

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des OHC
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Klonierung und molekulare Charakterisierung humaner, monoklonaler
Antikörper einer Patientin mit Kawasaki-Syndrom vor und nach Behandlung
mit IVIG mittels kombinatorischer Phagen-Display-Bibliothek**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Stephan Leucht
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Gaedicke
2. Prof. Dr. med. A. Salama
3. Prof. Dr. H.-I. Huppertz

Datum der Promotion:30.01.2009

1. Einleitung	5
1.1. Das Kawasaki-Syndrom	5
1.2. Die adaptive, humorale Immunantwort	6
1.2.1. Die Entstehung der Vielfalt des Antikörperrepertoires	7
1.2.2. CD5 ⁺ -B-Zellen und natürliche Antikörper	8
1.2.3. Selbsttoleranz und Autoimmunität	9
1.3. Autoimmunerkrankungen	10
1.3.1. Einteilung und Hypothesen zur Ätiologie	10
1.3.2. T-Zell-Superantigen	13
1.3.3. B-Zell-Superantigen.....	14
1.4. Intravenöse Immunglobuline	16
1.4.1. Charakterisierung und klinische Anwendung	16
1.4.2. Wirkung bei Autoimmunerkrankungen	16
1.5. Das Phagen Display System	17
1.5.1. Das pComb3H-System	18
1.6. Herleitung und Ziele dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Verbrauchsmaterialien	21
2.1.1. Geräte und Zubehör	21
2.1.2. Reagenzien	21
2.1.3. Primer	23
2.2. Patientin mit Kawasaki-Syndrom	25
2.3. Phagen Display und Analyse humaner Fab-Fragmente	26
2.3.1. Probengewinnung, Reverse Transkription und PCR	26
2.3.2. Klonierung in pComb3H	29
2.3.3. Isolierung spezifischer Fab-Phagen	31
2.3.4. Charakterisierung spezifischer Fab-Phagen	33
2.3.5. Sequenzanalyse	33
3. Ergebnisse	37
3.1. Gewinnung der RNA aus PBL	37
3.2. Amplifikation des Antikörperrepertoires	37
3.3. Charakterisierung der beiden Bibliotheken	38
3.4. Panning der Bibliotheken auf IVIG	38

3.5. ELISA der Fab-Phagen	39
3.6. Sequenzen der IVIG-spezifischen Fab-Phagen	41
3.6.1. Sequenzen allgemein	41
3.6.2. Zugehörige Keimbahngene und Mutationsraten	42
3.6.3. Homologien der selektierten Klone	49
4. Diskussion	53
4.1. Phage Display Bibliotheken und die Selektion von humanen Fab-Fragmenten	53
4.2. Charakterisierung der IVIG-selektierten Fab-Phagen	54
4.2.1. Keimbahngene der schweren Ketten der IVIG-selektierten Fab-Phagen	41
4.3. Die Rolle der Keimbahngene-Loki 3-23 und 3-30	58
4.4. Mögliche Wirkungsweisen von IVIG	60
5. Zusammenfassung	63
6. Danksagung	65
7. Lebenslauf	66
8. Veröffentlichungen	68
9. Literaturverzeichnis	69

1. Einleitung

1.1. Das Kawasaki-Syndrom

Das Kawasaki-Syndrom wurde erstmals 1967 von dem Japaner Kawasaki als mucocutanes Lymphknotensyndrom (MLNS) beschrieben (1;2). Die Diagnose wird allein anhand klinischer Kriterien gestellt. Führendes Symptom ist anhaltendes Fieber > 5 Tage. Weitere Symptome sind Veränderungen an Händen und Füßen (Palmar-/Plantarerythem, Induration sowie die Desquamation der Fingerspitzen in der subakuten Phase), ein polymorphes Exanthem, die beidseitige, nicht eitrig Konjunktivitis, Veränderungen im Oropharynx (Lippenrötung, Erdbeerzunge sowie diffuse Rötung der Schleimhäute) und eine akute zervikale Lymphknotenschwellung >1,5 cm. Sind neben dem Fieber 4 der 5 anderen Hauptsymptome vorhanden, so spricht man vom Kawasaki-Syndrom, wobei nicht alle Symptome gleichzeitig auftreten müssen, sondern einzelne Symptome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auch schon abgeklungen sein können. Findet man weniger als 4 Hauptsymptome neben dem anhaltenden Fieber und sind in der Echokardiographie Coronarveränderungen nachweisbar, so spricht man vom inkompletten Kawasakisyndrom (3). Die laborchemischen Veränderungen sind relativ unspezifisch (erhöhtes CrP, Leukozytose, Hypalbuminämie, initial Thrombopenie, dann Thrombozytose) und daher bei der Diagnosefindung nur bedingt hilfreich. Die Erkrankung ist relativ selten (Prävalenz in Deutschland 10 : 100.000), betrifft zu 80 % Kinder unter 5 Jahren und hat eine Knabenwendigkeit von 1,5:1 (4;5). Unbehandelt treten bei ca 20 % der Kinder Coronarveränderungen auf, durch die Behandlung mit Immunglobulinen konnte dieser Anteil auf 5% gesenkt werden. Die Mortalität infolge von akuten Myokardinfarkten wird mit 1% angegeben(5). Das Kawasaki-Syndrom ist in entwickelten Ländern die Hauptursache für erworbene Herzerkrankungen (4). Die Therapie des Kawasaki-Syndroms besteht in der einmaligen intravenösen Gabe von 2 g/kgKG Immunglobulinen über 12 Stunden sowie in der oralen Gabe von Acetylsalicylsäure 50-80 mg/kgKG bis 48 Stunden nach Fieberabfall, gefolgt von 3-5 mg/kgKG für weitere 6 Wochen (5;6). Bei anhaltendem Fieber bedarf es gegebenenfalls einer zweiten Gabe von Immunglobulinen. Bei weiterem Therapieversagen wird der Einsatz von Steroiden sowie die Gabe von Infliximab (TNF α -Antikörper) diskutiert (3).

Trotz umfangreicher Forschungsarbeiten (mehr als 3000 wissenschaftliche Artikel seit Erstbeschreibung) bleibt die Ätiologie der Erkrankung weiterhin unklar (4;5). Die Prävalenz gibt Hinweise sowohl auf eine genetische Prädisposition als auch auf eine wahrscheinlich infektiöse Genese. Für die genetische Prädisposition spricht, dass die Prävalenz nicht nur in Japan deutlich

höher (120 : 100.000) ist, sondern auch bei japanischstämmigen Einwohnern in den USA (4). Die Prävalenz unter eineiigen Zwillingen ist ebenfalls verglichen mit der Normalbevölkerung deutlich erhöht. Weiterhin gibt es einzelne Beschreibungen, dass Kinder von Eltern, welche am Kawasakisyndrom erkrankten, einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf bieten. Hinweise auf eine infektiöse Genese sind das Auftreten im frühen Kindesalter, das vorwiegend saisonale Auftreten im Winter und Frühjahr als auch geographisch endemische Kluster (4;7). Es konnten zwar verschiedenste bakterielle und virale Erreger bei Kindern mit Kawasaki-Syndrom isoliert werden (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, EBV, AdV, ParvoB19-Virus, Parainfluenza-Virus, Rotavirus etc), ein einzelner Erreger als Auslöser der Erkrankung wurde jedoch nicht gefunden (4;5).

Die immunologischen Daten zeigen eine überschießende Immunreaktion mit massivem Zytokinausstoß. Hierbei wird diskutiert, ob ein oder mehrere Superantigene als Ursache der überschießenden Immunantwort in der Pathogenese des Kawasakisyndroms eine entscheidene Rolle spielen (4;5;8;9). Einen weiteren Hinweis auf die Mitwirkung von Superantigenen bilden erhöhte IgM-Antikörpertiter gegen 5 getestete Superantigene bei einem Teil der Kawaskipatienten (10).

Im Rahmen dieser durch Superantigene ausgelösten überschießenden Immunreaktion könnte es zur Bildung von Autoantikörpern gegen endotheliale Oberflächenproteine kommen und die Vaskulitis in den Coronargefäßen somit ein Ausdruck einer Autoimmunreaktion sein.

