimmunerkrankungen sein (Agmon-Levin et al., 2017).

Wie die Immunantwort gegen Pathogene zum Toleranzverlust führen kann, wurde in einem Modell beschrieben. TRIM21 besteht aus einer N-terminalen Ubiquitin-Ligase und einer C-terminalen Immunglobulin-bindenden Region, die gleichermaßen von Autoantikörpern im Sjögren Syndrom targetiert werden. Nach dem Modell tragen intrazelluläre Ig-bedeckte Pathogene am Fc Rezeptor TRIM21, welches den Komplex in den proteasomalen Abbau überführt. Bei einer anhaltenden Infektion und veränderten Immunreaktionen binden solche Komplexe jedoch über den Fab-Teil an B-Zell-Rezeptoren, die unter  $T_H$  Zellaktivierung zu einer robusten anti-TRIM21 Reaktion führen können (Burbelo et al., 2018). Zu diesem Modell würden die für bestimmte MCH Moleküle bei der GPA beschriebenen Einzelnukleotid Polymorphismen passen (Lyons et al., 2012).

Eine Reaktivität gegen RAD23A wurde bisher in keiner rheumatischen Autoimmunerkrankung nachgewiesen. Das funktionelle Äquivalent von RAD23B in der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (UniProtKB - P54725) wurde jedoch in einem Lupus-Mausmodell mit anti-Phospholipid-Syndrom nachgewiesen. Dabei wurde das zeitliche Auftreten bestimmter Autoantikörper im Zusammenhang mit Epitopespreading untersucht, das eine Rolle in der Initiierung und Erhaltung von Autoimmunität spielen kann, jedoch auch die individuelle Variabilität an Autoantikörper-Konstellationen einer Erkrankung erklären könnte. Autoantikörper gegen RAD23B traten im Mausmodell in einer nicht-zufälligen Weise nach Autoantikörpern gegen zytoskeletales Vimentin, jedoch vor Autoantikörpern gegen heterogene, nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNP) auf. Einige der Autoantikörper sind in Folge des Epitopespreading entstanden, was durch die physikalisch verbundenen Epitope dieser Autoantigene in apoptotischen Bläschen während des Zelltodes erklärt werden kann (Thebault et al., 2002). Das Homolog RAD23A akkumuliert zusammen mit AIF in Folge genotoxischen Stresses im Zellkern und ist mit der Fragmentierung von DNA während der Initiierung des Zelltodes assoziiert (Sudhakar und Chow, 2014). Inwiefern dieser Mechanismus bei entzündlichen Prozessen in der GPA und der Entwicklung von Autoantikörpern eine Rolle spielt, bleibt Spekulation.

Für Autoantikörper, welche Membran-assoziierte oder extrazelluläre Antigene targetieren, wurden molekulare Mechanismen, die zur Autoimmunerkrankung führen, in vielen Fällen aufgeklärt. Um die Bedeutung von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Antigene für die Klinik zu erschließen, sollen Zusammenhänge mit Krankheitsaktivität, Prognose und Organmanifestation bestehen. Um die Generierung intrazellulärer Autoantikörper zu verstehen, werden generelle Dysregulationen des Immunsystems, Veränderungen epigenetischer Modifikationen, molekulare Mimikry und die Bildung apoptotischer Bläschen beforscht. Epigenetische Modifizierungen wie DNA-Methylierung, Histon-Acetylierung und micro-RNA Expression können über eine abnorme Expression von Antigenen zu der Entwicklung von entsprechenden Autoantikörpern führen. Aus diesem Grund ist die

potentielle Reaktivität der rIgG gegenüber den Azetyltransferasen NAA10 oder NAA40 interessant. Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene, die nicht die Plasmamembran erreichen oder in den Extrazellularraum sezerniert werden, haben ein pathogenes Potenzial, wenn sie in die Zelle geschleust werden und dort zytotoxisch wirken (Racanelli et al., 2011).

Um die Ergebnisse des humanen Proteom-Mikroarrays zu validieren und ggf. einzelnen rIgGs zuzuordnen, bieten sich Immunoblots zur Affinitätstestung an (Kobayashi et al., 2016; Preuss et al., 2009). Dabei werden rekombinante Proteine wie FBX02, PUF60, RAD23A und TRIM21 als Punkte auf eine Membran gebracht, wobei die Bindung von rIgG in einer Enzym-katalysierten Lichtreaktion detektiert wird. Laut Studienreport können gepoolte Kreuzreaktivitäten und Bindungen über den Fc-Rezeptor (TRIM21) im Proteom Mikroarray vorkommen. Mit Immunoblots kann an der Signalstärke einzelner und kombinierter rIgGs herausgefunden werden, ob spezifische Bindungen vorliegen oder es sich um Kreuzreaktivitäten handelt. Zum Ausschluß einer unspezifischen Bindung des Fc-Rezeptors kann die enzymatische Papain-Spaltung der rIgGs in Fab- und Fc- Teil (Murphy, 2012) mit nachfolgender Aufreinigung über den Fc-Teil dienen, sodass eine separate Analyse der Antigenbindung durchgeführt werden kann. Um die Assoziation eines Autoantikörpers mit GPA in Betracht zu ziehen, müssen zumindest mehrere rIgGs das gleiche Autoantigen erkennen. In diesem Zusammenhang ist die Durchführung von Immunoblots mit GPA-Seren interessant, um eine lokal begrenzte Relevanz des Autoantikörpers von einer systemischen Bedeutung zu unterscheiden. Zudem erscheint möglich, dass bei einem GPA Patienten eine undiagnostizierte rheumatische Erkrankung auftreten kann, womit z. B. das Vorliegen von Autoantikörpern gegen TRIM21/Ro52 bei systemischer Sklerose zusammenhängen kann.

## **7.2 Veränderte Affinitätsreifung und Selektion von IgHV & IgLV Genen im entzündeten Gewebe bei der GPA**

IgHV & IgLV Gene aus dem entzündlichen, respiratorischen Gewebe bei der GPA zeigten Hinweise auf eine autoimmune Reaktion (Müller et al., 2014; Voswinkel et al., 2006, 2008a). Für eine Teilmenge dieser Sequenzen (n=3) wurde Autoreaktivität bewiesen, indem rekombinante Antikörper kloniert wurden, welche das humane Lysosomale Transmembranprotein 9B und Tetraspanin 7 erkennen (Thurner et al., 2011). In dieser Meta-Analyse wurden IgHV & IgLV Gene (Müller et al., 2014; Voswinkel et al., 2006, 2008a) im GPA-Gewebe erstmalig unter Berücksichtigung ihrer klonalen Eigenschaften (n=231 & n=18) analysiert und mit verschiedenen Kontrollgruppen (Abraham et al., 2007; Boursier et al., 1999) verglichen, hauptsächlich peripherer IgHV-Gene gesunder Probanden einer Hochdurchsatzsequenzierung (Recke et al., 2016). In Übereinstimmung mit anderen

Autoimmunerkrankungen wurden Zeichen somatischer Hypermutation gefunden (Cho et al., 2014; Zuckerman et al., 2010). Im Vergleich zu naiven oder IgM<sup>+</sup> B-Zellen sind autoreaktive B-Zellen häufiger unter IgG<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen vertreten, deren Autoreaktivität auf somatische Hypermutationen zurückzuführen ist (Tiller et al., 2007). Grundsätzlich unterscheidet sich die V(D)J Rearrangierung zwischen funktionellen IgHV Genen bei der GPA und Gesunden. Besonders deutlich war die geringere Frequenz in der Verwendung von IgHV3-23 und in leichterem Ausmaß von IgHV3-30-3 bei der GPA. Erstaunlicherweise wurden sowohl IgHV3-23 als auch IgHV3-30 bei der Bildung humaner anti-PR3 Antikörper rearrangiert (Davis et al., 1998; Finnern et al., 1995; Sibilia et al., 1997). Möglicherweise beruht diese Diskrepanz auf der Therapie, welche die Patienten der Meta-Analyse erfahren haben. Einige Patienten (Müller et al., 2014; Voswinkel et al., 2006, 2008a) wurden mit Immunsuppressiva, immunmodulatorisch-antientzündlich und/oder antibiotisch wirkenden Medikamenten behandelt (siehe Punkt 4.8 und 3.2.1). Einige unbehandelte GPA-Patienten der Meta-Analyse deuten weitere Einflußfaktoren auf das IgHV-Repertoire an. Bei fortschreitender Erkrankung ist - im Zuge der Immunantwort auf ein anderes Epitop der PR3 (Kuhl et al., 2010) - die Selektion anderer IgHV-Gene des PR3-ANCA im IgHV-Repertoire des Gewebes denkbar. Besonders weil die IgHV3-23 oder IgHV3-30 rearrangierten anti-PR3 Antikörper der IgM Klasse angehören und neben zwei GPA-Patienten auch in einem Gesunden vorgekommen sind (Davis et al., 1998; Finnern et al., 1995; Sibilia et al., 1997). Weiteren Einfluß auf die Frequenz von IgHV3-23 und IgHV3-30-3 könnte die Immunantwort auf *S. aureus* sein, die unter antibiotischer Therapie verändert sein kann. *S. aureus* Protein A (SpA) bindet an eine Region aus 13 Aminosäuren in der FWR, die in IgHV3 konserviert ist (Graille et al., 2000). Dieses Motiv wurde in 62 % funktioneller IgHV Gene im peripheren Blut eines Gesunden (Brezinschek et al., 1995) deutlich häufiger als im GPA-Gewebe nachgewiesen, wobei das gehäufte Auftreten in IgHV3 bei HC und GPA nachvollzogen werden konnte. Trotz der Präsenz oder Abwesenheit verschiedener Virulenzgene aus *S. aureus* Isolaten von AAV-Patienten, die eine Relevanz für den Verlauf der Erkrankung implizieren, wurden generell niedrigere IgG Konzentrationen gegen verschiedene Antigene von *S. aureus* im Vergleich zu Gesunden festgestellt (Glasner et al., 2017). Des Weiteren steigert ein Fehlen von IgHV3-30-3 auf Grund einer genetischen Deletion die Empfänglichkeit einer Nephritis in SLE (Cho et al., 2003). Wenn in einigen GPA-Patienten ebenfalls kein IgHV3-30-3 vorkommt, kann eine genetische Deletion in Betracht gezogen werden, die möglicherweise mit der eingeschränkten Immunantwort gegen *S. aureus* zusammen hängt. Der Mangel an IgHV3-23 und IgHV3-30-3 kann auch in Folge eines sekundären Mechanismus der IgH-Ersetzung durch vorwärtsliegende V<sub>H</sub> Gensegmente in bestehende Rearrangierungen (siehe Punkt 3.1.2) entstanden sein, da IgHV3-23 und IgHV3-30-3 wie in Abb. 20 dargestellt recht weit abwärts

im Genom lokalisiert sind. Eine spezifisch bevorzugte Verwendung eines vorwärts liegenden  $V_H$ -Gensegmentes ist in Abb. 20 jedoch nicht zu erkennen.

An der Ausselektionierung von IgHV Genen mit einer verlängerten, positiv-geladenen CDR3-Region in unreifen B-Zellen (Wardemann et al., 2003) und der Anreicherung von IgHV Genen mit positiv-geladener CDR3-Region in somatisch-hypermutierten IgG<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen (Tiller et al., 2007) wurde die Assoziation mit Autoimmunität bestärkt (Ichiyoshi und Casali, 1994). Die Meta-Analyse von IgHV Genen im GPA-Gewebe zeigt im Vergleich zu HC eine signifikante Verlängerung der CDR3-Region und festigt bisherige Tendenzen in IgHV Genen von Plasmazellen (Müller et al., 2014). Des Weiteren ist das rearrangierte  $J_H$  Gensegment an der Verlängerung beteiligt, da der Unterschied zu HC unter Einbezug des IgHJ Anteils der CDR3 deutlicher war. In der Hälfte der GPA-Patienten lag im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Verwendung von IgHJ4 und erhöhte Verwendung von IgHJ5 und IgHJ6 vor, wobei IgHJ6 das längste  $J_H$  Gensegment ist. Eine signifikante Verlängerung der CDR3 lag jedoch auch ohne Einschluß des IgHJ Beitrags vor. Als weiterer Einflußfaktor kann keine Dopplung der IgHD-Region einer sekundären Rearrangierung (Briney und Crowe, 2013) für die untersuchten IgHV Gene in Betracht gezogen werden, da solche Rearrangierungen von IMGT/highV-QUEST (Alamyar et al., 2012; Giudicelli et al., 2015) nicht als produktiv erkannt werden. Möglicherweise liegen in der CDR3-Region nicht nur die typischen Einzelnukleotidsubstitutionen der SHM vor, sondern auch SHM assoziierte Insertionen von meist 1-2 Codons (Briney und Crowe, 2013; Wilson et al., 1998). Wegen des unterschiedlichen Ursprungs der untersuchten Sequenzen und der verschiedenen Sequenzierungstechniken sollte dieses Ergebnis mit größerer n-Zahl validiert werden.

Die Abweichung im Verhältnis zwischen Transition/Transversion kann Hinweise auf eine veränderte SHM liefern (siehe Punkt 3.1.3). Analog zur Parotis beim Sjögren-Syndrom lag in den funktionellen IgLV Genen im entzündlichen Gewebe bei der GPA tendentiell mehr Transversion vor, wobei eine Validierung mit größerer n-Zahl nötig ist. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen (RA oder MS) zeigten funktionelle IGHV Gene bei der GPA mehr Transition als Transversion (Zuckerman et al., 2010).

Die HotSpot-Motive in IgHV & IgLV Genen bei HC und GPA bestätigen vorherige Erkenntnissen nur bedingt (Odegard und Schatz, 2006; Rogozin und Diaz, 2004; Spencer und Dunn-Walters, 2005; Zuckerman et al., 2010). Dabei muss bedacht werden, dass der Vergleich zu anderen Studien und auch zwischen HC und GPA durch verschiedene Quellen und Anzahlen klonaler IgHV & IgLV Gene grundsätzlich beeinträchtigt wird. IgHV & IgLV Gene stammen bei der GPA aus dem Gewebe, bei HC aus Blut und Knochenmark (siehe Abb. 26-28). Außerdem wurden im Gegensatz zu unserem Ansatz die HotSpot Motive bei (Zuckerman et al., 2010) mit IgTree (Barak et al., 2008) berechnet.

Der Ig-Tree Algorithmus analysiert Immunglobuline unter Verwendung phylogenetischer Bäume, die die Klonalität einer B-Zelle berücksichtigt. Der Ursprung stellt das Keimbahngen dar, im Stamm sind intermediäre Sequenzen zu finden mit Mutationen, die früh aufgetreten sind, und die Blätter stellen Sequenzen gereifterer B-Zell Klone dar. Der größte Unterschied zu unserem Ansatz besteht darin, dass bei der Suche nach HotSpot Motiven jede Sequenz mit ihrem jeweiligen Vorläufer verglichen wurde, statt mit dem Keimbahngen (Barak et al., 2008).