1.2. Die adaptive, humorale Immunantwort

Die Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus' vor potenziell pathogenen Substanzen aus der Umwelt. Die Immunantwort teilt sich hierbei in eine zelluläre und humorale Antwort, welche sich wiederum aufteilen in eine frühe unspezifische und eine später einsetzende adaptive Antwort. Im Rahmen dieser Arbeit soll uns nur die adaptive humorale Antwort interessieren, welche auf der klonalen Selektion von spezifischen B-Zellen beruht. Diese Selektion ermöglicht einerseits die Produktion von spezifischen Antikörpern zur gezielten Markierung von potenziell pathogenen Substanzen und nachfolgenden Elimination als auch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses zur weitaus effizienteren Abwehr bei erneutem Auftreten einer schon bekannten Substanz. Die Struktur einer fremden Substanz, an die sich der Antikörper bindet, nennt man Antigen. Um auf alle denkbaren Antigene reagieren zu können,

verfügt das Immunsystem über ein umfangreiches Antikörperrepertoire (ca 10^{11} verschiedene Antikörpervariationen).

Ein Antikörper hat die Form eines Y und besteht aus zwei funktionalen Bereichen, welche strukturell voneinander getrennt sind. Die variablen Regionen, welche auf den Armen des Y liegen, erkennen spezifisch das Antigen. Die konstante Region, welche den Fuß des Y darstellt, ist für die Effektormechanismen zuständig. Mittels der Protease Papain kann man den Antikörper in seine zwei identischen Antigen-bindenden Regionen (Fab-Fragment = *Fragment antigen binding*) sowie die konstante Region (Fc-Region = *Fragment crystalizable*) teilen. Strukturell besteht der Antikörper aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Polypeptidketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Am Aminoende einer jeden Polypeptidkette befindet sich eine Region mit drei hypervariablen Sequenzen (CDR = *complementarity determining region*), welche durch relativ konstante Regionen (FR = *framework regions*) getrennt sind. Die hypervariablen Regionen je einer leichten und schweren Kette bilden die antigenbindende Stelle (11;12).

1.2.1. Die Entstehung der Vielfalt des Antikörperrepertoires

Die variablen Regionen der schweren Kette werden durch die Kombination von V_H (*heavy*) (*variable*)-, J_H (*joining*)- sowie D_H (*diversity*)-Gensegmente kodiert, die variablen Regionen der leichten Kette nur durch V_L (*light*)- und J_L -Gensegmente. Jedes Individuum besitzt eine bestimmte vererbte Anzahl unterschiedlicher V-, J- und D-Segmente, welche durch Homologievergleiche noch in verschiedene Familien unterteilt werden können (13;14). Doch entsteht die Vielfalt des Antikörperrepertoires nicht nur durch die freie Rekombination dieser unterschiedlichen Segmente, sondern zusätzlich durch die ungenaue Verknüpfung derselben. Diese junktionale Vielfalt entsteht durch zwei verschiedene Prozesse. Einerseits können während der Rekombination zufällig zusätzliche Basen an die Nahtstelle angebaut werden (N-Nukleotide), andererseits werden die D- und J-Segmente in allen drei Leserastern, sofern durch die Rasterverschiebung kein Stopkodon entsteht, verwendet. Hierbei entstehen sogenannte Palindromnukleotide (P-Nukleotide). Die CDR1- und CDR2-Regionen werden dabei allein durch das V-Segment kodiert. Die CDR3-Region setzt sich aus der Verknüpfungsstelle zwischen V_L - und J_L -Segment bzw aus V_H -, J_H - und D_H -Segment zusammen und ist somit besonders variabel (15;16).

Nachdem sich funktionelle Antikörperstrukturen zusammengefügt haben, setzt der Prozess der somatischen Hypermutation ein. Bei diesem kommt es zu einer hohen Rate an Punktmutationen in den variablen Regionen der exprimierten schweren und leichten Ketten, die zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz und bestenfalls zu einer besseren Spezifität und Affinität des Antikörpers beitragen. Durch die Wechselwirkung mit dem Antigen kommt es nun zur Selektion der B-Zelle, deren Antikörper zum jeweiligen Antigen die günstigste Spezifität und Affinität besitzt. Gleichzeitig finden auch Punktmutationen in den Framework-Regionen statt, welche aber nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen, sogenannte stille Mutationen. Warum gerade in den variablen Regionen eine hohe Rate an Austauschmutationen stattfindet, während die konstanten Regionen in ihrer Sequenz nahezu unverändert bleiben, ist unbekannt (15;11).

Letzlich kann es in Wechselwirkung mit Zytokinen noch zum sogenannten *isotype switching* kommen, bei dem die nun optimierte variable Region mit den unterschiedlichen konstanten Regionen exprimiert wird und somit verschiedene Effektormechanismen in Gang setzen kann (15;17;18).

1.2.2. CD5+-B-Zellen und natürliche Antikörper

Eine besondere Untergruppe der B-Zellen sind die CD5+-B-Zellen. Diese zeichnen sich einerseits durch die Expression des Oberflächenproteins CD5 als auch durch Expression von transmembralem IgM aus. Das transmembrale IgM und die von ihnen sezernierten Antikörper nutzen direkt die Keimbahngene und weisen nur wenig N-Nukleotide und Mutationen auf, weshalb sie auch als natürliche Antikörper bezeichnet werden. Diese natürlichen Antikörper können polyspezifisch an weit verbreitete, bakterielle Polysaccharidantigene binden und dienen somit wahrscheinlich der primären Immunabwehr von Bakterien (19;20). Die Aktivierung von CD5+-B-Zellen bedarf nicht der Stimulierung von T-Helferzellen, hinterlässt jedoch auch kein immunologisches Gedächtnis. Man nimmt daher an, dass CD5+-B-Zellen einen evolutionären Zwischenschritt in der Entwicklung der adaptiven Immunantwort darstellen.

Neben den Antikörpern gegen bakteriellen Polysaccharidantigenen werden aber Autoantikörper gegen evolutionär selektierte, konservierte Autoantigene wie z.B. doppelsträngige DNA gebildet (19). Dies könnte der Beseitigung von alternden Zellen dienen. Weiterhin zeichnen sich natürliche Antikörper durch viele Wechselwirkungen untereinander aus, was zu einer Regulation des Ak-Repertoires und zur Neutralisation von Autoantikörpern führt (21). Natürlichen

Antikörpern wird somit eine protektive Wirkung gegen Autoimmunerkrankungen zugeschrieben (23). Es wurden jedoch auch pathogene Autoantikörper gefunden, die in ihrer Sequenz große Homologien zu natürlichen Antikörpern aufwiesen, in der CDR aber viele Austauschmutationen im Sinne einer antigen-selektierten Hypermutation hatten. Hier könnte ein durch Infektion getriggelter Selektionsprozess natürliche Antikörper ein pathogenes Potential entwickeln lassen (24).

Ob natürliche Antikörper nur von CD5⁺-B-Zellen oder auch von konventionellen B-Zellen produziert werden, ist umstritten (17;21;22).

1.2.3. Selbsttoleranz

Damit sich die Immunabwehr nicht gegen eigene Strukturen richtet, ist die Entwicklung der Selbsttoleranz elementare Voraussetzung für ein funktionierendes Immunsystem. Nahm man früher an, dass die Selbsttoleranz eine genetisch vererbte Ursache hat, wurde 1959 erstmals die allgemein anerkannte Hypothese der klonalen Selektion von Burnet aufgestellt (24) und in den 1990er in Versuchen mit transgenen Mäusen nachgewiesen, dass die Entwicklung von Selbsttoleranz einen Prozess der Selektion und Elimination darstellt (25).

Die noch unreife, nur IgM exprimierende B-Zelle im Knochenmark bildet natürlich auch autoreaktive Rezeptoren aus. Binden diese jedoch im Knochenmark an viele multivalente Liganden, wie z.B. eigenene MHC-Moleküle, werden diese B-Zellen eliminiert. Diesen Prozess nennt man *clonal deletion* (19). Binden die Rezeptoren der unreifen B-Zellen an lösliche Selbstantigene im Knochenmark, reifen diese Zellen zwar heran, sind aber durch eine Blockade der Signaltransduktion anergisch, d.h. sie reagieren nicht mehr auf dieses Antigen. Ein kleiner Teil der potentiell autoreaktiven unreifen B-Zellen ist durch weitere Expression der RAG-Gene in der Lage, nach Kontakt mit Autoantigenen eine erneute Umordnung der leichten Kette der Immunglobuline vorzunehmen und somit ihre Autoreaktivität wieder zu verlieren (25). Da es sowohl Oberflächen- als auch lösliche Antigene gibt, welche nur auf bestimmten Zelltypen oder in bestimmten Kompartimenten gebildet werden, somit also unreifen B-Zellen nicht im Knochenmark präsentiert werden können, kann der Prozess der *clonalen deletion* sowie der *anergy* auch bei reifen B-Zellen stattfinden. Weiterhin ist das Überleben potentiell autoreaktiver B-Zellen oft unerheblich, da diese in den meisten Fällen für ihre Stimulation auf T-Zellen angewiesen sind. Bei Selbsttoleranz der T-Zellen sind diese B-Zellen dann nicht in der Lage, zu proliferieren und Antikörper zu sezernieren (26).