Des Weiteren können Abweichungen sowohl an der vermischten Zuordnung unterschiedlicher B-Zell Phänotypen als auch der Gruppierung von Patienten unterschiedlichen Alters liegen. Denn verschiedene B-Zell-Typen weisen unterschiedliche Repertoire-Eigenschaften auf, die sich mit dem Alter des Individuums weiter verändern, sodass eine Durchmischung Informationen verzerrt (Martin et al., 2015). Auch die hier gezeigte Zusammenfassung von CDR und FWR kann detaillierte Informationen verdecken. Denn im Gegensatz zur Struktur-bildenden Rahmenregion (FWR) ist die Frequenz an Hotspot-Motiven für "C" und "G" in der CDR-Region erhöht (Briney und Crowe, 2013; Wagner et al., 1995). Sowohl bei HC als auch bei der GPA konnten die Motive WRCH und DGYW kaum bestätigt werden, wenn funktionelle IgHV Gene gemischt untersucht wurden. Separiert man jedoch funktionelle IgHV Gene aus Einzelzellen des GPA-Gewebes in CD20<sup>+</sup> und CD138<sup>+</sup>, bilden sich die Motive WRCH und DGYW in den CD20<sup>+</sup> heraus. Auch das Motiv WAW bestätigt sich bei den CD20<sup>+</sup> B-Zellen bei der GPA, jedoch weniger deutlich in der gemischten Analyse. Das Motiv WTW konnte bei der GPA identifiziert werden. Grundsätzlich scheinen die Motive WAW und WTW robuster während der Entwicklung von B-Zellen vertreten zu sein.

Unter positiver/negativer Selektion versteht man eine signifikante Erhöhung/Senkung in der Anzahl an Austauschmutationen im Vergleich zur erwarteten Frequenz in Folge eines Anpassungsprozesses an ein Antigen, die mit dem Baseline-Algorithmus quantifiziert wurde (Yaari et al., 2012, 2013). In der FWR von IgHV Genen aus dem entzündeten Gewebe bei der GPA fand sich eine negative Selektion, was in Einklang mit anderen Autoimmunerkrankungen steht (Cho et al., 2014; Zuckerman et al., 2010). Nennenswerterweise bleibt bei der Separierung in CD20<sup>+</sup> Zellen und Plasmazellen die negative Selektion der FWR von IgHV Genen nur in Plasmazellen erhalten. In peripheren Gedächtnis B-Zellen aus drei gesunden Probanden lag negative Selektion in IgHV Genen vor (Yaari et al., 2012). Abweichend von Gesunden zeigen CD20<sup>+</sup> B-Zellen im GPA-Gewebe in der Rahmenregion von IgHV Genen mit einer verminderten Senkung an Austauschmutationen auch eine weniger starre Konservierung, was möglicherweise eine Besonderheit in der Entwicklung autoreaktiver IgHV Gene ist.

Zusammenfassend betrachtet implizieren die V(D)J Rearrangierungen und deren mögliche sekundäre Modifikationen in IgHV und IgLV Genen eine Affinitätsreifung autoreaktiver B-Zellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA. Weil im Gewebe eine Exposition des Autoantigens PR3 vorliegt, die u. a. aus der Aktivierung von Neutrophilen im entzündlich-nekrotischen Gewebe resultiert (Jennette et al., 2014), kann man annehmen, dass dort auch PR3-ANCA produziert werden. Der Nachweis einer Entwicklung autoreaktiver B-Zellen im Gewebe kann durch einen Vergleich des IgHV Repertoires naiver B-Zellen, Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen anhand klonaler Expansion erbracht werden, wie z. B. bei der RA gezeigt wurde (Scheel et al., 2011).

### **7.3 Vergleich der Eigenschaften zwischen IgLV & IgHV Gensequenzen von anti-hPR3 Ig und IgLV & IgHV Gensequenzen aus entzündetem Gewebe bei der GPA**

Eine pathogenetische Rolle von PR3-ANCA-produzierenden B-Zellen in der extravaskulären, granulomatösen Entzündung bei der GPA wurde postuliert (Jennette et al., 2014). Der Zusammenhang eines Rezidivs mit infiltrierenden B-Zellen in der granulomatösen Entzündung anhand einer refraktären GPA unter Rituximab-Therapie (Ferraro et al., 2008) betont die Bedeutung des entzündlichen Gewebes bei der GPA. In der granulomatösen Entzündung bei der GPA wurden bereits CD20<sup>+</sup> B-Zellen nachgewiesen, die Autoantikörper produzieren (Thurner et al., 2011). Trotzdem fehlt ein direkter Nachweis PR3-ANCA produzierender B-Zellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA. Erstmals wurde eine Präsenz vereinzelter PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA indirekt nachgewiesen (Weppner et al. eingereicht). Dabei wurde ein anti-PR3-ANCA Antikörper (anti-5/7 Id (Strunz et al., 1997)) zusammen mit anti-IgG zur Detektion eingesetzt, was jedoch nicht alle Antikörperklassen und Epitopvarianten der PR3-ANCA abdeckt. Mit der Entwicklung markierter PR3, die zur Identifizierung peripherer PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zellen benutzt wurde (Cornec et al., 2017), kann der Nachweis von PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zellen im GPA-Gewebe optimiert werden. Ein IgHV- & IgLV- Sequenzvergleich von PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zellen mit Genen aus der granulomatösen Entzündung bei der GPA kann weitere Hinweise auf PR3-ANCA produzierende B-Zellen im Gewebe liefern.

Auffällig ist die bevorzugte Rearrangierung von IgkV4-1 in zwei murinen monoklonalen anti-PR3 IgG Antikörpern (WGM2 & WGM3) und zwei anti-PR3 IgM Antikörpern (WG3 & WG4) aus GPA-Patienten (Sibilia et al., 1997) unter den sieben untersuchten anti-PR3 Ig. Dies spricht für eine Rolle von IgkV4-1 bei der Bildung von PR3-ANCA. Die PR3-Erkennung durch einen IgHV3-23-Antikörper eines GPA-Patienten (PR3 M2) wird von Vk4 unterstützt, jedoch von λ-Leichtketten verhindert (Finnern et al., 1995). Eine andere Gemeinsamkeit innerhalb der anti-PR3-Ig ist die Rearrangierung von IgHV1 in vier von acht untersuchten Antikörpern.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der CDR3-Region in den IgHV Genen der acht anti-PR3 Ig ist sehr divers. Obwohl die Aminosäuren zur Erkennung eines konformationellen Epitopes an verschiedenen Stellen der linearen Sequenz liegen können, scheinen mehrere Epitope der PR3 targetiert zu werden. WGM2 und WGM3 wurden beispielsweise verschiedenen Epitopregionen der PR3 zugeordnet (van der Geld et al., 1999; Kuhl et al., 2010). Dabei bestimmt die Epitopspezifität die Funktion des anti-PR3 Ig und beeinflusst das klinische Erscheinungsbild (Silva et al., 2010). ANCA, die in der Nähe des aktiven Zentrums binden, gelten als bedrohlich, da sie die Interaktion mit PR3-Inhibitoren verhindern oder verzögern könnten. Als harmlos werden solche ANCA eingestuft, deren Epitope von Lipiden verborgen werden (Kuhl et al., 2010). WGH1, der einzige anti-PR3 IgM mit  $\lambda$ -Leichtkette unter den acht untersuchten, erkennt möglicherweise ein weniger pathogenes Epitop. Denn natürlich auftretende Autoantikörper gesunder Probanden, die normalerweise im Knochenmark produziert werden, können effektiver durch den Austausch mit einer  $\lambda$ -Leichtketten als einer  $\kappa$ -Leichtkette in ihrer Autoreaktivität gedämpft werden (Wardemann et al., 2004). Des Weiteren weisen Antikörper des IgM Isotyps eine geringere Affinität zum Antigen auf (Di Noia und Neuberger, 2007).

In den einzelnen Rahmenregionen (FWR2, FWR3, FWR4) von IgHV & IgLV Genen sind jeweils mindestens 4 Aminosäuren innerhalb der acht anti-PR3 Ig konserviert. Hier scheint eher eine allgemeine Bedeutung vorzuliegen, da der Vergleich mit drei anti-Ro60 IgG dieselben Übereinstimmungen hervorbringt. Dies steht außerdem in Einklang mit der negativ selektionierten Rahmenregion in IgHV Genen der granulomatösen Entzündung bei der GPA.

231 IgHV & 18 IgLV Gene verschiedener B-Zell Klone der granulomatösen Entzündung bei der GPA wiesen wenig Übereinstimmung mit den acht anti-PR3 Ig auf, was den linearen Vergleich der CDR3-Region und der V(D)J Rearrangierung betrifft. Bemerkenswerterweise waren unter den 18 IgLV Genen respiratorischen GPA-Gewebes keine IGkV4-Rearrangierungen. Es gab im Vergleich mit WGH1 im GPA-Gewebe zwei Gene identischer Ig $\lambda$ V2-14\*01 Familie, ähnlichem J-Segment und CDR3-Region. Unter Verwendung der Sanger-Sequenzierung wurde keine identische V(D)J Rearrangierung und CDR3-Region in IgHV & IgLV Genen aus GPA-Gewebe zu den acht anti-PR3 Ig detektiert. Dies spricht gegen ein massives Vorkommen an B-Zell Klonen mit einem genetischen Muster der acht anti-PR3 Ig.

Um herauszufinden, ob es bei der GPA Unterschiede zwischen Blut und entzündetem Gewebe gibt und um ggf. seltene Klone zu finden (Bentley et al., 2009), wurde die Technik des "next generation sequencing" anhand des IgLV Repertoires etabliert. Nach Aufarbeitung der Rohdaten mit pRESTO (Vander Heiden et al., 2014) und IMGT/highV-QUEST (Alamyar et al., 2012; Giudicelli et al., 2015) wurde ersichtlich, dass wie geplant ein

B-Zell Leichtkettengen Repertoire sequenziert wurde. Gewöhnlich bleibt die Gruppierung zu Klonen auf IgHV Gene beschränkt, da die Diversität von IgLV Genen für eine angemessene Sicherheit nicht ausreicht (Yaari und Kleinstein, 2015). In der Meta-Analyse konnten Leichtkettenklone identifiziert werden, da sie aus Einzelzellen isoliert wurden und der klonalen Schwerekette zugeordnet wurden. Mit der Funktionen CollapseSeq in pRESTO (Vander Heiden et al., 2014) können Fehler der PCR behoben werden, da das Repertoire zu verschiedenen Sequenzen zusammengefasst wird, die wenigstens zwei Mal in identischer Weise vorgekommen sind. Leider braucht CollapseSeq sehr viel Arbeitsspeicher, sodass eine Anwendung vorerst nicht durchgeführt wurde.

Alternativ kann zur Aufarbeitung der Rohdaten ClonoCalc benutzt werden (Fährlich et al., 2017). Dabei wird, wie ebenfalls in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, mit dem FASTX Barcode splitter (Hannon Lab, Howard Hughes Medical Institute, USA) das Index-Splitting der Rohdaten durchgeführt. Alternativ zu IMGT/highV-QUEST (Alamyar et al., 2012; Giudicelli et al., 2015) wird bei ClonoCalc jedoch MiXCR (Bolotin et al., 2015) für die Extraktion humaner BCR verwendet (Fährlich et al., 2017). Eine solche Aufarbeitung bereitet die Daten für ClonoPlot vor - ein Programm zur Visualisierung der vergleichenden deskriptiven Analyse, jedoch mit starkem Fokus auf T-Zell Rezeptoren (Fährlich et al., 2017). Trotz der benutzerfreundlicheren graphischen Programmoberfläche von ClonoCalc wurde pRESTO (Vander Heiden et al., 2014) für die Aufarbeitung der Rohdaten vorgezogen, da die resultierenden IMGT/highV-QUEST Dateien sowohl mit den programmierten Algorithmen als auch mit ChangeO (Gupta et al., 2015), einem hochentwickelten Werkzeug für die Analyse von Immunglobulin-Genen, kompatibel sind. Erste Ergebnisse des Leichtkettengenrepertoires können, trotz der noch enthaltenen repetitiven Sequenzen, Tendenzen aufzeigen und demonstrieren, dass mit diesen Daten gearbeitet werden kann. Unterschiede zwischen Blut und Gewebe bei der GPA zeigten sich im Verhältnis zwischen  $\kappa$  und  $\lambda$  Leichtketten. Die Frequenz der Ig $\lambda$ V Gene ist im Gewebe im Vergleich zum Blut etwas erhöht. Die Mehrheit der produktiven IgLV-Gene bei der GPA im Gewebe (90 %) und Blut (97 %) sind jedoch vom  $\kappa$ -Typ. Es ist bekannt, dass im Menschen ca. 40 % aller Antikörper  $\lambda$ -Leichtketten aufweisen (Wardemann et al., 2004). Der sehr geringe Anteil von Ig $\lambda$ V in den GPA-Proben kann durch technische Probleme bedingt sein. Natürlich auftretende Autoantikörper gesunder Probanden, die normalerweise im Knochenmark produziert werden, können effektiver durch den Austausch mit einer  $\lambda$ -Leichtketten als einer  $\kappa$ -Leichtkette in ihrer Autoreaktivität gedämpft werden. Eine solche Rezeptoreditierung polyreaktiver Autoantikörper findet im Knochenmark während des Übergangs zu unreifen B-Zellen statt, in der autoreaktiven B-Zellen deletiert werden (Wardemann et al., 2004). Ob die untersuchten Proben ausreichend repräsentativ für das gesamte Kompartiment sind, um sinnvolle Schlußfolgerungen zu ziehen, kann mit

technischen Replikaten untersucht werden (Greiff et al., 2015). Somit kann der hohe Anteil an  $\kappa$ -Leichtketten wegen möglicher technischer Verzerrung ein erhöhtes autoreaktives Potenzial von B-Zellen in Blut und Gewebe bei der GPA nur andeuten.

Der Vergleich der anti-PR3 Ig mit den 231 gewebständigen IgHV und IgLV Klonen (Meta-Analyse) zeigte keine bis wenig Übereinstimmung in Bezug auf die V(D)J Rearrangierung und die abgeleitete Aminosäuresequenz der CDR3. Das mittels NGS erstellte Leichtkettengenrepertoire von korrespondierenden Blut- und Gewebeproben bei der GPA ergab hingegen 1-14 % mit den anti-PR3-Ig vergleichbaren VJ Rearrangierungen pro Probe, wobei durchschnittlich über 1 Million Sequenzen pro Probe betrachtet wurden. Dabei sollte bedacht werden, dass bei der Meta-Analyse 10 von 15 Patienten PR3-ANCA<sup>+</sup> waren und bei der NGS-Analyse 4 von 5 Patienten. Obwohl die anti-PR3 Ig in der CDR3 der Schwereketten sehr variabel sind, wurde in der Leichtkette gehäuft Igk4 rearrangiert. In der Tat beträgt innerhalb der produktiven IgLV Gene des anti-PR3-Ig-Typs der Anteil von IgkV4-1\*01 Genen 94 bis 98 % in Blut und Gewebe bei der GPA. Dass im GPA-Gewebe von Patienten mit einer aktiven GPA der höchste Anteil (9, 14%) an VJ-Rearrangierungen des anti-PR3-Ig-Typs vorkam, ist möglicherweise ein weiteres Indiz für die Bedeutung des entzündlichen Gewebes bei der GPA. Warum der Anteil an  $\lambda$ -Leichtketten im GPA-Gewebe im Vergleich zu korrespondierenden Blutproben bei der GPA leicht erhöht ist, jedoch nur zu 1 % VJ-Rearrangierungen des anti-PR3-Ig-Typs im GPA-Gewebe vorkommen, bedarf weiterer Analysen.