Unreife T-Zellen werden im Thymus zuerst einer positiven Selektion unterzogen. Es reifen nur diejenigen T-Zellen weiter heran, deren Rezeptoren Selbst-MHC-Moleküle erkennen. In einem zweiten Schritt findet eine negative Selektion statt. Hierbei werden alle T-Zellen mittels Apoptose eliminiert, deren Rezeptoren an von Selbst-MHC-Molekülen präsentierte Autoantigene binden. Somit entsteht eine selbstrestringierte, selbsttolerante Thymozytenpopulation. Doch auch hier besteht das Problem, dass es Peptide gibt, welche nur von bestimmten Zelltypen außerhalb des Thymus gebildet werden, die somit nicht der negativen Selektion unterliegen. Jedoch braucht die naive T-Zelle neben der spezifischen Bindung an ein von MHC-Molekülen präsentierte Peptidfragment noch costimulatorische Signale, um aktiviert zu werden. Diese costimulatorischen Signale finden sich nur auf der Oberfläche der klassischen antigen präsentiierenden Zellen (APC) – Macrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen -, so dass die Stimulation einer naiven T-Zelle durch Autoantigenpräsentation auf gewebständigen Zellen ohne costimulatorische Signale ein Stadium der Anergie induziert. Diese T-Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, Interleukin 2 (IL2) zu produzieren und verlieren damit die Fähigkeit, sich selbst zu stimulieren (27;28). Dieser Prozess ermöglicht T-Zellen auch außerhalb des Thymus die Selbsttoleranz zu bewahren.

Trotz dieser komplexen Mechanismen zur Selbsttoleranz gibt es in jedem Immunsystem eine gewisse Anzahl von autoreaktiven Lymphozyten, welche aber durch regulierend eingreifende Netzwerk- und Suppressormechanismen im Gleichgewicht gehalten werden und somit allein keine Autoimmunerkrankungen auslösen können (28).

1.3. Autoimmunerkrankungen

1.3.1. Einteilung und Hypothesen zur Ätiologie

Ist die Ursache eines Gewebes Schadens die Folge einer spezifischen Immunantwort auf Autoantigene, so spricht man von einer Autoimmunerkrankung. Diese Immunantwort kann sowohl durch Antikörper, T-Zellen als auch Komplement vermittelt werden. Der Trigger für diese Immunantwort ist jedoch für die meisten Autoimmunerkrankungen bislang unbekannt. Das Krankheitsbild wird bestimmt durch das spezifische Antigen, gegen das sich die Immunantwort richtet, sowie den Mechanismus, der das antigentragende Gewebe schädigt (30;31;32). Hierbei kann man drei immunpathogene Mechanismen unterteilen:

1. Antikörper gegen Oberflächen- oder Matrixantigene (Typ II-Reaktion)

Hierbei entstehen Autoantikörper, die sich direkt gegen Oberflächen- oder Matrixantigene richten. So markierte Zellen können einerseits durch das retikuloendotheliale System eliminiert werden. Als Beispiel seien hier die autoimmunhämolytische Anämie oder die Autoimmunthrombozytopenie genannt. Andererseits kann die Markierung mit Autoantikörpern komplementvermittelt zu Entzündungsreaktionen führen. So führen Antikörper gegen die Basalmembran beim Goodpasture-Syndrom zu einer Vaskulitis, Nierenversagen oder Lungenblutungen. Als Sonderfall können Autoantikörper gegen Rezeptorstrukturen diese stimulieren oder blockieren. So werden bei der Myasthenia gravis die Acetylcholinrezeptoren geblockt und die Neuromuskuläre Transmission gestört. Bei der Graves Disease stimulieren Autoantikörper den TSH-Rezeptor und führen zu einer exzessiven Produktion von Schilddrüsenhormonen.

2. Immunkomplexerkrankungen (Typ III-Reaktion)

Hier führt eine chronische Produktion von autoreaktiven IgG-Antikörpern zu Immunkomplexablagerungen in Geweben, insbesondere in kleinen Blutgefäßen, welches wiederum Entzündungsreaktionen auslöst. Im Gegensatz zu gewebs- oder organspezifischen Autoimmunerkrankungen bezeichnet man die Immunkomplexerkrankungen auch als systemische Autoimmunerkrankungen, da die Immunkomplexe im Körper zirkulieren. Als Beispiel sei hier der Lupus erythematosus aufgeführt, bei dem IgG gegen DNA, Histone, Ribosome etc. Immunkomplexe bilden, welche die Niere, Gefäße und Gelenke schädigen können.

3. T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankungen (Typ IV-Reaktion)

Reagieren T-Zellen spezifisch mit von Gewebs-MHC-Molekülen präsentierten Autoantigenen, so spricht man von T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen. Als Folge der Stimulation des selbstreaktiven T-Zell-Klons können dann die verschiedenen Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems zu Gewebsschädigungen führen. Beim insulinabhängigen Typ des Diabetes mellitus findet zum Beispiel eine T-Zell-vermittelte Zerstörung der β -Zellen im Pankreas statt. Bei der Rheumatoiden Arthritis führt die Stimulation von T-Zellen durch ein synoviales Antigen zur Gelenkentzündung und -destruktion (31).

Sind bei vielen Autoimmunerkrankungen die Autoantikörper als auch die Zielantigene bekannt und werden zu diagnostischen Zwecken genutzt, so bleibt doch in den meisten Fällen die Frage, wann und warum diese Autoantikörper gebildet werden bzw. wann sie zu Gewebsschädigungen führen (33). Das häufig familiäre Auftreten von Autoimmunerkrankungen führte früh zu der

Hypothese, dass die Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen eine genetische Komponente aufweist. Mit der Entwicklung der HLA-Typisierung (*human leukocytes antigen*) fand sich bei vielen Autoimmunerkrankungen eine Assoziation mit bestimmten HLA-Typen. So konnte gezeigt werden, dass Geschwister, welche vom insulinabhängigen Typ des Diabetes mellitus (IDDM) betroffen sind, häufiger zwei HLA-Typen gemeinsam haben als es statistisch zu erwarten wäre. Weiterhin fand man die HLA-Allele DR3 und DR4 bei Patienten mit IDDM weitaus häufiger als in der Normalbevölkerung, während Menschen mit DR2 deutlich unterrepräsentiert waren. Dies lässt vermuten, dass das Vorhandensein von DR3 und DR4 zu einer erhöhten Empfänglichkeit für IDDM führt, während DR2 eher einen protektiven Charakter hat (31).

Die Assoziation von Autoimmunerkrankungen mit MHC-Genotypen erscheint auch sinnvoll, da T-Zellen meistens an der Immunantwort beteiligt sind. Ein direkter Nachweis, dass bestimmte Autoantigene selektiv von bestimmten MHC-Molekülen präsentiert werden bzw. die Kombination von bestimmten Autoantigenen und bestimmten MHC-Molekülen eine stärkere T-Zell-Antwort vermitteln können, gelang bisher nicht.

Weiterhin sind bestimmte Autoimmunerkrankungen in ihrer Geschlechterverteilung auffällig (systemischer Lupus erythematosus m:w = 1 : 10-20), so dass sich auch vermuten lässt, dass bestimmte Hormone Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen haben (31).

Als Trigger für Autoimmunerkrankungen werden in vielen Fällen auch Infektionen diskutiert. So nimmt man an, dass im Rahmen von Immunreaktionen auf bestimmte infektiöse Antigene, T- oder B-Zellen aktiviert werden, welche dann mit Selbstantigenen kreuzreagieren und somit eine Autoimmunerkrankung in Gang setzen. So wurde in einem Experiment Mäusen ein Viruskernprotein hinter den Insulinpromoter kloniert, so dass dieses Protein nur von β -Zellen im Pankreas exprimiert wurde. Die Menge des Proteins war aber so gering, dass allein dadurch die T-Zellen nicht aktiviert wurden. Nach Infektion mit dem originären Virus und nachfolgender Bildung von zytotoxischen T-Zellen gegen das Viruskernprotein, erkrankten die Mäuse an Diabetes, da auch die das Protein exprimierenden β -Zellen zerstört wurden (31). Diesen Mechanismus nennt man *molecular mimicry*. In der Tat wurden auch bei einigen Autoimmunerkrankungen vorhergehende infektiöse Erkrankungen als Ursache für die Autoimmunreaktion gefunden, so zum Beispiel die Infektion mit *Chlamydia trachomatis* für das Reiter Syndrom (Arthritis). Doch ist die Infektion alleine nicht ausreichend, da sonst die Prävalenz des Reiter Syndroms weitaus höher sein müsste. Für die Empfänglichkeit spielt hierbei

wiederum eine genetische Disposition eine Rolle. So konnte für das Reiter Syndrom eine Assoziation mit HLA-B27 nachgewiesen werden.

Neben dem *molecular mimicry* sind aber auch andere Mechanismen der Induktion von Autoimmunreaktionen durch infektiöse Substanzen denkbar. So könnten im Rahmen einer Infektion Zellen zerstört und Autoantigene präsentiert werden, welche ohne die Schädigung nicht mit T-Zellen in Kontakt gekommen wären und somit nicht der Selbsttoleranz unterliegen. Bei der *sympathetic ophthalmia* führt die Schädigung eines Auges durch Infektion oder Trauma zu einer Autoimmunreaktion gegen bestimmte Augenproteine, die dann auch das nicht betroffene Auge affektieren kann. Oft ist die Entfernung des geschädigten Auges als Quelle der Autoantigene notwendig, um die Sehkraft auf dem nicht geschädigten Auge zu erhalten (31).

Auch die Bindung von löslichen Selbstproteinen an pathogene Substanzen kann Autoimmunreaktionen stimulieren. Da die pathogene Substanz eine T-Helfer-Zellantwort auslöst, können B-Zellen, die das gebundene Selbstprotein wahrnehmen, mit stimuliert werden. Ein besonderer Fall sind Superantigene, auf die ich im nächsten Kapitel näher eingehen möchte.

1.3.2. T-Zell-Superantigene

T-Zell-Superantigene sind Proteine mit bakteriellem oder viralem Ursprung, welche die Fähigkeit besitzen, bis zu 20% der T-Zell-Population zu aktivieren. Normalerweise wird die T-Zelle durch die Bindung seines T-Zell-Rezeptors (TCR) an ein von einer APC präsentiertes Protein aktiviert. Das Protein sitzt dabei in einer *peptid binding groove* des MHC-Moleküls, so dass sowohl Bindungsareale am MHC-Molekül um die *peptid binding groove* als auch die Spezifität des Proteins eine Rolle für die Affinität des TCR spielen. Weiterhin sind costimulatorische Oberflächenproteine wie CD4 notwendig. Nach Aktivierung schüttet die T-Zelle Zytokine (IL2, TNF α etc) aus und regt dadurch die eigene Proliferation als auch eine Entzündungsreaktion an. Bei dieser spezifischen Reaktion eines Antigen werden ca 0,001% der T-Zell-Population aktiviert. Das Superantigen (SAg) umgeht diesen spezifischen Weg der Aktivierung, indem es promiskuitiv an konstante Regionen bestimmter V β -Domains des TCR und an das MHC-Molekül außerhalb der *peptid binding groove* bindet und somit 5 – 20 % der T-Zell-Population aktivieren kann (34). Dies löst einen Zytokinsturm aus, der die klinischen Symptome der durch SAg ausgelösten Erkrankungen erklärt (35; 36). Ob die Signaltransduktion der T-Zell-Aktivierung nach Bindung des SAg an die V β -Domain des TCR und das MHC-Molekül den klassischen Weg der T-Zell-Aktivierung beschreitet und ob dabei costimulatorische

Oberflächenproteine eine Rolle spielen, ist weiterhin umstritten (34;37;38). Ebenso widersprüchlich sind die Angaben, ob die massive Aktivierung der T-Zellen zu einer klonalen Deletion (sh. Kapitel über Selbsttoleranz) bzw. Inaktivierung der entsprechenden T-Zellen führt oder zu einer klonalen Proliferation der T-Zellen, welche die entsprechenden V β -Domänen besitzen. Weiterhin konnte in Strukturanalysen nachgewiesen werden, dass abhängig von der dreidimensionalen Struktur das SAg bei Bindung an die V β -Domain und das MHC-Molekül auch Teile der V α -Domain des TCR sowie die *peptid binding groove* des MHC überlappt, so dass auch diese Strukturen Einfluss auf die Affinität des SAg nehmen können (34;39).

Die bislang am besten untersuchte Gruppe von SAg gehört zur sogenannten *pyrogenic toxin SAg family*, da sie im klinischen Bild massiv fieberauslösend sind und alle zum häufig lethalen Toxic Shock Syndrom führen können. Weiterhin ähneln sie sich auch in ihrer dreidimensionalen Struktur. Hierzu gehören die *staphylococcal enterotoxins* (SE) A-I, die *streptococcal superantigens* (SSA), die *streptococcal pyrogenic exotoxins* (SPE) A-C und das *staphylococcal toxic shock syndrome* (TSST 1). SAg's viralen Ursprungs sind bislang nur in der Maus als vom *mouse mammary tumor virus* (MMTV) kodierte SAg detailliert beschrieben, doch gibt es auch Berichte, nach denen bei Infektion mit CMV oder EBV SAg-Aktivität beobachtet werden konnte (35;40;41;42).

Die Rolle von SAg's in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wird widersprüchlich diskutiert. Initiieren SAg Autoimmunerkrankungen, indem sie autoreaktive T-Zell-Klone aktivieren oder führt die promiskuitive Aktivierung von T-Zellen zur klonalen Expansion bereits aktivierter autoreaktiver T-Zellen, welche dadurch einen suffizienten Level erreichen, um pathogen zu werden? So führte in Mäusen, welche durch Immunization mit einem dem *myelin basic protein* (MBP) ähnlichen Protein eine autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) entwickelt hatten, die Gabe von SEB zur Paralyse bei bislang subklinisch erkrankten Individuen bzw. zu einem Rückfall bei in Remission befindlichen Individuen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt eine direkte Folge einer SEB vermittelten Stimulation von V β 8-exprimierenden, MBP spezifischen T-Zellen war (43;44).

Beim Kawasaki Syndrom konnten in mehreren Studien signifikant erhöhte Level an V β 2- sowie in einem geringeren Ausmaß V β 8.1-T-Zellen nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der entsprechenden V β -Domänen ergab eine große junctionale Diversität, so dass ein spezifisches Antigen ursächlich nicht in Frage kommt, sondern die erhöhten Level bestimmter V β -Domänen wahrscheinlich SAg-vermittelt ist (9). Weiterhin konnten in einer Gruppe von 16 Kawasaki-Syndrom-Patienten bei 13 Patienten bakterielle Toxine mit SAg-Charakter (TSST-1 sowie

SPEB/SPEC) isoliert werden, welche die Expansion von $V\beta 2+$ T-Zellen vermitteln. In der Kontrollgruppe fanden sich SA_g nur bei einem von 15 Patienten (8). Allerdings konnte dieses Ergebnis bei anderen Patientengruppen mit Kawasaki-Syndrom nicht reproduziert werden.

1.3.3. B-Zell-Superantigene

Es wurden auch Proteine bakteriellen Ursprungs gefunden, welche in der Lage sind, bis zu 50% der B-Zell-Population zu aktivieren, die man im folgenden als B-Zell-Superantigene bezeichnet hat. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) bindet das konventionelle Antigen mit einer *peptid binding groove*, welche von den *complementarity determining regions* (CDR) der variablen Regionen der schweren und leichten Kette gebildet wird, was wiederum eine hohe Spezifität zur Folge hat. Die B-Zell-Superantigene hingegen binden den BCR außerhalb der CDR und können somit 5-50 % der B-Zellen aktivieren (45;46). Diese massive Stimulation führt zur Apoptose und einer mehr oder weniger lang andauernden supra-klonalen Depletion. In-vivo Studien zeigten, dass *innate-like* B-Zellen besonders empfänglich für die immunmodulatorische Wirkung von B-Zell-SAGs sind und infolgedessen die primäre Immunabwehr mit natürlichen Antikörpern besonders geschwächt wird (45).

Die Hauptvertreter der B-Zell-SAGs sind das Protein A des *Staphylococcus aureus* (SpA) sowie das Protein L des *Peptostreptococcus magnus* (PpL). SpA fiel ursprünglich als IgG-bindendes Protein auf, welches mit den Fc-Fragment des IgG interagiert. Erst später stellte sich heraus, dass das SpA alternativ auch an das Fab binden kann. Diese Bindung war auch nicht IgG spezifisch, sondern erstreckte sich auch auf die anderen Isotypen der schweren Kette. In immunochemischen Versuchen stellte sich heraus, dass die Fab-vermittelte Bindung ausschließlich Immunglobuline aus der $V_H 3$ -Genfamilie betrifft. In kristallographischen Studien bestätigte sich, dass SpA an eine *framework region* (FR)-kodierte $V_H 3$ -Region bindet und die *peptid binding groove* nicht blockiert (46).