Da der Isotyp (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE) eines Antikörpers von der C-Region determiniert wird (Schwartz, 2003), kann eine Separation der Repertoiredaten in die Antikörperklassen zusammen mit der Korrektur von PCR-Fehlern die Aussagekraft nachfolgender Analysen steigern. Das Leichtkettengenrepertoire kann mit weiteren Werkzeugen wie ChangeO (Gupta et al., 2015) für Hoch-Durchsatz-Daten weiter analysiert werden, wie beispielsweise der Baseline-Funktion. Ein Abgleich der CDR3 Region in IgLV Genen des Repertoires mit den sieben CDR3-Regionen der anti-PR3-Ig unterstützt Hinweise auf Ähnlichkeiten mit PR3-ANCA. Da die meisten Epitope der PR3 konformationell sind (siehe Punkt 3.2.2), sollten nicht nur lineare Vergleiche sondern auch Computersimulationen gefalteter Strukturen zum Abgleichen in Betracht gezogen werden. Für den Spezifitäts-Nachweis auf Proteinebene kann die Methodik des Next Generation Phage Display (Greiff et al., 2017) in Betracht seltener PR3-ANCA<sup>+</sup> B-Zell-Klone im entzündlichen Gewebe bei der GPA hilfreich sein.

#### **7.4 Erhöhte Expression von Blimp1 mRNA in PBMC und erhöhte Anzahl von IL-21R<sup>+</sup> Zellen im entzündlichen Gewebe bei der GPA**

Bei der GPA konnte im Vergleich zu Gesunden ein erhöhter Anteil peripherer IL-21<sup>+</sup> T<sub>FH</sub> Zellen festgestellt werden. Mit IL-21 konnte in-vitro die PR3-ANCA Produktion von PBMC aus ANCA positiven Patienten im Vergleich zu ANCA negativen Patienten signifikant gesteigert werden (Abdulahad et al., 2013). Obwohl in peripheren B-Zellen keine veränderte IL-21R Expression messbar war, war ein erhöhter Anteil IL-21<sup>+</sup> Gedächtnis B-Zellen bei der GPA im Vergleich zu HC detektierbar (Lepse et al., 2016). Inwiefern die Wirkweise von IL-21 auf Transkriptionsebene in Blut und Gewebe bei der GPA verändert ist, wird im Folgenden diskutiert.

Wie für die IL-21R Expression peripherer B-Zellen bei der GPA gezeigt (Lepse et al., 2016), impliziert die Transkriptionsanalyse von IL-21 und IL21R peripherer Lymphozyten bei der GPA eine Maskierung von Effekten durch Subpopulationen. Es wird angenommen, dass der fehlende Nachweis von Unterschieden nicht daran liegen, dass nur eine Transkriptionsvariante betrachtet wurde. Obwohl periphere Leukozyten keine veränderte IL-21 oder IL-21R Transkription im Vergleich zu Gesunden zeigten, ist nicht auszuschließen, dass erhöhte Konzentrationen an sezerniertem IL-21 von anderen Zelltypen im GPA Serum nachweisbar sind. So wurden beispielsweise in einem SLE Mausmodell eine erhöhte Mengen an IL-21 Transkripten in der Milz und erhöhte IL-21 Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden, was eine Rolle in der Entwicklung von Autoimmunität impliziert (Ozaki et al., 2004). In PBMC bei der GPA war jedoch eine erhöhte Blimp1 Transkription im Vergleich zu Gesunden trotz der n-Zahl von nur 6-7 Probanden nachweisbar. Es kann sinnvoll sein die n-Zahl weiter zu erhöhen, um Aufschluss über Korrelationen mit Krankheitsaktivität und/oder Medikation zu erhalten. Um herauszufinden, ob die erhöhte Transkription von Blimp1 in PBMC von T- oder B-Zellen stammt, müssen getrennte Analysen durchgeführt werden. Denn Blimp-1 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in T-Zellen (siehe Punkt 3.1.4). Ob die erhöhte Blimp1 Transkription bei der GPA IL-21 induziert ist und eine verstärkte Antikörpersekretion in Plasmazellen bewirkt, bleibt Spekulation, wurde allerdings als allgemeiner Mechanismus beschrieben (Kwon et al., 2009; Ozaki et al., 2004; Rodríguez-Bayona et al., 2012). Tendenziell lag in peripheren Leukozyten bei der GPA eine verringerte IL-21R Transkription vor, was bedeuten könnte, dass Subpopulationen IL-21R<sup>+</sup> Zellen in das entzündliche Gewebe abgewandert sind. Denn in ANCA assoziierten Vaskulitiden wie GPA wurde eine verringerte Anzahl an Gedächtnis B-Zellen im Blut bei aktiven Patienten festgestellt (Lepse et al., 2014), möglicherweise in Folge ihrer Rekrutierung zum Ort der Entzündung oder ihrer Differenzierung in Plasmazellen (Schrezenmeier et al., 2018). Interessanterweise konnten auch in der granulomatösen Entzündung IL-21 Transkripte nachgewiesen werden, die zwar sehr gering

waren, aber im Zusammenhang mit einer erhöhten IL-21R Expression im entzündlichen Gewebe im Vergleich zur chronischer Rhinosinusitis eine verstärkte Wirkung zeigen können. Dass in der chronischen Rhinosinusitis eine verringerte IL-21R Expression vorlag, unterstreicht deren Rolle für Autoimmunität bei der GPA. Die Identifikation IL-21R exprimierender Zellen umfasst jedoch viele Möglichkeiten, da der IL-21R zwar hauptsächlich im lymphoiden Geweben und von periphere Blut-Lymphozyten exprimiert wird (Parrish-Novak et al., 2000), jedoch auch von Thrombozyten, Neutrophilen und Eosinophilen (Takeda et al., 2014). Eine Doppelfärbung der granulomatösen Entzündung mit IL-21R und CD4 kann die Art CD4<sup>+</sup> Zellen nur begrenzt charakterisieren. Neben Subpopulationen an T-Zellen produzieren auch Monozyten/Makrophagen, Eosinophile, Mastzellen/Basophile und periphere Neutrophile den CD4 Marker (Biswas et al., 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass auch gewebsständige Neutrophile CD4 exprimieren, sodass die Zuordnung der Quelle IL-21R<sup>+</sup> Zellen weitere bzw. andere Marker verlangt. Fast alle Neutrophilen scheinen IL-21R zu exprimieren, jedoch in geringerer Weise als Lymphozyten (Takeda et al., 2014). IL-21 stimulierte Neutrophile zeigen eine gesteigerte phagozytotische Aktivität und erhöhte Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies (Takeda et al., 2014). Bei aktiver GPA und während der Remission wurde eine Expansion zirkulierender proinflammatorischer T<sub>H</sub> 17 Zellen im Vergleich zu Gesunden festgestellt, die nicht von T regulatorischen Zellen ausgeglichen wurde und nur teilweise durch therapeutische Medikamente. Dies könnte eine pathogene Rolle dieser Zellen anzeigen (Wilde et al., 2012). Im GPA-Gewebe war jedoch nur sehr wenig IL-21 mRNA und noch geringere Mengen an IL-17A Transkripten messbar. Interessanterweise wird IL-21 jedoch normalerweise gar nicht im Gewebe exprimiert (Parrish-Novak et al., 2000). T<sub>H</sub> 17 Zellen produzieren charakteristischerweise IL-17A (Murphy, 2012). Daher liegt vermutlich keine dauerhafte und ausgeprägte T<sub>H</sub> 17-Antwort im Gewebe vor. Da die T<sub>H</sub> 17 Zellen unter Beteiligung von IL-21 entwickelt werden können, aber unter den CD4<sup>+</sup> T Zellen als größte Produzenten von IL-21 gelten (Korn et al., 2007), kommen im GPA-Gewebe andere Zellen als IL-21 Produzenten in Frage. IL-21 wird in hoch-kontrollierter Weise von CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert, die durch Stimuli einer Antigenreaktion aktiviert wurden (Parrish-Novak et al., 2000). Im Detail wird IL-21 neben T<sub>H</sub> 17 Zellen auch von T<sub>FH</sub> Zellen, T<sub>NK</sub> Zellen (Takeda et al., 2014) und Neutrophilen exprimiert (Tecchio et al., 2014). Da Neutrophile bei der GPA eine zentrale Rolle in der Pathogenese haben (Jennette et al., 2014; Korkmaz et al., 2016), könnte eine IL-21 Expression nur in einer Subpopulation an Neutrophilen vorliegen. Die sogenannten "low density neutrophils" stellen eine solche Subpopulation dar (Scapini und Cassatella, 2014). Der Nachweis von IL-21, IL-21R und Blimp1 Transkripten in der granulomatösen Entzündung kann im Zusammenhang mit einer verstärkten Sekretion spezifischer Antikörper wie den PR3-ANCA stehen (Kwon et al., 2009; Ozaki et al., 2004;

Rodríguez-Bayona et al., 2012). Eine vergleichende Analyse dieser Transkripte in nasalen Schleimhautbiopsien von Gesunden oder Patienten mit chronischer Rhinosinusitis würde eine bessere Beurteilung der Daten ermöglichen.

Zusammenfassend sprechen die Daten für eine Rolle von Blimp1 bei der GPA, die sowohl B als auch T-Zellen betreffen könnte. Im Gewebe könnte eine IL-21-abhängige Induktion von Blimp1 vorliegen, die über den IL-21R vermittelt wird, und möglicherweise die Ig-Produktion von Plasmazellen unterstützt. Geringe Konzentrationen an IL-17A Transkripten suggerieren keine ausgeprägte T<sub>H</sub> 17 Antwort im entzündlichen Gewebe bei der GPA.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

18SrRNA	18 S ribosomale Ribonukleinsäure
A	Adenin
AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
AEC	3 Amino 9 ethylcarbazol
AIC	Akaike Informationskriterium
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ANCA	anti-Neutrophile-zytoplasmatische-Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BCMA	<i>B cell maturation Ag</i>
BHLHA15	<i>basic helix-loop-helix family member a15</i>
Blimp1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
BPGM	Bisphosphoglycerate Mutase
BPHL	<i>biphenyl hydrolase-like protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BVAS	<i>Birmingham Vasculitis Activity Score</i>
C	Cytosin
CD	Cluster der Differenzierung
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
CDR	komplementaritätsdeterminierende Region
CHO	ovariellen Zellen chinesischer Hamster
c-Myc	c-Myc Protein (Proto-oncogen)
CpG	lineares Dinukleoid aus Cytosin und Guanin
CRACR2B	<i>Calcium release activated channel regulator 2B</i>
C-Region	konstante Region
CrS	chronische Rhinosinusitis
CRT	zyklischen, reversiblen Termination
C-terminal	carboxyterminal
C <sub>t</sub> -Wert	Anzahl an nötigen Zyklen bis zum Beginn der exponentiellen Phase
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4
D	Diversitäres Gensegment von Immunglobulinen
dest.	destilliert
DMF	N,N-Dimethylformamide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGPA	Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

FBXO2	F-box protein 2
Fc	kristallisiertes Fragment bzw. der Stamm eines Immunglobulins
FDCs	follikulär dendritische Zellen
FIR	<i>(far upstream element binding protein) - interacting repressor</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein P3</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FWR	Rahmenregion
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GST	Glutathione S-Transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HC	gesunde Kontrolle
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
hLAMP2-ANCA	ANCA, die humanes, lysosomales Membranprotein 2 erkennen
hnRNP	nukleäre Ribonukleoproteine
HPA	humaner Protein Atlas
hPR3	humane Proteinase 3
Id	Idiotyp
Ig	Immunglobulin
IgG1	Immunglobulin der Klasse G und des Subtyps 1
IgHV	<i>immunoglobulin heavy chain variable genes</i>
IgL <sub>V</sub>	<i>immunoglobulin light chain variable genes</i>
IL	Interleukin
IL-21R	Interleukin-21 Rezeptor
IMGT	<i>international ImMunoGeneTics information system</i> <sup>®</sup>
IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	Junktionales Gensegment von Immunglobulinen
kb	Kilo Basen
La/SSB	Lupus La protein/Sjögren Syndrom Typ B Antigen
LB	Luria-Bertani-Medium
LED	Leuchtdiode
LPS	Lipopolysaccharid
LREM	<i>linear random effects models</i>
mAK	monoklonale Antikörper
MAS1	Rezeptor für Angiotensin (1-7)
MDS	<i>multi dimensional scaling</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
mRNA	gesandte Ribonukleinsäure
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein MyD88</i>

n. d.	nicht determiniert
NAA10	<i>N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit</i>
NAA40	<i>N(alpha)-acetyltransferase 40, NatD catalytic subunit</i>
nAK	natürliche Antikörper
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
neg.	negativ
NGS	<i>next generation sequencing</i>
N-terminal	aminoterminal
oligo dT	einige Desoxythymidine
PBL	periphere Leukozyten im Blut
PBMC	periphere mononukleäre Zellen im Blut
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
pH	Potentia hydrogenii
PHE	Phenylalanin
PMN	polymorphonukleäre Leukozyten
PNA <sub>d</sub>	<i>peripheral node addressin</i>
pos.	positiv
PR3	Proteinase 3
PRDM1	<i>positiv regulator domain zinc finger protein 1</i>
Prod.	produktiv
PUF60	<i>Poly(U)-binding-splicing factor 60</i>
qPCR	quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RAD23A	RAD23 Homolog A, <i>nucleotide excision repair protein</i>
RE	Restriktionsenzym
rlgG	rekombinantes Immunglobulin G
RNA	Ribonukleinsäure
Ro60/Ro/SSA	60 kDA Ro Protein/Sjögren Syndrom Typ A Antigen
ROR- $\gamma$ t	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor</i>
RT	Raumtemperatur
rxt	Reaktion
SCF	SKP1-CUL1-F-box protein
SLC44A3	<i>solute carrier family 44 member 3 (Choline transporter-like protein 3)</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SMARCC2	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily c member 2</i>
SpA	<i>S. aureus</i> Protein A
SS	Sjögren Syndrom
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SYNJ2BP	Synaptojanin-2-bindendes Protein
T	Thymidin
TACI	<i>transmembrane-activator and calcium modulator and cyclophilin interactor</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
T <sub>FH</sub>	T folliculäre Helferzellen
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-beta</i>
T <sub>H</sub> 17	spezielle T-Helferzellen, die u. a. Interleukin-17A produzieren
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TMEM9B	Transmembranprotein 9B
T <sub>NK</sub>	natürliche Killer T-Lymphozyten
TRIM21/Ro52/SSA	<i>tripartite motif containing 21</i>
U	Uracil
Unprod.	unproduktiv
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	ungefaltete Protein-Antwort
UV	ultraviolett
V	Variables Gensegment von Immunglobulinen
VDI	<i>Vasculitis Damage Index</i>
V-Region	variable Region
ZNF783	<i>zinc finger family member 783</i>