PpL hingegen bindet an eine FR-kodierte Region der leichten κ -Kette der humanen $V_{\kappa 1}$, $V_{\kappa 3}$ und $V_{\kappa 4}$ -Genfamilien mit nachfolgender Deletion derjenigen B-Zellen, welche die leichte Kette aus diesen Genfamilien bezieht (45).

Ein Zukunftsprojekt wäre, Superantigene zu konstruieren, welche zur klonalen Deletion von B-Zell-assoziierten Tumoren führen (45).

1.4. Intravenöse Immunglobuline

1.4.1. Charakterisierung und klinische Anwendung

Zur therapeutischen Gabe von Immunglobulin G werden aus Plasmapools von mehreren tausend Spendern sogenannte Intravenöse Immunglobuline (IVIG) präpariert, welche hinsichtlich der Halbwertszeit und der Subklassenverteilung normalem IgG entsprechen. In dieser Arbeit wurde IVIG Sandoglobulin® der Firma Sandoz verwendet, welches zusätzlich ca. 1,6 % IgA sowie ca. 6% F(ab)₂-Fragmente enthält und weniger als 1% Ig-Aggregate aufweist (22).

Zur Zeit gibt es drei verschiedene klinische Indikationen für die Verwendung von IVIG (46):

1. Die Substitution von IgG bei IgG-Mangelzuständen, sei es im Rahmen von angeborenen Immundefekten mit einer insuffizienten IgG-Produktion (SCID, Wiskott-Aldrich-Syndrom usw.) oder einer infolge einer Erkrankung mangelhaften IgG-Produktion (Leukämie, Zustand nach Knochenmarktransplantation usw.), zur Aufrechterhaltung physiologischer IgG-Spiegel.
2. Die passive Immunisierung mittels IVIG nach Erregerkontakt bei verschiedensten viralen Erkrankungen bei Kindern ohne Immunität in Risikosituationen.
3. Die Gabe von IVIG zur Immunmodulation bei Autoimmunerkrankungen bzw. Erkrankungen, bei denen eine autoimmune Genese vermutet wird (AITP, SLE, MS, Kawasakisyndrom usw.). Hierbei ist eine deutlich höhere Dosierung (meist 2 g/kgKG entweder als Einzelgabe oder verteilt über 3-4 Tage) notwendig als bei den ersten beiden Indikationen (5;6;47;48).

1.4.2. Wirkung bei Autoimmunerkrankungen

Die Wirkungsweise von IVIG bei Autoimmunerkrankungen wird bis heute widersprüchlich diskutiert. Initial führte man den schnellen therapeutischen Effekt rein auf die Blockierung der Fc-Rezeptoren der phagozytierenden Zellen und die damit verbundene verlangsamte bzw. fehlende Zerstörung der mit Autoantikörpern markierten Strukturen. So wurde bei AITP-Patienten ein verlangsamter Thrombozyten-Abbau beobachtet (49).

Langzeiteffekte einer IVIG-Therapie wie die Suppression von Autoantikörpern, der Anstieg des Serum-IgM und der Wechsel im AK-Repertoire lassen sich aber nicht allein durch die Blockierung der Fc-Rezeptoren erklären, sondern weisen auf spezifische V-Region-abhängige Mechanismen der IVIG hin. So konnte in-vitro nachgewiesen werden, dass F(ab)₂-Fragmente aus IVIG Autoantikörper neutralisieren und damit deren Bindung an Autoantigene verhindern

(50;51;52;53). Weiterhin ist vorstellbar, dass die variablen Regionen der therapeutischen Immunglobuline auch in Interaktion mit B- und T-Zell-Antigenrezeptoren treten und damit immunmodulatorisch wirken. Im Rahmen der Jerne'schen Netzwerktheorie wurde gezeigt, dass antiidiotypische Antikörper die Reaktion von B-Zellen, die diesen Idiotyp tragen, unterdrücken können. Über diese suppressive Interaktion könnte die Überexpression eines bestimmten Rezeptors verhindert werden, während sich die anderen Lymphozyten wieder ungehindert vermehren können (22;54;55;56). So zeigte sich bei Patienten mit autoimmuner Thyroiditis, welche mit IVIG behandelt wurden, ein genereller Anstieg des Serum-IgM, eine Suppression der Produktion von krankheitsassoziierten Antikörpern sowie eine Veränderung des Antikörperrepertoires (54).

Im Zusammenhang mit der Therapie des Toxic-Shock-Syndroms und des Kawasaki-Syndroms wird auch eine Blockierung des Superantigens durch antiidiotypische Antikörper und eine damit ausbleibende polyklonale T-Zell-Stimulation diskutiert (57;58).

Die Identifizierung relevanter antiidiotypischer Antikörper könnte einerseits die spezifische Wirkungsweise von IVIG besser erklären und andererseits unter Umständen die Möglichkeit schaffen, spezifische Immunglobuline als verbesserte therapeutische Optionen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen herzustellen.

1.5. Das Phagen Display System

Gestaltete es sich bislang als schwierig, spezifische Autoantikörper molekular zu charakterisieren, bietet das Phagen Display System nicht nur die Möglichkeit hochaffine Fab-Fragmente herzustellen und ggfs. für diagnostische oder therapeutische Zwecke zu nutzen, sondern auch sie molekulargenetisch zu charakterisieren (59;60;61;62;63).

Hierbei werden die Gensegmente, welche die antigenbindende variable Region von Antikörpern kodieren, in einem Phagemidvektor mit dem Gen für das Hüllprotein eines Bakteriophagen verknüpft. Nach Transformation dieses Vektor in *E. coli* und der Koinfektion mit Helferphagen werden Phagen produziert, welche auf dem Hüllprotein ein funktionelles Fab-Fragment präsentieren. Gleichzeitig tragen diese Phagen in ihrem Inneren die genetische Information für das exprimierte Fab-Fragment. Hat man nun einen großen Pool an Phagen mit verschiedenen Fab-Fragmenten, nennt man dies *Phage Display Library*. Aus solch einer Antikörperbibliothek können nun durch Reaktion mit fixiertem Antigen spezifisch bindende Phagen selektiert und repliziert werden, um anschließend ohne weitere Umwege die genetische Struktur der für die

Bindung verantwortlichen spezifischen Fab-Fragmente zu sequenzieren. Für therapeutische und diagnostische Zwecke trennt man das Hüllprotein aus dem Phagemidvektor und erhält dann spezifische lösliche Fab-Fragmente, die man über konventionelle Techniken bislang nicht klonieren konnte.

1.5.1. Das pComb3H-System

Ende der 80er Jahre gelang es erstmals, Fab-Fragmente als funktionelle Moleküle in *E. coli* zu exprimieren (65;66). Über ein auf Lambda-Phagen basierendes System konnte man ein Jahr später eine funktionelle Fab-Fragment-Bibliothek aus Mausantikörpern herstellen (67). Anfang der 90er wurde dann im Labor von Barbas das pComb8- und pCom3-System etabliert, welches die Herstellung von kombinatorischen humanen Fab-Bibliotheken durch Phagen Display ermöglichte (68;69).

Aus einer Blutprobe werden zunächst die Lymphozyten abgesondert. Aus diesen isoliert man die mRNA, da erst nach den Spleißvorgängen der konstante Anteil eines Antikörpers mit dem rekombinierten variablen Teil gekoppelt wird (70). Mittels reverser Transkriptase wird die mRNA in cDNA umgeschrieben. Da in den konstanten Regionen der unterschiedlichen Antikörpergene als auch im N-terminalen Bereich der variablen Regionen identische Sequenzen innerhalb der Genfamilien vorkommen, reicht eine limitierte Anzahl von Primern, um in einer PCR die meisten der transkribierten Antikörpergene zu amplifizieren. Anschließend werden die Fragmente der leichten und schweren Kette im Gel aufgereinigt. Mit Hilfe eines Restriktionsenzym-paares, welches sowohl im pComb3H-Vektor als auch in den Primern der leichten Kette passende Sequenzen vorfindet, werden nun zuerst die leichten Ketten in den Vektor pComb3H integriert und in *E. coli* amplifiziert, ehe in einem zweiten Schritt mit einem anderen Restriktionsenzym-paar die schweren Ketten in den bereits mit einer leichten Kette rekombinierten Vektor kloniert werden. Hierbei kann theoretisch jede leichte Kette mit einer schweren Kette kombiniert werden. So können Kettenkombinationen entstehen, welche im natürlichen Antikörperrepertoire nicht vorhanden waren, jedoch auch ursprüngliche verloren gehen. Nun wird der Vektor erneut in *E. coli* amplifiziert. Durch Antibiotikaresistenzen und Kontrolle eines induzierbaren Promoters besteht ein Selektionsvorteil für die Bakterien, welche ein rekombinantes Plasmid enthalten (71).

Da die Sequenz der schweren Kette im Phagemidvektor mit dem Gen für das Hüllprotein (GIII-Protein) eines filamentösen Phagen verknüpft ist, produzieren die *E. coli* nach Infektion mit

Helferphagen Phagenpartikel, auf deren Oberfläche die schwere Kette verankert ist. Das Fragment der leichten Kette lagert sich über kovalente Wechselwirkungen an die schwere Kette an. Im Inneren des Phagenpartikels befindet sich anstelle der replikatinsdefizienteren Helferphagen-DNA der entsprechende Phagemidvektor pComb3H und somit die genetische Information zu dem auf der Oberfläche präsentierten Fab-Fragment. So entsteht eine *Phage Display Library* mit bis zu 10^8 verschiedenen Fab-Fragmenten.

Nun kann man das Antigen, für welches spezifische Fab-Fragmente gesucht werden, an eine feste Phase koppeln und mit einem Eluat der *phage display library in Kontakt* bringen. Mittels wiederholter Waschschrte können nun unspezifische oder nur schwach bindende Fab-Phagen beseitigt werden. Die spezifischen gebundenen Fab-Phagen werden am Ende z.B. durch Änderung des Milieus wieder eluiert und erneut in *E.coli* transformiert und amplifiziert. Diesen *Biopanning* genannten Vorgang kann man beliebig oft wiederholen und somit hochaffine Fab-Phagen anreichern. Da die Fab-Phagen zugleich die genetische Information der spezifisch selektierten Fab-Fragmente enthalten, kann man diese nun sequenzieren (71).

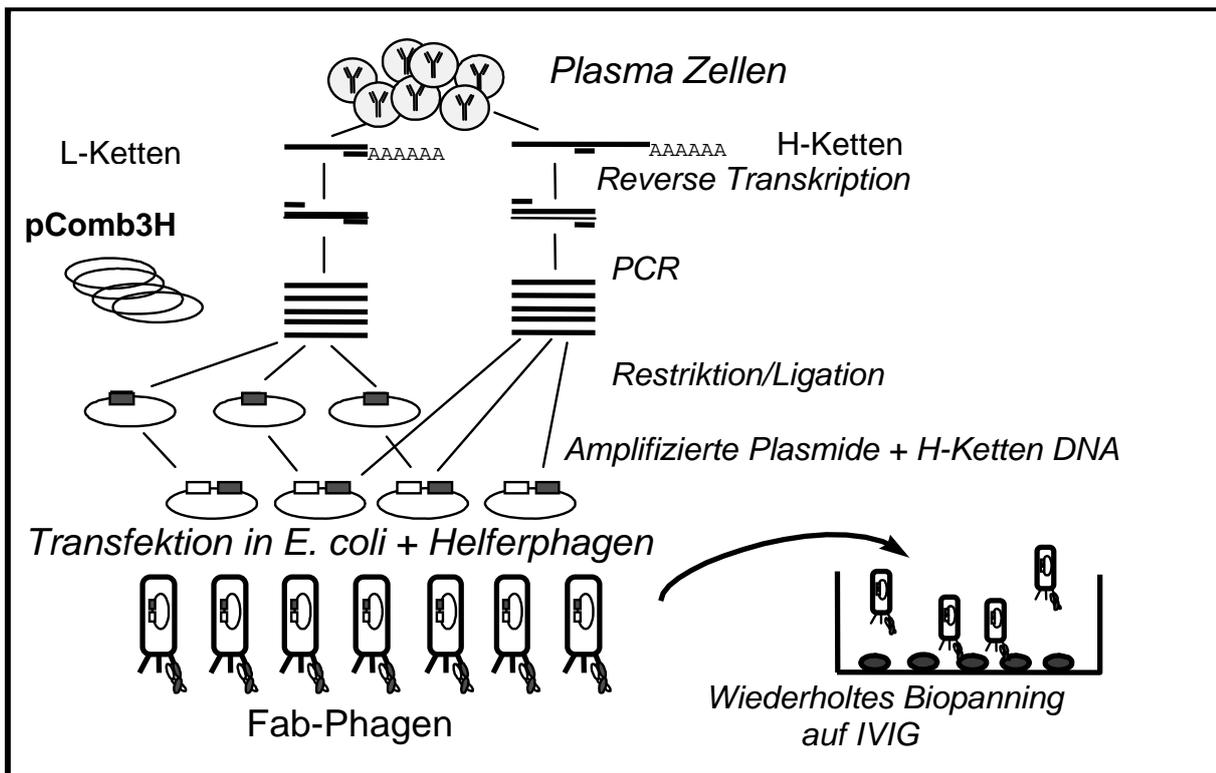


Abbildung 1: Das *Phagen Display* System mit dem Vektor pComb3H
 (modifiziert nach Peter Fischer: Molekulare Charakterisierung humaner Autoantikörper durch kombinatorische Phagen Display-Bibliotheken. Habilitationsschrift 1997. Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin)

Deletiert man mit Hilfe von Restriktionsenzymen das GIII-Fragment aus dem pComb3h-Vektor erhält man nach Transformation in *E.coli* lösliche Fab-Fragmente, welche man für diagnostische oder therapeutische Zwecke verwenden kann.

1.6. Herleitung und Ziele dieser Arbeit

Das Kawasaki-Syndrom ist die häufigste Ursache für erworbene Herzfehler im Kindesalter. Obwohl es bereits 1967 (1) erstmals beschrieben worden ist und seitdem auch intensiv beforscht wurde, bleibt die Ätiologie weiterhin unklar. Die Prävalenz lässt sowohl auf eine genetische Disposition als auch auf eine wahrscheinlich infektiöse Genese schließen (7;4). Ein (oder vielleicht auch mehrere) Erreger konnte jedoch bislang nicht isoliert werden. Die Rolle von Superantigenen bei der Entstehung der Erkrankung wird intensiv diskutiert (8;9;10). Durch die Therapie mit intravenösen Immunglobulinen und Acetylsalicylsäure konnte die Mortalität sowie die Inzidenz von Schäden der Koronargefäße deutlich gesenkt werden (3;5;6).

Die Aufgabe dieser Arbeit war die Erstellung einer *phage display library* einer Patientin mit Kawasaki-Syndrom nach Diagnose der Erkrankung, aber noch vor Behandlung mit IVIG, sowie 2 Monate nach Therapiebeginn als Spiegelbild des Antikörperrepertoires zum jeweiligen Zeitpunkt.

Durch *biopanning* mit IVIG sollen diejenigen Fab-Fragmente der *phage display library* isoliert werden, welche intensiv von IVIG gebunden werden. Anschließend erfolgte die molekulargenetische Charakterisierung der isolierten Fab-Fragmente.

Durch den Vergleich der gewonnenen Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen aus Genbanken (EMBL/Genbank) soll dann eruiert werden, ob die isolierten Fab-Fragmente durch somatische Hypermutation entstanden sind und somit eine Selektion und Stimulation durch spezifische Antigene durchlaufen haben oder direkt von Keimbahngenen abstammen und somit die Vermutung nahelegen, dass sie dem Repertoire der natürlichen Antikörper entstammen und eine fehlerhafte Immunregulation (vielleicht durch Superantigene) zur Stimulation vorher nichtpathogener B-Zell-Klone führte. Weiterhin sollen durch den Vergleich mit Genbanken eventuell vorhandene Homologien der isolierten Fab-Fragmente zu bereits charakterisierten antiepitheialen Autoantikörpern untersucht werden, die Ursache der epithelialen Schädigung der Koronargefäße sein könnten.