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Entwicklung kurzlebiger und langlebiger Plasmazellen (Chu und Berek, 2013) .....	9
<b>Abbildung 2:</b> Entstehung der Antikörpervielfalt; (Schwartz, 2003) .....	11
<b>Abbildung 3:</b> Eine Gleichgewicht zwischen T-Zellen, B-Zellen und Antikörpern, die eine autoreaktive und/oder körperfremde Reaktivität aufweisen, ist an der normalen Immun-Homöostase beteiligt (Jennette und Falk, 2010).....	16
<b>Abbildung 4:</b> Drei nicht-überlappende Epitope der humanen PR3 (1, 3, 4), die durch verschiedene monoklonale Antikörper markiert werden (Kuhl et al., 2010). .....	22
<b>Abbildung 5:</b> Pathogene Rolle der PR3 (Korkmaz et al., 2016).....	24
<b>Abbildung 6:</b> Unterschiede zwischen der PR3 und der MPO und den entsprechenden ANCA's (Cornec et al., 2016) .....	24
<b>Abbildung 7:</b> CD138 <sup>+</sup> gefärbte Zelle im Zellverband einer nasalen Biopsie, aufgenommen im 40er Objektiv – vor und nach der Lasermikrodissektion .....	41
<b>Abbildung 8:</b> Aufbau des Transfervektoronstruktes (pVTC kappa) für die Expression von Leichtketten-Genen des $\kappa$ -Typs .....	48
<b>Abbildung 9:</b> Methodischer Überblick für Substitutions- und Deletions-PCR mittels Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Quelle: NEB-Manual E0554) .....	52
<b>Abbildung 10:</b> Methodische Übersicht zur Konstruktion rIgG exprimierender Baculoviren in Insektenzellen (Cérutti und Golay, 2012).....	55
<b>Abbildung 11:</b> Arm-PCR Technologie zur Erstellung eines Immunglobulin-Gen Reperotires (iR BCR Manual iRepertoire).....	70
<b>Abbildung 12:</b> Übersicht der verschiedenen Primer zur Generierung des Leichtkettengenrepertoires.....	70
<b>Abbildung 13:</b> IgLV Einzelzell-PCR mit Resultat: L5. ....	83
<b>Abbildung 14:</b> Amplifikate der Substitutions-PCR.....	84
<b>Abbildung 15:</b> Verschiedene Schritte bei der Konstruktion rlg exprimierender Baculoviren (Juliant et al., 2013).....	85
<b>Abbildung 16:</b> Polyacrylamid-Gel in Silberfärbung der aufgereinigten Antikörper aus viralem Sf9-Kulturüberstand (1) mit humanem Kontrollantikörper (2) (Cérutti und Golay, 2012) .....	86
<b>Abbildung 17:</b> IgG1 Bestimmung in viralen Insektenzellkulturüberständen. ....	86
<b>Abbildung 18:</b> HuProt Array-Färbung am Beispiel des Subarrays Nr. 5 von 24 verschiedenen Subarrays innerhalb des Gesamt-Arrays. ....	88
<b>Abbildung 19:</b> Produktive, klonale IgHV Gene aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien (n=231) von 15 GPA Patienten (dargestellt als 15 rote Vektorpunkte) unterscheiden sich von peripheren, produktiven, klonalen IgHV Genen aus 15 Gesunden (n=244353, dargestellt als 15 blaue Vektorpunkte). ....	91

<b>Abbildung 20:</b> Unterschiedliche IgHV Subfamilliengen – Frequenzen zwischen GPA und HC (Daten der Tabelle im Anhang) aufgelistet entsprechend ihrer genetischen Lokalisation (laut IMGT/V-QUEST & ENSEMBL; Ruiz et al 1999) auf der X-Achse.....	<b>93</b>
<b>Abbildung 21:</b> Unterschiedliche IgHJ Familliengen – Frequenz zwischen peripheren, klonalen, produktiven IGHV Genen (n=244353/15) gesunder Probanden und klonalen, produktiven IGHV Genen (n=231/15) aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA.....	<b>94</b>
<b>Abbildung 22:</b> Heatmaps mit Verteilungsmustern und Häufigkeiten (%) von IgHJ/IgHV Gen-Gen-Kombinationen (A) und von IgHD/IgHV Gen-Gen-Kombinationen (B) von peripheren, funktionellen, klonalen Sequenzen gesunder Probanden (n=244353/15) und von funktionellen, klonalen Sequenzen aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (231/15). .....	<b>95</b>
<b>Abbildung 23:</b> Verlängerte CDR3-Region in Aminosäuren mit und ohne Einschluss der IGHJ Region in klonalen, funktionellen IgHV Genen aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (n=231/15) im Vergleich zu peripheren, klonalen, funktionellen IgHV Genen aus gesunden Probanden (n=244353/15). .....	<b>96</b>
<b>Abbildung 24:</b> Transitions- und Transversionsmutationen (%) folgender Gruppen. ....	<b>97</b>
<b>Abbildung 25:</b> Nukleotidmutationen (%) folgender Gruppen.....	<b>98</b>
<b>Abbildung 26:</b> DNA Motive (sechs Nukleotidbasen um eine zentrale, definierte Punktmutation, Hot Spots): WAW, WTW, WRCH und DGYW in nicht-funktionellen (A, B) oder funktionellen (C, D) IgHV und IgLV Genen von Gesunden oder GPA Patienten. ....	<b>99</b>
<b>Abbildung 27:</b> DNA Motive von sieben Basen mit einer zentralen, definierten Punktmutation überprüft auf die Anwesenheit bekannter Hot Spots: WAW, WTW, WRCH und DGYW in funktionellen IgHV und IgLV Genen von Gesunden oder GPA Patienten.	<b>100</b>
<b>Abbildung 28:</b> DNA Motive von sieben Basen mit einer zentralen, definierten Punktmutation überprüft auf die Anwesenheit bekannter Hot Spots: WAW, WTW, WRCH und DGYW in funktionellen IgHV und IgLV Genen von Gesunden (n=244353) oder GPA Patienten (n=321) sortiert in drei Gruppen entsprechend Ihrer Herkunftszelle bei der GPA: G1 (Gewebe), G2 (CD20+ B-Zellen) und G3 (CD138+ B-Zellen). .....	<b>102</b>
<b>Abbildung 29:</b> Frequenz der Substitutionen funktioneller IgHV und IgLV Gene aus den folgenden Gruppen. ....	<b>104</b>
<b>Abbildung 30:</b> Selektionsstärke $\Sigma$ dargestellt als Wahrscheinlichkeitsfunktion in der CDR (rote Linie) und in der FWR (blaue Linie) funktioneller IgHV Gene (oben links) und IgLV Gene (unten rechts) aus entzündetem GPA Gewebe mit dem Baseline Algorithmus.....	<b>105</b>
<b>Abbildung 31:</b> Erhöhter Anteil produktiver IgLV-Gene des $\lambda$ -Typs und tendentiell erhöhter Anteil produktiver IgLV Genen mit einer anti-PR3-Ig vergleichbaren Rearrangierung im Gewebe im Vergleich zum Blut bei der GPA.....	<b>114</b>
<b>Abbildung 32:</b> relative mRNA Expressionen von Blimp1, IL-21, IL-21R und IL-17A in nasalen Schleimhautbiopsien von GPA Patienten (n=4 bzw. n=4) im Verhältnis zueinander.....	<b>115</b>
<b>Abbildung 33:</b> relative mRNA Transkription von Blimp1 in PBMC von 7 GPA Patienten im Vergleich zu 6 Gesunden.....	<b>116</b>

**Abbildung 34:** relative mRNA Transkription von IL-21 und IL-21R in PBL von GPA Patienten (IL-21 n=11; IL-21R n=9) im Vergleich zu Gesunden (IL-21 n=11; IL-21R n=10). .....116

**Abbildung 35:** Verteilungsunterschied zwischen nasalen Schleimhautbiopsien von GPA Patienten (n=5) und Crs Patienten (n=3) hinsichtlich der IL-21R Proteinexpression.....117

**Abbildung 36:** Immunfluoreszenzaufnahmen mit dem 100er Objektiv am EVOS Fluoreszenzmikroskop der IL21/IL-21R – Färbung. ....118

**Abbildung 37:** Immunfluoreszenzaufnahmen der Isotypenkontrollen mit dem 100er Objektiv der IL21/IL-21R – Färbung für GPA (V458-14) und CrS (CrS3925-08). ....118

### 8.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassung von Studien zur Assoziation von ANCA und anderen Autoantikörpern mit AAV wie GPA; bearbeitet aus (Lamprecht et al., 2018).....	<b>25</b>
<b>Tabelle 2:</b> Mastermix für Einzelzell PCR Runde 1.....	<b>42</b>
<b>Tabelle 3:</b> Zyklusbedingungen der Einzelzell PCR Runde 1.....	<b>42</b>
<b>Tabelle 4:</b> Mastermix für die IGHV 1 Einzelzell-PCR Runde 2.....	<b>43</b>
<b>Tabelle 5:</b> Mastermix für die IGHV2-6 Einzelzell-PCR Runde 2.....	<b>43</b>
<b>Tabelle 6:</b> Zyklusbedingungen der IGHV Einzelzell-PCR Runde 2.....	<b>44</b>
<b>Tabelle 7:</b> Mastermix für IGkV Einzelzell-PCR Runde 2.....	<b>44</b>
<b>Tabelle 8:</b> Mastermix für IGλV Einzelzell-PCR Runde 2.....	<b>44</b>
<b>Tabelle 9:</b> Programm Thermocycler für IGkV Einzelzell-PCR Runde2.....	<b>45</b>
<b>Tabelle 10:</b> Programm Thermocycler für IGλV Einzelzell-PCR Runde2.....	<b>45</b>
<b>Tabelle 11:</b> Einbau der Schnittstellen für Restriktionsenzyme.....	<b>48</b>
<b>Tabelle 12:</b> Restriktionsenzymverdau für die Klonierung der Schwereketten mit Afl II und Nhe I.....	<b>49</b>
<b>Tabelle 13:</b> RE-Verdau für die Klonierung der κ-Leichtkette mit Bss H II und Bsi W I.....	<b>49</b>
<b>Tabelle 14:</b> RE-Verdau für die Klonierung der λ-Leichtkette mit Avr II und Bss H II.....	<b>50</b>
<b>Tabelle 15:</b> Molare Verhältnisse an Insert und Vektor für die Ligation.....	<b>50</b>
<b>Tabelle 16:</b> Mastermix für Deletions-/Substitutions-PCR.....	<b>53</b>
<b>Tabelle 17:</b> Zyklusbedingungen für die Deletions-/Substitutions PCR.....	<b>53</b>
<b>Tabelle 18:</b> Annealingtemperatur für die Deletions-/Substitutions PCR einzelner Transfervektorkonstrukte.....	<b>53</b>
<b>Tabelle 19:</b> PCR-Reaktion zur Insertionskontrolle.....	<b>57</b>
<b>Tabelle 20:</b> Überblick der analysierten Datenkohorten; Zuordnung der Funktionalität nach IMGT/V-QUEST (Brochet et al., 2008a).....	<b>61</b>
<b>Tabelle 21:</b> Mastermix Murine Multiplex PCR IgHV.....	<b>67</b>
<b>Tabelle 22:</b> Mastermix Murine Multiplex PCR IgkV.....	<b>68</b>
<b>Tabelle 23:</b> Zyklusbedingungen für die Murine Multiplex PCR.....	<b>69</b>
<b>Tabelle 24:</b> Ein-Schritt RT PCR.....	<b>72</b>
<b>Tabelle 25:</b> Zyklusbedingungen der Ein-Schritt RT PCR.....	<b>72</b>
<b>Tabelle 26:</b> Multiplex PCR.....	<b>73</b>
<b>Tabelle 27:</b> Zyklusbedingungen der Multiplex PCR.....	<b>73</b>

<b>Tabelle 28:</b> Perfecta NGS qPCR.....	<b>73</b>
<b>Tabelle 29:</b> Zyklusbedingungen der Perfecta NGS qPCR.....	<b>73</b>
<b>Tabelle 30:</b> Zyklusbedingungen der qPCR.....	<b>80</b>
<b>Tabelle 31:</b> Protokoll für die IL-21/IL-21R Immunfluoreszenzfärbung.....	<b>81</b>
<b>Tabelle 32:</b> rIgG-Konzentration der Aufreinigung im großen Maßstab, durchgeführt vom Kooperationspartner.....	<b>87</b>
<b>Tabelle 33:</b> Mögliche Hauptinteraktionspartner der sechs gepoolten rIgGs mit einem z-Score > 3,75.....	<b>89</b>
<b>Tabelle 34:</b> P-Werte der quantifizierten Selektion in IgHV Genregionen (FWR, CDR) nach dem Baseline-Algorithmus.....	<b>106</b>
<b>Tabelle 35:</b> P-Werte der quantifizierten Selektion in IgLV Genregionen (FWR, CDR) nach dem Baseline-Algorithmus.....	<b>106</b>
<b>Tabelle 36:</b> Überblick absoluter (abs.) und relativer (rel.) Anteile nicht-klonalen IgHV Gene mit dem Erkennungsmuster für <i>S. aureus</i> (Graille et al., 2000) nach Kabat Nummerierung (Dunbar und Deane, 2016) verschiedener Gruppen.....	<b>107</b>
<b>Tabelle 37:</b> V(D)J Verwendung laut IMGT/V-Quest (Brochet et al., 2008) in IgHV und IgLV Genen von sieben Antikörpern, welche die humane PR3 erkennen.....	<b>108</b>
<b>Tabelle 38:</b> Abgeleitete Aminosäure-Sequenz der CDR3 in IgHV und IgLV Genen muriner (WGM1, WGM2, WGM3) und humaner monoklonaler Antikörper (hAK), welche die hPR3 erkennen (Davis et al., 1998; Finnern et al., 1995; Sibilica et al., 1997; Voswinkel et al., 2008c) und humaner anti-Ro60 IgG (Wang et al., 2016).....	<b>109</b>
<b>Tabelle 39:</b> Abgeleitete Aminosäure-Sequenz der FWR in IgHV und IgLV Genen muriner (WGM1, WGM2, WGM3) und humaner monoklonaler Antikörper (mAK), welche die hPR3 erkennen (Davis et al., 1998; Finnern et al., 1995; Sibilica et al., 1997; Voswinkel et al., 2008c) und humaner anti-Ro60 IgG (Wang et al., 2016).....	<b>110</b>
<b>Tabelle 40:</b> Absolute Anzahl an Gensequenzen (n) des IgLV Repertoires (IMGT/highV-Quest) in korrespondierenden Proben von Gewebe (n=5) und Blut (n=4) bei der GPA. .	<b>112</b>
<b>Tabelle 41:</b> Relative Anteile verschiedener Merkmale des IgLV Repertoires in korrespondierenden Proben von Gewebe und Blut bei der GPA (absolute Zahlen in Klammern).....	<b>113</b>

## 8.4 Literaturverzeichnis

Abdulahad, W.H., Lepse, N., Stegeman, C. a, Huitema, M.G., Doornbos-van der Meer, B., Tadema, H., Rutgers, A., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G.M., and Heeringa, P. (2013). Increased frequency of circulating IL-21 producing Th-cells in patients with granulomatosis with polyangiitis (GPA). *Arthritis Res. Ther.* 15, R70.

Abraham, R.S., Manske, M.K., Zuckerman, N.S., Sohni, A., Edelman, H., Shahaf, G., Timm, M.M., Dispenzieri, A., Gertz, M.A., and Mehr, R. (2007). Novel analysis of clonal diversification in blood B cell and bone marrow plasma cell clones in immunoglobulin light chain amyloidosis. *J. Clin. Immunol.* 27, 69–87.

Agmon-Levin, N., Dagan, A., Peri, Y., Anaya, J.-M., Selmi, C., Tincani, A., Bizzaro, N., Stojanovich, L., Damoiseaux, J., Tervaert, J.W.C., et al. (2017). The interaction between anti-Ro / SSA and anti-La / SSB autoantibodies and anti-infectious antibodies in a wide spectrum of auto-immune diseases : another angle of the autoimmune mosaic. *Clin. Exp. Rheumatol.* 35, 929–935.

Alamyar, E., Giudicelli, V., Li, S., Duroux, P., and Lefranc, M.P. (2012). IMGT/HighV-quest: The IMGT® web portal for immunoglobulin (IG) or antibody and T cell receptor (TR) analysis from NGS high throughput and deep sequencing. *Immunome Res.* 8, 1–15.

Anderson, M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46.

Avrameas, S. (2016). Autopolyreactivity Confers a Holistic Role in the Immune System. *Scand. J. Immunol.* 83, 227–234.

Baggiolini, M., Bretz, U., Dewald, B., and Feigenson, M.E. (1978). The Polymorphonuclear Leukocyte. *Agents Actions* 8, 3–4.

Bandyopadhyay, S., and Saha, S. (2013). *Unsupervised Classification: Similarity Measures, Classical and Metaheuristic Approaches, and Applications* (Springer Verlag).

Banerjee, A., Dhillon, I., Ghosh, J., and Sra, S. (2005). Clustering on the unit hypersphere using von Mises-Fisher distributions. *J. Mach. Learn. Res.* 6, 1345–1382.

Barak, M., Zuckerman, N.S., Edelman, H., Unger, R., and Mehr, R. (2008). IgTree: Creating Immunoglobulin variable region gene lineage trees. *J. Immunol. Methods* 338, 67–74.

Barbas, C.T., Burton, D.R., Scott, J.K., and Silverman, G.J. (2001). *Phage Display: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109, 45–55.
- Bautz, D.J., Preston, G.A., Lionaki, S., Hewins, P., Wolberg, A.S., Yang, J.J., Hogan, S.L., Chin, H., Moll, S., Jennette, J.C., et al. (2008). Antibodies with dual reactivity to plasminogen and complementary PR3 in PR3-ANCA vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 2421–2429.
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Helen, R., et al. (2009). Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* 456, 53–59.
- Berden, A., Goçeroglu, A., Jayne, D., Luqmani, R., Rasmussen, N., Bruijn, J.A., and Bajema, I. (2012). Diagnosis and management of ANCA associated vasculitis. *BMJ* 344, 1–10.
- Berden, A.E., Nolan, S.L., Morris, H.L., Bertina, R.M., Erasmus, D.D., Hagen, E.C., Hayes, D.P., van Tilburg, N.H., Bruijn, J.A., Savage, C.O.S., et al. (2010). Anti-Plasminogen Antibodies Compromise Fibrinolysis and Associate with Renal Histology in ANCA-Associated Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 2169–2179.
- Bischof, J., and Ibrahim, S.M. (2016). bcRep: R package for comprehensive analysis of B cell receptor repertoire data. *PLoS One* 11, 1–15.
- Biswas, P., Mantelli, B., Sica, A., Malnati, M., Panzeri, C., Sacconi, A., Hasson, H., Vecchi, A., Saniabadi, A., Lusso, P., et al. (2003). Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood* 101, 4452–4456.
- Bolotin, D.A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I.Z., Putintseva, E. V., and Chudakov, D.M. (2015). MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* 12, 380–381.
- Bombardieri, M., Lewis, M., and Pitzalis, C. (2017). Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases. *Nat. Publ. Gr.* 13, 141–154.
- Bossuyt, X., Cohen Tervaert, J.W., Arimura, Y., Blockmans, D., Flores-Suárez, L.F., Guillevin, L., Hellmich, B., Jayne, D., Jennette, J.C., Kallenberg, C.G.M., et al. (2017). Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 13, 683–692.
- Boursier, L., Dunn-Walters, D.K., and Spencer, J. (1999). Characteristics of IgV(H) genes used by human intestinal plasma cells from childhood. *Immunology* 97, 558–564.

- Braun, M.G., Csernok, Elena, Rögener-Schwarz, W., Ludwig, W.-D., Müller-Hermelink, H.-K., Gross, Wolfgang L, and Feller, A.C. (1996). Monoclonal Antibody Wgm 1 Directed Against Proteinase 3 : an Immunohistochemical Marker for Naphtol Asd Chloroacetate. *Hematol Oncol* 14, 83–90.
- Brezinschek, H.P., Brezinschek, R.I., and Lipsky, P.E. (1995). Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J. Immunol.* 155, 190–202.
- Briney, B.S., and Crowe, J.E. (2013). Secondary mechanisms of diversification in the human antibody repertoire. *Front. Immunol.* 4, 1–7.
- Brochet, X., Lefranc, M.P., and Giudicelli, V. (2008). IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 36, 503–508.
- Brouwer, E., Tervaert, J.W., Horst, G., Huitema, M.G., van der Giessen, M., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (1991). Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 83, 379–386.
- Brown, M., and Faulkner, P. (1977). A plaque assay for nuclear polyhedrosis virus using a solid overlay. *J. Gen. Virol.* 36, 361–364.
- Burbelo, P.D., Teos, L.Y., Herche, J.L., Iadarola, M.J., and Alevizos, I. (2018). Autoantibodies against the Immunoglobulin-Binding Region of Ro52 Link its Autoantigenicity with Pathogen Neutralization. *Nat. Sci. Reports* 8, 1–12.
- Capizzi, S.A., Viss, M.A., Hummel, A.M., Fass, D.N., and Specks, U. (2003). Effects of carboxy-terminal modifications of proteinase 3 (PR3) on the recognition by PR3-ANCA. *Kidney Int.* 63, 756–760.
- Casciola-Rosen, L., Nagaraju, K., Plotz, P., Wang, K., Levine, S., Gabrielson, E., Corse, A., and Rosen, A. (2005). Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J. Exp. Med.* 201, 591–601.
- Cattoretti, G. (1994). EDITOR ' S NOTE : and Reproducibility Diagnostk immunohistochemistry in. *Hum. Pathol.* 25, 1107–1109.
- Cérutti, M., and Golay, J. (2012). Lepidopteran cells: An alternative for the production of recombinant antibodies? *MAbs* 4, 294–309.
- Chang, B., and Casali, P. (1994). The CDR1 sequences of a major proportion of human

germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 15, 367–373.

Chang, L., Binos, S., and Savage, J. (1995). Epitope mapping of anti-proteinase 3 and anti-myeloperoxidase antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 112–119.

Chen, Z.J., Wheeler, C.J., Shi, W., Wu, A.J., Yarboro, C.H., and Notkins, A.L. (1998). Polyreactive antigen-binding B cells are the predominant cell type in the newborn B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 989–994.

Cho, M. La, Chen, P.P., Seo, Y. II, Hwang, S.Y., Kim, W.U., Min, D.J., Park, S.H., and Cho, C.S. (2003). Association of homozygous deletion of the Humhv3005 and the VH3-30.3 genes with renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 12, 400–405.

Cho, M.J., Lo, A.S.Y., Mao, X., Nagler, A.R., Christoph, T., Mukherjee, E.M., Hammers, C.M., Choi, E., Preetly, M., Uduman, M., et al. (2014). Shared VH1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients. *Nat Commun* 5, 1–23.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.

Chu, V.T., and Berek, C. (2013). The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol. Rev.* 251, 177–188.

Clain, J.M., Hummel, A.M., Stone, J.H., Fervenza, F.C., Hoffman, G.S., Kallenberg, C.G.M., Langford, C.A., McCune, W.J., Merkel, P.A., Monach, P.A., et al. (2017). Immunoglobulin (Ig)M antibodies to proteinase 3 in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Clin. Exp. Immunol.* 188, 174–181.

Cornec, D., Gall, E.C.-L., Fervenza, F.C., and Specks, U. (2016). ANCA-associated vasculitis — clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 570–579.

Cornec, D., Berti, A., Hummel, A., Peikert, T., Pers, J.-O., and Specks, U. (2017). Identification and phenotyping of circulating autoreactive proteinase 3-specific B cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis and healthy controls. *J. Autoimmun.* 1–10.

Csernok, E., and Moosig, F. (2014). Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 494–501.

Csernok, E., Lüdemann, J., Gross, W., and Bainton, D.F. (1990). Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in

Wegener's granulomatosis. *Am. J. Pathol.* 137, 1–4.

Csernok, E., Lamprecht, P., and Gross, W.L. (2006). Diagnostic significance of ANCA in vasculitis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2, 174–175.

Cui, Z., Zhao, M., Segelmark, M., and Hellmark, T. (2010). Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3, and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney Int.* 78, 590–597.

Davis, J. a, Peen, E., Williams, R.C., Perkins, S., Malone, C.C., McCormack, W.T., Csernok, E., Gross, W.L., Kolaskar, a S., and Kulkarni-Kale, U. (1998). Determination of primary amino acid sequence and unique three-dimensional structure of WGH1, a monoclonal human IgM antibody with anti-PR3 specificity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 89, 35–43.

Dumoitier, N., Terrier, B., London, J., Lofek, S., and Mouthon, L. (2015). Implication of B lymphocytes in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun. Rev.* 14, 996–1004.

Dunbar, J., and Deane, C.M. (2016). ANARCI: Antigen receptor numbering and receptor classification. *Bioinformatics* 32, 298–300.

Elkon, K., and Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 491–498.

Exley, A.R., Bacon, P.A., Luqmani, R.A., Kitas, G.D., Gordon, C., Savage, C.O.S., and Adu, D. (1997). Development and initial validation of the vasculitis damage index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum.* 40, 371–380.

Fährnich, A., Krebbel, M., Decker, N., Leucker, M., Lange, F.D., Kalies, K., and Möller, S. (2017). ClonoCalc and ClonoPlot: immune repertoire analysis from raw files to publication figures with graphical user interface. *BMC Bioinformatics* 18, 164.

Fay, M.P., and Shaw, P.A. (2010). Exact and Asymptotic Weighted Logrank Tests for Interval Censored Data: The interval R Package. *J. Stat. Softw.* 36.

Ferraro, A.J., Smith, S.W., Neil, D., and Savage, C.O.S. (2008). Relapsed Wegener's granulomatosis after rituximab therapy - B cells are present in new pathological lesions despite persistent "depletion" of peripheral blood. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 3030–3032.

Finnern, R., Bye, J.M., Dolman, K.M., Zhao, M.H., Short, a, Marks, J.D., Lockwood, M.C.,

and Ouwehand, W.H. (1995). Molecular characteristics of anti-self antibody fragments against neutrophil cytoplasmic antigens from human V gene phage display libraries. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 566–574.

Fiorentino, D.F., Presby, M., Baer, A.N., Petri, M., Rieger, K.E., Soloski, M., Rosen, A., Mammen, A.L., Christopher-Stine, L., and Casciola-Rosen, L. (2016). PUF60: a prominent new target of the autoimmune response in dermatomyositis and Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 75, 1145–1151.

Fisher, R.A. (1935). *The Design of Experiments*. (Edinburgh: Oliver and Boyd).

Frenzel, A., Hust, M., and Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* 4, 1–20.

Gehring, U.W., and Weins, C. (2009). *Grundkurs Statistik für Politologen und Soziologen* (VS Verlag für Sozialwissenschaften).

van der Geld, Y.M., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (1999). Characterization of monoclonal antibodies to proteinase 3 (PR3) as candidate tools for epitope mapping of human anti-PR3 autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 118, 487–496.

van der Geld, Y.M., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2001). Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. *J. Leukoc. Biol.* 69, 177–190.

van der Geld, Y.M., Tool, A.T.J., Videler, J., de Haas, M., Tervaert, J.W.C., Stegeman, C.A., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G.M., and Roos, D. (2002). Interference of PR3-ANCA with the enzymatic activity of PR3: differences in patients during active disease or remission of Wegener's granulomatosis. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 562–570.

van der Geld, Y.M., Stegeman, C.A., and Kallenberg, C.G.M. (2004). B cell epitope specificity in ANCA-associated vasculitis: Does it matter? *Clin. Exp. Immunol.* 137, 451–459.

Giesecke, C., Frolich, D., Reiter, K., Mei, H.E., Wirries, I., Kuhly, R., Killig, M., Glatzer, T., Stolzel, K., Perka, C., et al. (2014). Tissue Distribution and Dependence of Responsiveness of Human Antigen-Specific Memory B Cells. *J. Immunol.* 192, 3091–3100.

Giudicelli, V., Duroux, P., Lavoie, A., Aouinti, S., Lefranc, M.-P., and Kossida, S. (2015). From IMGT-ONTOLOGY to IMGT / HighV- QUEST for NGS Immunoglobulin ( IG ) and T cell Receptor ( TR ) Repertoires in Autoimmune and Infectious Diseases *Sci Forschen Autoimmune and Infectious Diseases : Open Access QUEST for NGS Immunoglobulin (*

IG ) Autoimmu. Autoimmun Infec Dis.

Glasner, C., De Goffau, M.C., Van Timmeren, M.M., Schulze, M.L., Jansen, B., Tavakol, M., Van Wamel, W.J.B., Stegeman, C.A., Kallenberg, C.G.M., Arends, J.P., et al. (2017). Genetic loci of *Staphylococcus aureus* associated with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitides. *Sci. Rep.* 7, 1–9.

Gorenshteyn, D., Zaslavsky, E., Fribourg, M., Park, C.Y., Wong, A.K., Tadych, A., Hartmannz, B.M., Albrecht, R.A., Garcia-Sastre, A., Kleinstein, S.H., et al. (2015). Interactive Big Data Resource to Elucidate Human Immune Pathways and Diseases. *Immunity* 43, 605–614.

Graille, M., Stura, E. a, Corper, a L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B., and Silverman, G.J. (2000). Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5399–5404.

Greiff, V., Miho, E., Menzel, U., and Reddy, S.T. (2015). Bioinformatic and Statistical Analysis of Adaptive Immune Repertoires. *Trends Immunol.* 36, 738–749.

Greiff, V., Menzel, U., Miho, E., Weber, C., Riedel, R., Cook, S., Valai, A., Lopes, T., Radbruch, A., Winkler, T.H., et al. (2017). Systems Analysis Reveals High Genetic and Antigen-Driven Predetermination of Antibody Repertoires throughout B Cell Development. *Cell Rep.* 19, 1467–1478.

Gupta, N.T., Vander Heiden, J.A., Uduman, M., Gadala-Maria, D., Yaari, G., and Kleinstein, S.H. (2015). Change-O: A toolkit for analyzing large-scale B cell immunoglobulin repertoire sequencing data. *Bioinformatics* 31, 3356–3358.

Hammers, C.M., and Stanley, J.R. (2014). Antibody Phage Display: Technique and Applications Christoph. *J Invest Dermatol.* 134, 1–13.

Hammers, C.M., Chen, J., Lin, C., Kacir, S., Siegel, D.L., Payne, A.S., and Stanley, J.R. (2015). Persistence of anti-desmoglein 3 IgG + B-cell clones in pemphigus patients over years. *J. Invest. Dermatol.* 135, 742–749.

Han, J. (2011). Amplicon Rescue Multiplex Polymerase Chain Reaction for Amplification of Multiple Targets (US).

Haslin, C., Leveque, M., Ozil, A., Cerutti, P., Chardes, T., Chermann, J.C., and Duonor-Cerutti, M. (2007). A recombinant human monoclonal anti-R7V antibody as a potential

therapy for HIV infected patients in failure of HAART. *Hum Antibodies* 16, 73–85.