Der Vergleich des Repertoires der *phage display libraries* vor und nach Therapie mit IVIG soll Licht in die immunmodulatorische Wirkung der Behandlung mit IVIG bringen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verbrauchsmaterialien

2.1.1. Geräte und Zubehör

Folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden in dieser Arbeit eingesetzt:

Gilson: Pipetten verschiedener Größe

Carl Zeiss: Mikroskop (Jenamed)

IEC: Mikrozentrifugen (Micro Max)

Du Pont: Sorvall RC Plus Zentrifuge

Beckmann: GSR-6 Zentrifuge

Neolab: ELISA-Waschgerät (Vacupette)

Dynatech: ELISA-Reader (MR 5000)

Li-cor: DNA Sequencer Modell 4000

Nunc: Maxisorp I (4-42404), sterile 50ml Zentrifugenröhrchen

Falcon: sterile 15ml Röhrchen, 48-Loch-Platten

Roth: sterile Einmal-Pasteurpipetten

sowie laborübliche pH-Meter, Wasserbäder, Heizplatten, Gefriertruhen, Waagen, Computer, nebst anderen laborüblichen Verbrauchsmaterialien etc.

2.1.2. Reagenzien

Standard-Laborchemikalien wurden mit dem höchstmöglichen Reinigungsgrad von Hoechst, Fluka, Sigma, Merck, Aldrich u.a. bezogen.

Ficoll-Paque

Pharmacia Biotech

TRI REAGENT

Bio Tech Trade & Service GmbH

SuperScript RT

Gibco/BRL

Wizard Plus Miniprep A 7500

Promega

Sequagel CR EC 842 (Fertiglösung)

Biozym

Cycle-Sequencing Ansatz

Amersham

Phosphatgepuffertes Saline (PBS)

8,5 g NaCl

1,28 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,156 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$

pH-Wertes auf 7,4-7,6 mit NaOH einstellen

Super Broth (SB)

60 g Trypton

40 g Hefeextrakt

20 g MOPS

mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen, pH-Wert auf 7,0 mit NaOH einstellen

Sequenzierstopplösung

95 ml Formamid

4 ml 0,5 M EDTA

100 mg Bromphenolblau

50 mg Xylencyanol

S.O.C. Medium

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

in 950 ml Aqua dest.

10 ml 250 mM KCl

pH-Wert auf 7,0 mit NaOH einstellen

2,46 g MgSO_4 (10 mM)

2,05 g MgCl_2

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

nach Autoklavieren Zugabe von 1 M Glukose

TAE-Puffer (50-fach konz.)

242 g Tris (2 M)

57,1 ml Eisessig

19 g EDTA (50 mM)

die 50-fach konzentrierte Stammlösung wurde für den Gebrauch mit Aqua dest. verdünnt

TBE-Puffer (10-fach konz.)

108 g Tris

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

die 10-fach konzentrierte Stammlösung wurde für den Gebrauch mit Aqua dest. verdünnt

TBS

5 ml 1 M Tris (pH 7,5)

3 ml 5 M NaCl

2 ml 1% NaN₃

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

TE-Puffer

1,21 g Tris (10 mM)

0,38 g EDTA (1 mM)

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen, pH-Wert auf 8,0 mit HCl einstellen

2.1.3. Primer

DNA-Primer für das *Phagen Display* von humanen Antikörper-Fab-Fragmenten

HUMAN LIGHT CHAIN PRIMER

LIGHT CHAIN CONSTANT DOMAIN 3

KAPPA: cK1d 5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA (57 mer)

AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G-3'

LAMBDA cL2 5'-CGC CGT CTA GAA TTA TGA ACA TTC TGT AGG-3' (30 mer)

LIGHT CHAIN CONSTANT DOMAIN 5' CONTROL PRIMER

KAPPA: conKa 5'-ACT GTG GCT GCA CCA TCT G-3' (19 mer)

LAMBDA conL1 5'-AAG GCT GCC CCC ACG GTC ACT CTG-3' (24 mer)

KAPPA CHAIN VARIABLE DOMAIN 5' PRIMER

VK1a 5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CCA (24 mer)

VK1s 5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CC-3' (23 mer)

VK2a 5'-GAT ATT GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3' (24 mer)

VK3a 5'-GAA ATT GAG CTC ACG CAG TCT CCA-3' (24 mer)

KK3b 5'-GAA ATT GAG CTC ACG/C CAG TCT CCA-3' (24 mer)

LAMBDA CHAIN VARIABLE DOMAIN 5'PRIMER

VL1 5'-AAT TTT GAG CTC ACT CAG CCC CAG-3' (24 mer)

VL2 5'-TCT GCC GAG CTC CAG CCT GCC TCC GTG-3' (27 mer)

VL3 5'-TCT GTG GAG CTC CAG CCG CCC TCA GTG-3' (27 mer)

VL4 5'-TCT GAA GAG CTC CAG GAC CCT GTT GTG TCT GTG-3' (30 mer)

VL5 5'-CAG TCT GAG CTC ACG CAG CCG CCC-3' (24 mer)

VL6 5'-CAG ACT GAG CTC ACT CAG GAG CCC-3' (24 mer)

VL7 5'-CAG GTT GAG CTC ACT CAA CCG CCC-3' (24 mer)

VL8 5'-CAG GCT GAG CTC ACT CAG CCG TCT TCC-3' (27 mer)

HUMAN HEAVY CHAIN PRIMER

HEAVY CHAIN CONSTANT DOMAIN 3' PRIMER

IgG1: cG1z 5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG-3' (30 mer)

HEAVY CHAIN CONSTANT DOMAIN CONTROL 3'PRIMER

IgG1: conGa: 5'-TCC ACC AAG GGC CCA TCG-3' (18 mer)

HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN 5'PRIMER

VH1a: 5'-CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGG-3' (24 mer)

VH1f: 5'-CAG GTG CAG CTG CTG GAG TCT GGG-3' (24 mer)

VH2f: 5'-CAG GTG CAG CTA CTC GAG TCG GG-3' (23 mer)

VH3a: 5'GAG GTG CAG CTC GAG GAG TCT GGG-3'	(24 mer)
VH3f: 5'-GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'	(24 mer)
VH4f: 5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG-3'	(23 mer)
VH4g: 5'-CAG GTG CAG CTA CTC GAG TGG GG-3'	(23 mer)
VH6a: 5'-CAG GTA CAG CTC GAG CAG TCA GG-3'	(23 mer)

SEQUENCING PRIMER

V _{L/K} 5': OmpA: 5'-AAG ACA GCT ACT GCG ATT GCA G-3'	(22 mer)
V _K 3': SEQLb: 5'-GAA GTC ACT TAT GAG ACA CAC-3'	(21 mer)
V _L 3': SEQKb: 5'-ATA GAA GTT GTT CAG CAG GCA-3'	(21 mer)
V _H 5': PeIB: 5'-ACC TAT TGC CTA CGG CAG CCG-3'	(21 mer)
V _H 3': SEQGb: 5'-GTC GTT GAC CAG GCA GCC CAG-3'	(21 mer)

(alle Primersequenzen nach Barbas und Burton, CSH-Manuel 1993)

2.2. Patientin mit Kawasaki-Syndrom

Die in dieser Arbeit verwendeten EDTA-Blutproben stammen von einer 2 2/12 Jahre alten Patientin. Bei Aufnahme in die Klinik berichtet die Mutter über seit 4 Tagen bestehendes Fieber zwischen 39°C und 40°C sowie über eine seit 3 Tagen bestehende zervikale Schwellung rechts. Ambulant wurde bei Verdacht auf Lymphadenitis colli mit einer antibiotischen Therapie begonnen, wobei keine Beschwerdebesserung eintrat. Bei der körperlichen Untersuchung ergaben sich ein stammbetontes, vor allem randgerötetes und dort leicht erhabenes Exanthem mit zentraler Aufhellung, ein leichter Ikterus der Haut, eine Rötung der Hand- und Fußflächen, eine beidseits deutliche konjunktivale Gefäßinjektion, gerötete, glänzende Lippen bei stark gerötetem Rachenring und mehreren kleinen Aphten im Bereich der Mundschleimhaut sowie rechts zervikal mehrere tastbar vergrößerte Lymphknoten bis 1,5 cm. Die Herzgeräusche waren rhythmisch und normfrequent bei 2/6 Systolikum, die Auskultation der Lunge unauffällig, das Abdomen weich und ohne Druckschmerz und die orientierende neurologische Untersuchung ohne pathologischen Befund. Die Laborwerte ergaben eine Erhöhung der unspezifischen Entzündungsparameter. Eine Lymphozytendifferenzierung hinsichtlich des V β -Repertoires ergab ein V β 2-Anteil von 9%. Unter hochgradigem Verdacht auf ein Kawasaki-Syndrom wurde am 7.Tag nach Fieberbeginn mit einer i.v. Immunglobulingabe (2g/kg Körpergewicht) und einer

Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) in einer Dosierung von zunächst 80 mg/kg Körpergewicht begonnen. Darunter kam es innerhalb von 24 h zu einer Entfieberung. Die Konjunktivitis und das Exanthem waren nach ungefähr 4 Tagen rückläufig. Am 11.Tag nach Therapiebeginn begann eine deutliche Hautschuppung aller Fingerringen. Nach Spiegelkontrolle wurde die ASS-Gabe im Verlauf auf eine Dosierung von 120 mg/kg Körpergewicht pro Tag gesteigert und damit in den gewünschten therapeutischen Bereich von 150 - 300 mg/l gebracht. Am 15.Tag nach Therapiebeginn konnte das Kind in eine ambulante Kontrolle entlassen werden. Echokardiographisch war während des gesamten stationären Aufenthaltes ein geringer hämodynamisch unbedeutender Perikarderguss nachweisbar, welcher in der nachstationären Kontrolle schnell verschwand. Veränderungen an den Koronararterien waren zu keiner Zeit nachweisbar. Die echokardiographischen Kontrolluntersuchungen wurden ein Jahr nach Genesung beendet.