Vander Heiden, J.A., Yaari, G., Uduman, M., Stern, J.N.H., O’connor, K.C., Hafler, D.A., Vigneault, F., and Kleinstein, S.H. (2014). PRESTO: A toolkit for processing high-throughput sequencing raw reads of lymphocyte receptor repertoires. *Bioinformatics* 30, 1930–1932.

Hellmich, B., Flossmann, O., Gross, W.L., Bacon, P., Cohen-Tervaert, J.W., Guillevin, L., Jayne, D., Mahr, A., Merkel, P.A., Raspe, H., et al. (2007). EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: Focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 605–617.

Hiepe, F., Dörner, T., Hauser, A.E., Hoyer, B.F., Mei, H., and Radbruch, A. (2011). Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 170–178.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11, 1026–1030.

Holl-Ulrich, K. (2009). Histopathologie systemischer Vaskulitiden. *Pathologe* 31, 67–76.

Ichiyoshi, Y., and Casali, P. (1994). Analysis of the Structural Correlates for Antibody Polyreactivity by Multiple Reassortments of Chimeric Human Immunoglobulin Heavy and Light Chain V Segments. *J. Exp. Med.* 180, 885–895.

Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2010). The rise and fall of horror autotoxicus and forbidden clones. *Kidney Int.* 78, 533–535.

Jennette, J.C., Falk, R.J., Bacon, P.A., Basu, N., Cid, M.C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L.F., Gross, W.L., Guillevin, L., Hagen, E.C., et al. (2013). 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 65, 1–11.

Jennette, J.C., Falk, R.J., and Gasim, A.H. (2014). Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 20, 263–270.

Joseph, C.G., Darrah, E., Shah, A.A., Skora, A.D., Livia, A., Wigley, F.M., Boin, F., Fava, A., Thoburn, C., Kinde, I., et al. (2014). Association of the Autoimmune Disease Scleroderma with an Immunologic Response to Cancer. *Science* (80-. ). 343, 152–157.

Juliant, S., Lévêque, M., Cérutti, P., Ozil, A., Choblet, S., Violet, M.L., Slomianny, M.C., Harduin-Lepers, A., and Cérutti, M. (2013). Engineering the baculovirus genome to produce galactosylated antibodies in lepidopteran cells. *Methods Mol. Biol.* 988, 59–77.

- Kain, R., Tadema, H., McKinney, E.F., Benharkou, A., Brandes, R., Peschel, A., Hubert, V., Feenstra, T., Sengolge, G., Stegeman, C., et al. (2012). High Prevalence of Autoantibodies to hLAMP-2 in Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 556–566.
- Kelley, J.M., Monach, P. a, Ji, C., Zhou, Y., Wu, J., Tanaka, S., Mahr, A.D., Johnson, S., McAlear, C., Cuthbertson, D., et al. (2011). IgA and IgG antineutrophil cytoplasmic antibody engagement of Fc receptor genetic variants influences granulomatosis with polyangiitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20736–20741.
- Kobayashi, S., Hoshino, T., Hiwasa, T., Satoh, M., Rahmutulla, B., Tsuchida, S., Komukai, Y., Tanaka, T., Matsubara, H., Shimada, H., et al. (2016). Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. *Oncotarget* 7, 82493–82503.
- Korkmaz, B., Lesner, A., Guarino, C., Wysocka, M., Kellenberger, C., Watier, H., Specks, U., Gauthier, F., and Jenne, D.E. (2016). Inhibitors and Antibody Fragments as Potential Anti-Inflammatory Therapeutics Targeting Neutrophil Proteinase 3 in Human Disease. *Pharmacol Rev* 68, 603–630.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448, 484–487.
- Kuhl, A., Korkmaz, B., Utecht, B., Kniepert, A., Schönermarck, U., Specks, U., and Jenne, D.E. (2010). Mapping of conformational epitopes on human proteinase 3, the autoantigen of Wegener's granulomatosis. *J. Immunol.* 185, 387–399.
- Küppers, R. (2004). Molecular Single-Cell PCR Analysis of Rearranged Immunoglobulin Genes As a Tool to Determine the Clonal Composition of Normal and Malignant Human B Cells. *Methods Mol. Biol.* 271, 225–238.
- Kwakkenbos, M.J., Diehl, S.A., Yasuda, E., Bakker, A.Q., van Geelen, C.M.M., Lukens, M. V, van Bleek, G.M., Widjoatmodjo, M.N., Bogers, W.M.J.M., Mei, H., et al. (2010). Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat. Med.* 16, 123–128.
- Kwakkenbos, M.J., van Helden, P.M., Beaumont, T., and Spits, H. (2016). Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications. *Immunol. Rev.* 270, 65–77.
- Kwon, H., Thierry-mieg, D., Thierry-mieg, J., Kim, H., Tunyaplin, C., Carotta, S., Donovan, C.E., Matthew, L., Taylor, P., Ozato, K., et al. (2009). Analysis of Interleukin-21-Induced

Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors. *Immunity* 31, 941–952.

Lamprecht, P., Holle, J., and Gross, W. (2009). Update on Clinical, Pathophysiological and Therapeutic Aspects in ANCA-Associated Vasculitides. *Curr. Drug Discov. Technol.* 6, 241–251.

Lamprecht, P., Kerstein, A., Klapa, S., Schinke, S., Karsten, C.M., Yu, X., Ehlers, M., Epplen, J.T., Holl-Ulrich, K., Wiech, T., et al. (2018). Pathogenetic and Clinical Aspects of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitides. *Front. Immunol.* 9, 1–10.

Lefranc, M.P. (2001a). Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (IGH) Genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 18, 100–116.

Lefranc, M.P. (2001b). Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 18, 161–174.

Lefranc, M.P. (2001c). Nomenclature of the human Lambda (IGL) immunoglobulin genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 18, 242–254.

Lefranc, M.P. (2011). IGMT information system. *Cold Spring Harb. Protoc.* 1–124.

Lepse, N., Abdulahad, W.H., Rutgers, A., Kallenberg, C.G.M., Stegeman, C.A., and Heeringa, P. (2014). Altered B cell balance, but unaffected B cell capacity to limit monocyte activation in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in remission. *Rheumatol. (United Kingdom)* 53, 1683–1692.

Lepse, N., Land, J., Rutgers, A., Kallenberg, C.G.M., Stegeman, C.A., Abdulahad, W.H., and Heeringa, P. (2016). Toll-like receptor 9 activation enhances B cell activating factor and interleukin-21 induced anti-proteinase 3 autoantibody production in vitro. *Rheumatology* 55, 162–172.

Li, K.-P., Fähnrich, A., Roy, E., Cuda, C.M., Grimes, L.H., Perlman, H.R., Kalies, K., and Hildeman, D.A. (2017). HHS Public Access. *J Immunol* 198, 257–269.

Li, S., Lefranc, M.P., Miles, J.J., Alamyar, E., Giudicelli, V., Duroux, P., Freeman, J.D., Corbin, V.D.A., Scheerlinck, J.P., Frohman, M.A., et al. (2013). IGMT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IGMT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat. Commun.* 4, 1–13.

Lieby, P., Soley, A., Levallois, H., Hugel, B., Freyssinet, J.M., Cerutti, M., Pasquali, J.L., and Martin, T. (2001). The clonal analysis of anticardiolipin antibodies in a single patient

with primary antiphospholipid syndrome reveals an extreme antibody heterogeneity. *Blood* 97, 3820–3828.

Liu, B.-S., Stoop, J.N., Huizinga, T.W., and Toes, R.E.M. (2013). IL-21 enhances the activity of the TLR-MyD88-STAT3 pathway but not the classical TLR-MyD88-NF- $\kappa$ B pathway in human B cells to boost antibody production. *J. Immunol.* 191, 4086–4094.

Luqmani, R.A., Bacon, P.A., Moots, R.J., Janssen, B.A., Pall, A., Emery, P., Savage, C., and Adu, D. (1994). Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 87, 671–678.

Lyons, P.A., Rayner, T.F., Trivedi, S., Holle, J.U., Watts, R.A., Jayne, D.R.W., Baslund, B., Brenchley, P., Bruchfeld, A., Chaudhry, A.N., et al. (2012). Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 367, 214–223.

Mannoor, K., Xu, Y., and Chen, C. (2013). Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* 46, 138–147.

Martin, V., Bryan Wu, Y.C., Kipling, D., and Dunn-Walters, D. (2015). Ageing of the B-cell repertoire. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 1–9.

Martins, G., and Calame, K. (2008). Regulation and Functions of Blimp-1 in T and B Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 133–169.

McLure, H.A., and Rubin, A.P. (2005). Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol* 71, 59–74.

Meng, W., Jayaraman, S., Zhang, B., Schwartz, G.W., Daber, R.D., Hershberg, U., Garfall, A.L., Carlson, C.S., and Luning Prak, E.T. (2014). Trials and tribulations with VH replacement. *Front. Immunol.* 5, 1–12.

Metzker, M.L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.* 15, 1767–1776.

Milton, J., Wu, X., Smith, M., Brennan, J., Barnes, C., Liu, X., and Ruediger, S. (2004). Modified Nucleotides (GB).

Mizutani, Y., Matsuoka, K., Takeda, H., Shiogama, K., Inada, K. ichi, Hayakawa, K., Yamada, H., Miyazaki, T., Sawasaki, T., Endo, Y., et al. (2013). Novel approach to identifying autoantibodies in rheumatoid synovitis with a biotinylated human autoantigen library and the enzyme-labeled antigen method. *J. Immunol. Methods* 387, 57–70.

Mueller, A., Brieske, C., Schinke, S., Csernok, E., Gross, W.L., Hasselbacher, K.,

Voswinkel, J., and Holl-Ulrich, K. (2014). Plasma cells within granulomatous inflammation display signs pointing to autoreactivity and destruction in granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res. Ther.* 16, R55.

Mulder, A.H.L., Stegeman, C.A., and Kallenberg, C.G.M. (1995). Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Wegener's granulomatosis: a predominant role for the IgG3 subclass of ANCA. *Clin. Exp. Immunol.* 101, 227–232.

Müller, A., Holl-Ulrich, K., and Gross, W.L. (2013). Granuloma in ANCA-associated vasculitides: another reason to distinguish between syndromes? *Curr. Rheumatol. Rep.* 15, 376.

Murphy, K. (2012). *Janeway's Immuno Biology* (Garland Science, Taylor & Francis Group).

Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 281–294.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–583.

Ohlei, O. (2016). *Analyse des Immunglobulingenrepertoires bei Granulomatose mit polyangiitis.* Universität zu Lübeck.

Olofsen, E., and Dahan, A. (2013). Using Akaike's information theoretic criterion in population analysis: a simulation study. *F1000Research* 1–16.

Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akillesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* 173, 5361–5371.

Pagnoux, C. (2016). Updates in ANCA-associated vasculitis. *Eur. J. Rheumatol.* 3, 122–133.

Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., et al. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63.

Peen, E., and Williams, R.C. (2000). What you should know about PR3-ANCA. Structural aspects of antibodies to proteinase 3 (PR3). *Arthritis Res.* 2, 255–259.

Pendergraft, W.F., Preston, G.A., Shah, R.R., Tropsha, A., Carter, C.W., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2004). Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat. Med.* 10, 72–79.

Peschel, A., Basu, N., Benharkou, A., Brandes, R., Brown, M., Dieckmann, R., Rees, A.J., and Kain, R. (2014). Autoantibodies to hLAMP-2 in ANCA-Negative Pauci-Immune Focal Necrotizing GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 455–463.

Poul, M.A., Cerutti, M., Chaabihi, H., Ticchioni, M., Deramoudt, F.X., Bernard, A., Devauchelle, G., Kaczorek, M., and Lefranc, M.P. (1995). Cassette baculovirus vectors for the production of chimeric, humanized, or human antibodies in insect cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2005–2009.

Preuss, K.D., Pfreundschuh, M., Ahlgrim, M., Fadle, N., Regitz, E., Murawski, N., and Grass, S. (2009). A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int. J. Cancer* 125, 656–661.

Prüßmann, J., Prüßmann, W., Recke, A., Rentzsch, K., Juhl, D., Henschler, R., Müller, S., Lamprecht, P., Schmidt, E., Csernok, E., et al. (2014). Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. *Exp. Dermatol.* 23, 509–528.

Racanelli, V., Prete, M., Musaraj, G., Dammacco, F., and Perosa, F. (2011). Autoimmunity Reviews Autoantibodies to intracellular antigens : Generation and pathogenetic role. *Autoimmun. Rev.* 10, 503–508.

Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 741–750.

Rao, N. V., Rao, G. V., Marshall, B.C., and Hoidal, J.R. (1996). Biosynthesis and Processing of Proteinase 3 in U937 Cells. *J. Biol. Chem.* 271, 2972–2978.

Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR* 21–34.

Recke, A., Bischof, J., Meng, W., Arolt, C., Baden, F., Zhang, B., Vollbrandt, T., Gläser, R., Manz, R., Zillikens, D., et al. (2016). Circulating plasmablasts exhibit increased antibody diversity in pemphigus vulgaris. *Pathog. Pemphigus Pemphigoid Meet. Abstr.* 26.

Reisinger, J., Waters, A., Silverthorn, B., and Mooney, R.J. (2010). Spherical Topic

Models. *Graph. Models* 42, 1–4.

Rieckmann, J.C., Geiger, R., Hornburg, D., Wolf, T., Kveler, K., Jarrossay, D., Sallusto, F., Shen-Orr, S.S., Lanzavecchia, A., Mann, M., et al. (2017). Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. *Nat. Immunol.* 18, 583–593.

Rodríguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., Bernal, J., Campos-Caro, A., and Brieva, J. a (2012). Cutting edge: IL-21 derived from human follicular helper T cells acts as a survival factor for secondary lymphoid organ, but not for bone marrow, plasma cells. *J. Immunol.* 188, 1578–1581.

Rogozin, I.B., and Diaz, M. (2004). Cutting Edge: DGYW/WRCH Is a Better Predictor of Mutability at G:C Bases in Ig Hypermutation Than the Widely Accepted RGYW/WRCY Motif and Probably Reflects a Two-Step Activation-Induced Cytidine Deaminase-Triggered Process. *J. Immunol.* 172, 3382–3384.

Roth, A.J., Brown, M.C., Smith, R.N., Badhwar, A.K., Parente, O., Chung, H. c., O'Dell, D., Bunch, McGregor, J.G., Hogan, S.L., et al. (2012). Anti-LAMP-2 Antibodies Are Not Prevalent in Patients With Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 545–555.

Russell, K.A., Fass, D.N., and Specks, U. (2001). Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with the pro form of proteinase 3 and disease activity in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum.* 44, 463–468.

Scapini, P., and Cassatella, M.A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 124, 710–720.

Scheel, T., Gursche, A., Zacher, J., and Berek, C. (2011). V-region gene analysis of locally defined synovial B and plasma cells reveals selected B cell expansion and accumulation of plasma cell clones in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 63–72.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.

Schrezenmeier, E., Jayne, D., and Dörner, T. (2018). Targeting B Cells and Plasma Cells in Glomerular Diseases: Translational Perspectives. *J Am Soc Nephrol* 29, 741–758.

Schwartz, R.S. (2003). Shattuck lecture: Diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *N. Engl. J. Med.* 348, 1017–1026.

Shang, W., Ning, Y., Xu, X., Li, M., Guo, S., Han, M., Zeng, R., Ge, S., and Xu, G. (2015). Incidence of cancer in ANCA-associated vasculitis: A meta-analysis of observational

studies. *PLoS One* 10, 1–11.

Shugay, M., Britanova, O. V., Merzlyak, E.M., Turchaninova, M.A., Mamedov, I.Z., Tuganbaev, T.R., Bolotin, D.A., Staroverov, D.B., Putintseva, E. V., Plevova, K., et al. (2014). Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat. Methods* 11, 653–655.

Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10104–10108.

Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269, 32678–32684.

Sibilia, J., Benlagha, K., Vanhille, P., Ronco, P., Brouet, J.C., and Mariette, X. (1997). Structural analysis of human antibodies to proteinase 3 from patients with Wegener granulomatosis. *J. Immunol.* 159, 712–719.

Silva, F., Hummel, A.M., Jenne, D.E., and Specks, U. (2010). Discrimination and variable impact of ANCA binding to different surface epitopes on proteinase 3, the Wegener's autoantigen. *J. Autoimmun.* 35, 299–308.

Simon, A., Subra, J.F., Guilpain, P., Jeannin, P., Pignon, P., Blanchard, S., Garo, E., Jaillon, S., Chevailler, A., Renier, G., et al. (2016). Detection of anti-pentraxin-3 autoantibodies in ANCA-associated vasculitis. *PLoS One* 11, 1–13.

Specks, U., Fass, D.N., Fautsch, M.P., Hummel, A.M., and Viss, M.A. (1996). Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA. *FEBS Lett.* 390, 265–270.

Spencer, J., and Dunn-Walters, D.K. (2005). Hypermutation at A-T Base Pairs: The A Nucleotide Replacement Spectrum Is Affected by Adjacent Nucleotides and There Is No Reverse Complementarity of Sequences Flanking Mutated A and T Nucleotides. *J. Immunol.* 175, 5170–5177.

Stoevesandt, O., Taussig, M.J., and He, M. (2009). Protein microarrays: High-throughput tools for proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 6, 145–157.

Strunz, H.P., Csernok, E., and Gross, W.L. (1997). Incidence and disease associations of a proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibody idiotype (5/7 Id) whose antidiotype inhibits proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibody antigen binding activity. *Arthritis Rheum.* 40, 135–142.

Sudhakar, J.N., and Chow, K.-C. (2014). Human RAD23 homolog A is required for the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor during induction of cell death. *Biol. Cell*

106, 359–376.

Tadema, H., Kallenberg, C.G.M., Stegeman, C.A., and Heeringa, P. (2011). Reactivity against complementary proteinase-3 is not increased in patients with PR3-ANCA-associated vasculitis. *PLoS One* 6, 1–5.

Takeda, Y., Nara, H., Araki, A., and Asao, H. (2014). Human Peripheral Neutrophils Express Functional IL-21 Receptors. *Inflammation* 37, 1521–1532.

Tecchio, C., Micheletti, A., and Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Front. Immunol.* 5, 1–7.

Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., Smyth, G.K., Kallies, A., Busslinger, M., and Nutt, S.L. (2016). Blimp-1 controls plasma cell function through regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response Europe PMC Funders Group. *Nat Immunol* 17, 323–330.

Thebault, S., Gilbert, D., Hubert, M., Drouot, L., Machour, N., Lange, C., Charlionet, R., and Tron, F. (2002). Orderly Pattern of Development of the Autoantibody Response in (New Zealand White x BXSB)F1 Lupus Mice: Characterization of Target Antigens and Antigen Spreading by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *J. Immunol.* 169, 4046–4053.

Turner, L., Müller, A., Cérutti, M., Martin, T., Pasquali, J.L., Gross, W.L., Preuss, K.D., Pfreundschuh, M., and Voswinkel, J. (2011). Wegener's granuloma harbors B lymphocytes with specificities against a proinflammatory transmembrane protein and a tetraspanin. *J. Autoimmun.* 36, 87–90.

Turner, L., Preuss, K.D., Fadle, N., Regitz, E., Klemm, P., Zaks, M., Kemele, M., Hasenfus, A., Csernok, E., Gross, W.L., et al. (2012). Progranulin antibodies in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 42, 29–38.

Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2007). Autoreactivity in Human IgG+ Memory B Cells. *Immunity* 26, 205–213.

Trikalinos, T.A., Trow, P., and Schmid, C.H. (2013). Simulation-Based Comparison of Methods for Meta-Analysis of Proportions and Rates. *Methods Res. Rep.* 13, 1–98.

Uduman, M., Yaari, G., Hershberg, U., Stern, J.A., Shlomchik, M.J., and Kleinstein, S.H. (2011). Detecting selection in immunoglobulin sequences. *Nucleic Acids Res.* 39, 499–504.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and

- Rozen, S.G. (2012). Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12.
- Vink, T., Oudshoorn-Dickmann, M., Roza, M., Reitsma, J.J., and de Jong, R.N. (2014). A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods* 65, 5–10.
- Vinuesa, C.G., Sanz, Í., and Cook, M.C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 845–857.
- Voswinkel, J., Mueller, A., Kraemer, J., Lamprecht, P., Herlyn, K., Holl-Ulrich, K., Feller, A.C., Pitann, S., Gause, A., and Gross, W.L. (2006). B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 859–864.
- Voswinkel, J., Assmann, G., Held, G., Pitann, S., Gross, W.L., Holl-Ulrich, K., Herlyn, K., and Mueller, A. (2008a). Single cell analysis of B lymphocytes from Wegener's granulomatosis: B cell receptors display affinity maturation within the granulomatous lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 154, 339–345.
- Voswinkel, J., Kerckdijk, A.J., Mueller, A., Assmann, G., Pfreundschuh, M., and Held, G. (2008c). A novel system to test for specificity of B-cell receptors from tissue of Wegener's granulomatosis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 26, 90–96.
- Wagner, S.D., Milstein, C., and Neuberger, M.S. (1995). Codon bias targets mutation. *Nature* 376, 732.
- Wang, J.J., Al Kindi, M.A., Colella, A.D., Dykes, L., Jackson, M.W., Chataway, T.K., Reed, J.H., and Gordon, T.P. (2016). IgV peptide mapping of native Ro60 autoantibody proteomes in primary Sjögren's syndrome reveals molecular markers of Ro/La diversification. *Clin. Immunol.* 173, 57–63.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* (80-). 301, 1374–1377.
- Wardemann, H., Hammersen, J., and Nussenzweig, M.C. (2004). Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains. *J. Exp. Med.* 200, 191–199.
- Watson, C.T., and Breden, F. (2012). The immunoglobulin heavy chain locus: Genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes Immun.* 13, 363–373.
- Watson, C.T., Steinberg, K.M., Huddleston, J., Warren, R.L., Malig, M., Schein, J.,

- Willsey, A.J., Joy, J.B., Scott, J.K., Graves, T.A., et al. (2013). Complete haplotype sequence of the human immunoglobulin heavy-chain variable, diversity, and joining genes and characterization of allelic and copy-number variation. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 530–546.
- Wilde, B., Thewissen, M., Damoiseaux, J., Hilhorst, M., van Paassen, P., Witzke, O., and Cohen Tervaert, J.W. (2012). Th17 expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): the role of disease activity, immune regulation and therapy. *Arthritis Res. Ther.* *14*, 1–10.
- Wilson, P.C., de Bouteiller, O., Liu, Y.J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D., and Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J. Exp. Med.* *187*, 59–70.
- Winkler, A.M., Ridgway, G.R., Webster, M.A., Smith, S.M., and Nichols, T.E. (2014). Permutation inference for the general linear model. *Neuroimage* *92*, 381–397.
- Winter, O., Mohr, E., and Manz, R.A. (2011). Alternative cell types form a Multi-Component-Plasma-Cell-Niche. *Immunol. Lett.* *141*, 145–146.
- Witko-Sarsat, V., Cramer, E.M., Hieblot, C., Guichard, J., Nusbaum, P., Lopez, S., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (1999). Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* *94*, 2487–2496.
- Yaari, G., and Kleinstein, S.H. (2015). Practical guidelines for B-cell receptor repertoire sequencing analysis. *Genome Med.* *7*, 121.
- Yaari, G., Uduman, M., and Kleinstein, S.H. (2012). Quantifying selection in high-throughput Immunoglobulin sequencing data sets. *Nucleic Acids Res.* *40*, e134.
- Yaari, G., Vander Heiden, J.A., Uduman, M., Gadala-Maria, D., Gupta, N., Joel, J.N., O'Connor, K.C., Hafler, D.A., Laserson, U., Vigneault, F., et al. (2013). Models of somatic hypermutation targeting and substitution based on synonymous mutations from high-throughput immunoglobulin sequencing data. *Front. Immunol.* *4*, 1–11.
- Ye, J., Ma, N., Madden, T.L., and Ostell, J.M. (2013). IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res.* *41*, 34–40.
- Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., et al. (2002). E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature.* *418*, 438–442.

Zhang, Y.-M., Yang, H.-B., Shi, J.-L., Chen, H., Shu, X.-M., Lu, X., Wang, G.-C., and Peng, Q.-L. (2018). The prevalence and clinical significance of anti-PUF60 antibodies in patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Clin. Rheumatol.*

Zhao, Y., Odell, E., Choong, L.M., Barone, F., Fields, P., Wilkins, B., Tungekar, F.M., Patel, P., Sanderson, J.D., Sangle, S., et al. (2012). Granulomatosis with polyangiitis involves sustained mucosal inflammation that is rich in b-cell survival factors and autoantigen. *Rheumatology* 51, 1580–1586.

Zinkernagel, R. (2014). On plasma cell longevity or brevity. *Expert Rev. Vaccines* 13, 821–823.

Zuckerman, N.S., Hazanov, H., Barak, M., Edelman, H., Hess, S., Shcolnik, H., Dunn-Walters, D., and Mehr, R. (2010). Somatic hypermutation and antigen-driven selection of B cells are altered in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 35, 325–335.

## 9 Anhang

Art der Mutationsfrequenz	Gen	Gruppenvergleich	$\chi^2=A$	$P(\chi^2>A)$	Odds Ratio	adjustierter Kontingenzkoeffizient	Pearsons $\chi^2$ Test mit Signifikanzniveau von 5 %
Transversion	produktive IgHV	GPA vs HC Blut	0,157	0,692	1,013	0,000	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,221	0,638	1,042	0,010	
	unproduktive IgHV	GPA vs HC Blut	3,443	0,064	1,240	0,001	
		GPA vs HC Darmmukosa	1,911	0,167	1,648	0,107	
	produktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,754	0,385	1,155	0,026	
	unproduktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,000	1,000	1,755	0,033	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$
Punktmutation „A“	produktive IgHV	GPA vs HC Blut	4,720	0,030 (*)	0,919	0,001	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,012	0,913	1,011	0,002	
	unproduktive IgHV	GPA vs HC Blut	0,007	0,936	1,011	0,000	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,000	1,000	0,972	0,005	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$
	produktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,177	0,674	0,918	0,012	
	unproduktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,088	0,767	0,000	0,069	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$ ; ein absoluter Wert = 0 !!!
Punktmutation „T“	produktive IgHV	GPA vs HC Blut	2,205	0,138	1,058	0,001	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,003	0,957	0,995	0,001	
	unproduktive IgHV	GPA vs HC Blut	0,525	0,469	1,099	0,000	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,283	0,595	0,814	0,041	
	produktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	4,359	0,037 (*)	1,445	0,060	
	unproduktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	5,766	0,016 (*)	$\infty$	0,215	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$ ; ein absoluter Wert = 0 !!!
Punktmutation „C“	produktive IgHV	GPA vs HC Blut	1,169	0,280	1,041	0,001	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,670	0,413	1,085	0,018	
	unproduktive IgHV	GPA vs HC Blut	3,702	0,054	0,755	0,001	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,422	0,516	0,698	0,068	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$
	produktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	2,531	0,112	0,724	0,046	
	unproduktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,206	0,650	0,000	0,077	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$ ; ein absoluter Wert = 0 !!!
Punktmutation „G“	produktive IgHV	GPA vs HC Blut	0,159	0,690	0,985	0,000	
		GPA vs HC Darmmukosa	0,775	0,379	0,917	0,019	

Art der Mutationsfrequenz	Gen	Gruppenvergleich	$\chi^2=A$	$P(\chi^2>A)$	Odds Ratio	adjustierter Kontingenzkoeffizient	Pearsons $\chi^2$ Test mit Signifikanzniveau von 5 %
	unproduktive IgHV	GPA vs HC Blut	1,187	0,276	1,150	0,001	
		GPA vs HC Darmmukosa	1,418	0,234	1,897	0,108	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$
	produktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,008	0,931	0,984	0,003	
	unproduktive IgLV	GPA vs HC Blut&Knochenmark	0,077	0,781	0,000	0,068	mit Korrektur nach Yates bei $n \leq 10$ ; ein absoluter Wert = 0 !!!

Leichtkette	
GPA Gewebs-abgeleitete Sequenzen	CDR3
AJ551004	AKDQAHAAFAY
AJ551006	AKDIQGIWGRTPTDY
AM050999	ARGLGPTIFGVGEDYMDV
JN557810	ASGGFRDSDAFDV
JN990790	ARGGKGYRAFDV
JQ693385	ARVSPSLTPIVVVLSAFDV
MF616000	TKDPTDYWSAYKYYFDY
AJ551030	ATYNDFWSPYFDS

Schwerkette	
$\alpha$ PR3mAbs	CDR3
<b>WGM1</b>	ARSGGYPPYTM <sup>D</sup> Y
JN557810	ASGGFRDSDAFDV
<b>WGM2</b>	APFYYYGSPA <sup>A</sup> WFAY
AJ551004	AKDQAHA <sup>A</sup> AFAY
<b>WGM3</b>	ARRETSLLG
JQ693385	ARVSPSLTPIVVVLSAFDV
<b>WGH1</b>	AKSQMSYY <sup>D</sup> FW <sup>S</sup> GY <sup>R</sup> RDQ <sup>Y</sup> YFDY
MF616000	TKDPT <sup>D</sup> Y <sup>S</sup> AY <sup>K</sup> YYFDY
AJ551030	ATYN <sup>D</sup> FW <sup>S</sup> PYFDS
<b>WG2</b>	ARGEIDFWSGYFREGLVGPVGT <sup>D</sup> Y
JN990790	ARGGKGYRA <sup>D</sup> FDV
<b>WG3</b>	ARGIFEGSGYYAL <sup>D</sup> D
AM050999	ARGLGPTIFGVGEDY <sup>M</sup> DV
<b>WG4</b>	AKSRGTSCYMSC <sup>D</sup> C
AJ551006	AKDIQGIWGRTP <sup>D</sup> Y
<b>PR3 M2</b>	ARGRSWQSSAY <sup>M</sup> DV

--	--

Logit Transformierte Werte ( $\log(\frac{p}{1-p})$ ) relativer Anteile p verschiedener Merkmale des IgLV Repertoirs; die letzte Spalte umfasst mit anti-PR3 IG vergleichbare Rearrangierungen (Tab. 37, Seite 108) zuzüglich gleich wahrscheinlich kombinierter J<sub>L</sub> Gensegmente in anti-PR3 Ig laut IMGT/V-QUEST

		produktive IgκV [%]	produktive IGλV [%]	mit anti-PR3 Ig vergleichbare VJ-Rearrangierung der produktiven IgLV [%]
GPA Gewebe	G1	0,85	-0,85	-1,02
	G2	0,97	-0,97	-1,35
	G3	1,39	-1,39	-0,80
	G4	0,78	-0,78	-1,24
	G5	0,96	-0,96	-1,75
GPA Blut	B1	1,51	-1,51	-1,44
	B2	1,38	-1,38	-1,38
	B3	1,67	-1,67	-1,22
	B5	1,78	-1,78	-1,91

H6 Konstrukt (aus CD20<sup>+</sup> B-Zelle GPA-Nierengewebe)

IGHV5-10-1\*01\_IGHJ4\*01(FR1-FR4)

CTTAAGGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAAGTCAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAGGATCTCCTGTAA  
GGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGAGGATT  
GATCCTAGTGAGTCTTATGTCAACTACAGCCCGTCTTCCAAGGCCACGTACCATCTCAGCTGACAAGTCCATTAGCACTGCCTACC  
TGCACTGGAGCAGCCTGAAGGCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTTGGAGGTGGCTACGATTTTCTGGGACTCCT  
GGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCAAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTG

Signalpeptidsequenz

Plasmidsequenz

AflII

NheI

L6 Konstrukt (aus CD20<sup>+</sup> B-Zelle GPA-Nierengewebe)

IGKV6-21\*01\_IGKJ4\*01(FR1-FR4)

GCGCGCTGTGAAATTGTGCTGACTCAACTTTCCCCTTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGCCGGCCAGTC  
AGAGCATTGGTAGTGCCTTACACTGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCTTCTC  
AGGGGTCCTCGAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCTCACCATCAATGGCCTGGAAGCTGAAGATGCTGCAA  
CGTATTACTGTCATCAGAGTAGTATTTACCTCCCACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACTGTACGGTGGCTGCACCAT  
CTGTCTTCATCTTCCCAGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT

Signalpeptidsequenz

Plasmidsequenz

BssHII

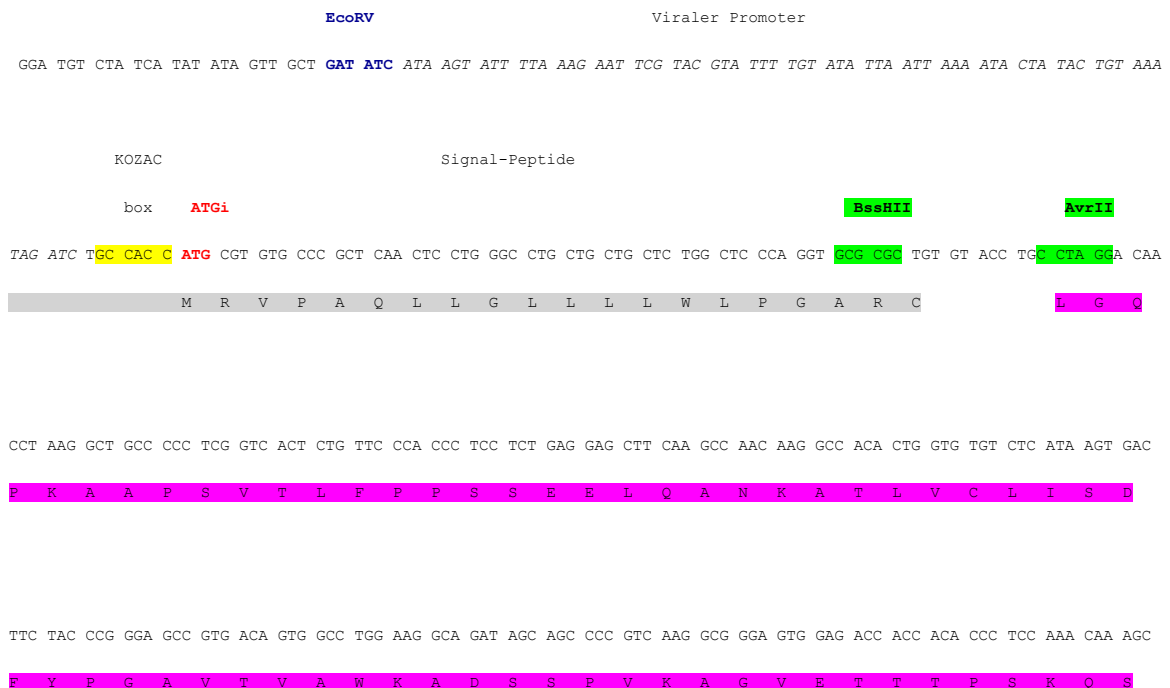
BsiWI

*Lambda Isotyp (Beispiel für Transfervektor; Referenz: Dr. Martine Cérutti)*

Rekombinations-Stelle: Polyhedrin Locus

Plasmid Name: pVTCλ PrPHA Klon 3 (11/07/2007)

Klonierungs-Stelle: VL Domäne muss zwischen BssHII-AvrII Stellen (einzigartig) inseriert werden



Humanes konstantes lambda

AAC AAC AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAC CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG TGG AAG TCC CAC AAA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT GAA

N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H K S Y S C Q V T H E

GGG AGC ACC GTG GAG AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TAA GGA TCT GTG GCC CAA CAC GCT CTG CGT TGC GAC CCC CTA TGT ACC

G S T V E K T V A P T E C S G S V A Q H A L R C D P L C T

Überblick der Substitutionen in der CDR3 Region mit einer Frequenz  $\geq 5\%$ ; ausgezählt aus Abb. 29 sind die absoluten Anzahlen vorkommender Substitutionsvarianten (z. B P→R als eine Version)

Substitutionen in der CDR3 Region	IgHV	IgLV
Frequenz $\geq 5\%$ in HC	10	22
Frequenz $\geq 5\%$ in GPA	8	15
Überschneidung zwischen HC & GPA	7	4
Erhöhte Frequenz $\geq 5\%$ (GPA vs HC)	1	9
Mutation zu E, D (GPA vs HC)	0	1
Mutation zu R, H, K (GPA vs HC)	0	2

Relative Frequenzen (%) der verschiedenen Subfamilien an Keimbahngenen von peripheren, klonalen und produktiven IGHV Genen (n=244353/15) gesunder Probanden (A) und von klonalen und produktiven IGHV Genen (n=231/15) aus nasalen Schleimhautbiopsien und Lungenbiopsien bei der GPA (B) berechnet von Olena Ohlei unter Einbezug der Funktion GeneUsage aus dem R-Paket bcrep (Bischof und Ibrahim, 2016)

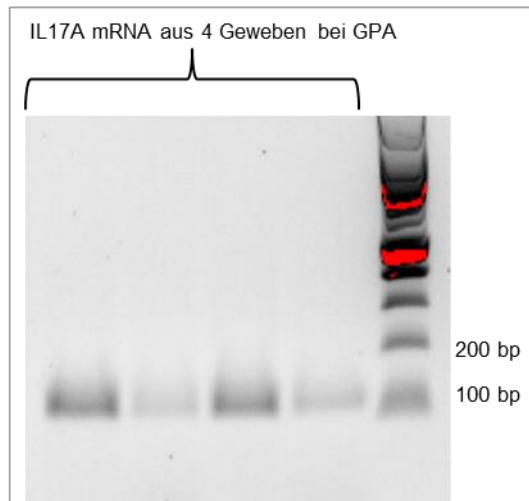
A

<b>IGHV1-18</b>	<b>IGHV1-2</b>	<b>IGHV1-24</b>	<b>IGHV1-3</b>	<b>IGHV1-45</b>	<b>IGHV1-46</b>	<b>IGHV1-58</b>
2.324097	1.750746	0.3593162	1.055031	0.2017573	1.565768	0.223038
<b>IGHV1-69</b>	<b>IGHV1-69-2</b>	<b>IGHV1-8</b>	<b>IGHV1-NL1</b>	<b>IGHV2-26</b>	<b>IGHV2-5</b>	<b>IGHV2-70</b>
3.018175	0.004910928	1.021473	0.0409244	0.1514203	0.5774433	0.1452816
<b>IGHV2-70D</b>	<b>IGHV3-11</b>	<b>IGHV3-13</b>	<b>IGHV3-15</b>	<b>IGHV3-19</b>	<b>IGHV3-20</b>	<b>IGHV3-21</b>
0.1379152	3.239166	0.9138419	1.318175	0.0920799	0.3147086	3.749903
<b>IGHV3-22</b>	<b>IGHV3-23</b>	<b>IGHV3-25</b>	<b>IGHV3-30</b>	<b>IGHV3-30-3</b>	<b>IGHV3-33</b>	<b>IGHV3-35</b>
0.02660086	7.852165	0.000409244	4.682979	2.728839	3.012854	0.02578237
<b>IGHV3-38-3</b>	<b>IGHV3-43</b>	<b>IGHV3-43D</b>	<b>IGHV3-47</b>	<b>IGHV3-48</b>	<b>IGHV3-49</b>	<b>IGHV3-52</b>
0.02496388	0.2209918	0.05156474	0.06302358	3.636133	0.2938372	0.05074626
<b>IGHV3-53</b>	<b>IGHV3-64</b>	<b>IGHV3-64D</b>	<b>IGHV3-66</b>	<b>IGHV3-69-1</b>	<b>IGHV3-7</b>	<b>IGHV3-71</b>
2.999759	0.83363	0.5029609	1.252287	0.4436205	8.53151	0.02496388

<b>IGHV3-72</b>	<b>IGHV3-73</b>	<b>IGHV3-74</b>	<b>IGHV3-9</b>	<b>IGHV3-NL1</b>	<b>IGHV4-28</b>	<b>IGHV4-30-2</b>
1.00674	0.4608087	8.337528	1.334954	0.3061145	0.06097736	1.032523
<b>IGHV4-30-4</b>	<b>IGHV4-31</b>	<b>IGHV4-34</b>	<b>IGHV4-38-2</b>	<b>IGHV4-39</b>	<b>IGHV4-4</b>	<b>IGHV4-55</b>
1.176577	2.527491	4.262686	0.7157678	3.490442	7.484254	0.00613866
<b>IGHV4-59</b>	<b>IGHV4-61</b>	<b>IGHV5-10-1</b>	<b>IGHV5-51</b>	<b>IGHV5-78</b>	<b>IGHV6-1</b>	<b>IGHV7-4-1</b>
3.8649	2.732522	0.3142994	0.5344727	0.001227732	0.7943426	0.08880595
<b>IGHV7-81</b>						
0.001636976						

B

<b>IGHV1-18</b>	<b>IGHV1-2</b>	<b>IGHV1-3</b>	<b>IGHV1-46</b>	<b>IGHV1-58</b>	<b>IGHV1-69</b>	<b>IGHV1-8</b>
3.896104	3.030303	2.597403	1.298701	0.4329004	8.225108	1.731602
<b>IGHV2-5</b>	<b>IGHV2-70D</b>	<b>IGHV3-11</b>	<b>IGHV3-13</b>	<b>IGHV3-15</b>	<b>IGHV3-21</b>	<b>IGHV3-23</b>
3.896104	0.4329004	2.164502	0.4329004	0.4329004	2.597403	6.926407
<b>IGHV3-30</b>	<b>IGHV3-30-3</b>	<b>IGHV3-33</b>	<b>IGHV3-43D</b>	<b>IGHV3-48</b>	<b>IGHV3-49</b>	<b>IGHV3-53</b>
6.493506	1.298701	1.298701	0.8658009	2.597403	0.8658009	2.597403
<b>IGHV3-64</b>	<b>IGHV3-64D</b>	<b>IGHV3-7</b>	<b>IGHV3-73</b>	<b>IGHV3-74</b>	<b>IGHV3-9</b>	<b>IGHV4-30-2</b>
0.4329004	0.4329004	3.030303	0.4329004	2.164502	2.597403	1.731602
<b>IGHV4-30-4</b>	<b>IGHV4-31</b>	<b>IGHV4-34</b>	<b>IGHV4-39</b>	<b>IGHV4-4</b>	<b>IGHV4-59</b>	<b>IGHV4-61</b>
1.731602	1.731602	7.359307	4.761905	4.329004	6.926407	3.896104
<b>IGHV5-10-1</b>	<b>IGHV5-51</b>	<b>IGHV6-1</b>	<b>IGHV7-4-1</b>			
0.4329004	2.597403	0.4329004	0.8658009			



Agarosegel der mRNA Expression von IL-17A in Form des 104 bp Amplikon in nasalen Schleimhautbiopsien von GPA Patienten (n=4) mit 100 bp Marker

## 10 Danksagung

Ich danke an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Peter Lamprecht und Frau PD Dr. Antje Müller für die Ausgabe des Themas, die durchgehende Betreuung und die Möglichkeit eine Doktorarbeit in der Klinik für Rheumatologie und klinischen Immunologie anzufertigen. Der Direktorin Frau Prof. Dr. Gabriela Riemekasten möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken und ihr Interesse an dem Verlauf meiner Arbeit. Frau PD Dr. Antje Müller bin ich dankbar für die einfühlsamen und freundschaftlichen Worte in schwierigen Phasen dieser Doktorarbeit und für die lebhaften Diskussionen. Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Lamprecht und Frau PD Dr. Antje Müller für die entgegengebrachten Freiheiten und die Bereitstellung der Rahmenbedingungen bedanken. Damit sei zum Beispiel der Zugang zu Gewebeproben von GPA-Patienten gemeint, die in einer Kooperation mit Frau Dr. Katrin Hasselbacher aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität zu Lübeck bereitgestellt wurden. Frau Dr. Konstanze Holl-Ulrich danke ich für die pathologische Bewertung dieser Proben. Ebenso hilfreich war die Kooperation mit Dr. Martine Cérutti, Leiterin des Labors "Baculovirus et Thérapie" in Saint Christol Lèz Alès in Frankreich, die ich wiederbeleben durfte. An dieser Stelle möchte ich Mme Sylvie Choblet They für die exzellente technische Hilfe bei der Expression rekombinanter Immunglobuline bedanken. Der Auslandsaufenthalt in Frankreich war eine interessante und intensive Erfahrung für mich. Herrn PD Dr. Jan Voswinkel möchte ich als Mitbegründer der theoretischen Ausgangsbasis dieser Arbeit für das Korrekturlesen des Manuskriptes danken. Desweiteren danke ich dem Graduiertenkolleg GRK1727 für die hilfreichen Anregungen und die Möglichkeit zum Austausch, da fruchtbare Kooperationen mit dem Institut für Anatomie (PD Dr. Katrin Kalies, Markus Niebuhr) und der Klinik für Dermatologie (Dr. Christoph Hammers und PD Dr. Andreas Recke) entstanden sind, wobei ich Prof. Dr. Saleh Ibrahim für die Bereitstellung von Rohdaten einer Hochdurchsatz-Sequenzierung danke. Auf diese Weise konnte ich die Masterarbeit von Olena Ohlei begleiten. Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Rudolph Manz möchte ich für die hilfreiche, konstruktive Kritik danken. Meinem ehemaligen Betreuer der Masterarbeit und Mentor der Doktorarbeit Herrn Dr. Reinhard Depping danke ich für die hilfreichen Anmerkungen und die Bereitstellung von Laborgeräten. Den Mitarbeitern und Studenten der Klinik für Rheumatologie und klinischen Immunologie danke ich für die hilfreichen Tipps und die nette Aufnahme in der Arbeitsgruppe. Meiner Familie möchte ich herzlichst für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meinem Freund danke ich für sein Verständnis und seine aufmerksame, lebensfrohe Art, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit erleichtert haben.