Die EDTA-Blutprobe zur Erstellung der ersten Phagedisplay-Library (M1) wurde kurz vor Beginn der IVIG-Gabe am 7.Tag nach Fieberbeginn abgenommen. Die zweite EDTA-Blutprobe zur Erstellung der zweiten Phagedisplay-Library (M2) wurde 2 Monate nach Therapiebeginn gewonnen.

2.3. Phagen Display und Analyse humaner Fab-Fragmente

2.3.1. Probengewinnung, Reverse Transkription und PCR

Alle Arbeitsschritte orientieren sich an dem CSH-Manuel von Carlos Barbas und Dennis Burton, The Scripps Research Institute (59) und der Habilitationsschrift von PD Dr. Peter Fischer (71). Die Mengenangaben für Reagenzien bei der Erstellung der *Phage Display Libraries* M1 und M2, so sie sich unterscheiden, sind in der Reihenfolge M1 (M2) angeordnet.

Lymphozytenpräparation

5(7) ml frisch entnommenes, venöses Blut wurden in der Sterilbank mit 5(7) ml PBS verdünnt. Diese 10(2x7) ml verdünntes Blut wurden nun vorsichtig in ein(zwei) 50-ml-Zentrifugenröhrchen (Nunc) mit 9 ml Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) geschichtet, ohne dass sich die beiden Phasen vermischten. Nach 30 min. Zentrifugieren mit 1500 rpm (400xg) in einer Beckmann GS-R6 im Swingout-Rotor bei Raumtemperatur und ohne Bremse wurde die obere, klare Plasmaphase vorsichtig mit einer Einmal-Pasteurpipette abgesaugt und bei -80°C

eingefroren. Die weiße Interphase mit Lymphozyten wurde anschließend vorsichtig und möglichst vollständig mittels einer Einmal-Pasteurpipette in ein neues 50-ml-Röhrchen transferiert. Zum Waschen der Lymphozyten wurde das Röhrchen mit der Interphase mit 20 ml PBS aufgefüllt, 10 min. mit Bremse bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, wobei vor dem Zentrifugieren 100 µl der Probe zur Ermittlung der Lymphozytenzahl entnommen wurden. Das gewonnene Zellpellet wurde auf Eis gestellt und sofort zur RNA-Isolierung verwendet.

m-RNA-Isolierung aus Lymphozyten

In der Sterilbank wurde das Zellpellet mit TRI-Reagent (Molecular Research Center, INC.) durch mehrmaliges Ein- und Auspipettieren gelöst, wobei für $5-10 \times 10^6$ Zellen je 1 ml TRI-Reagent verwendet wurde. Anschließend wurden die gelösten Zellen zu je 1 ml auf die entsprechende Anzahl an 2-ml-Eppendorfröhrchen verteilt und 5 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nun wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben gevortext. Nach weiteren 5 min. bei Zimmertemperatur wurden die Proben 15 min. mit 12000 rpm zentrifugiert. Von den nun entstandenen 3 Phasen wurde die obere, klare Phase mit RNA vorsichtig abpipettiert, ohne die Interphase mit DNA zu berühren, und in einem neuen 2-ml-Eppendorfröhrchen mit 500 µl Isopropanol vermischt und 10 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Zur Präzipitation der RNA wurde 10 min. bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Pellets wurden in je 1 ml 75% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, vom Ethanol befreit und in je 50 µl TE-Puffer gelöst. Je 5 µl der isolierten RNA wurden mit Gelpuffer vermischt und in einem 1% Agarosegel auf das Vorhandensein der 18S- und 28S-Banden untersucht. Wollte man die RNA nicht alsbald weiterverwenden, erwies es sich als günstig, die RNA-Pellets in 75% Ethanol bei -80°C einzufrieren.

Reverse Transkription

In der Sterilbank wurden nun je 10 µl RNA mit 2 µl der *Primer* für die konstante Region der schweren und leichten Ketten cG1z, cK1d oder cL2 und 8 µl Aqua bidest. 10 min. auf 70°C erhitzt und anschließend 5 min. auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 7 µl Aqua bidest., 10 µl 5xReverse Transkriptase Puffer (Gibco, BRL), 5 µl DTT (Gibco, BRL), 2 µl RNase-Inhibitor (Promega), 3 µl dNTP-Mix (Pharmacia), 3 µl Superscript Reverse Transkriptase (Gibco, BRL) wurden die Ansätze 1,5 h bei 42°C und danach 5 min. bei 90°C inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren und Kühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 µl RNase H (Promega) und eine

30-minütige Inkubation bei 37°C. Die cDNA-Lösungen wurden zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR wurde, um unbedingt Kontaminationen zu vermeiden, in einer speziellen Sterilbank mit extra Pipetten mit Aerosoltips und extra Handschuhen gearbeitet.

Folgender Reaktionsansatz pro Primerpaar (insgesamt > 31 incl. Kontrollen) wurde in 0,5 ml Eppendorfröhrchen zusammengegeben: 75,2 µl Aqua bidest., 10 µl 10xPCR-Puffer, 5 µl 1,25 mM MgCl₂-Puffer, 0,8 µl dNTP-Mix (je 200 µM Endkonzentration), 3 µl cG /K/L-3'-Primer, 3 µl VH/K/L-5'- bzw. Kontroll-Primer (je 20 µM, s. Tabelle), 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U), 1 Tropfen Mineralöl und 2 µl der jeweiligen cDNA-Lösung, ausgenommen der negativen Kontrollen. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Folgende Zyklen haben sich mit dem MWG-Gerät für die PCR bewährt: 1x[94°C 3 min.], 40x[93°C 30 sec.; 52°C 1 min.; 72°C 1 min.], 1x[72°C 10 min.]. Nach dem Abkühlen des Gerätes auf Zimmertemperatur wurden die Proben kurz zentrifugiert und je 1/10 der Probe in einem 2% Agarosegel mittels einer Markersubstanz (Φx) analysiert. Die PCR-Produkte sollten eine Größe von ca. 680 bp, die der positiven Kontrollen eine Größe von 330 bp besitzen. In den negativen Kontrolle sollte keinerlei DNA amplifiziert sein. Je nach Ausbeute der Proben wurden einzelne Ansätze wiederholt und Temperaturen bzw. Zykluslängen optimiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte für die leichte und schwere Kette getrennt gepoolt und mit Phenol-Chloroform extrahiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Zu den gepoolten PCR-Produkten wurde in gleicher Menge Phenol-Chloroform hinzugegeben, alles gevortext und 5 min. bei 12500 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfröhrchen transferiert. Nach Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natrium-Acetatpuffer (pH 5,2), 1 µl Glykogen (Boehringer Mannheim) und 2,5 Vol. 100% eiskaltes Ethanol folgte eine Präzipitation bei -20°C für mindestens 30 min. Nach 15 min. Zentrifugieren wurden die DNA-Präzipitate mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert.

Reinigung der PCR-Fragmente

Die PCR-Fragmente und der Marker Φx wurden in einem 2% Agarosegel bei 200 V für ca. 1 h aufgetrennt. Nach dem Herausschneiden der 680 bp-Bande mit einem sterilen Skalpell unter möglichst kurzer UV-Belichtung wurde die DNA mit Hilfe von QIAquick-Säulen (Qiagen) nach

Angaben des Herstellers aus dem Gel gereinigt. Die PCR-Fragmente wurden anschließend in 50 µl Aqua bidest. eluiert und bei -20°C gelagert.

Enzymatische Doppelrestriktion der PCR-Fragmente

Die Restriktion erfolgte mit mindestens 1,5-fachem Überschuss der errechneten Enzymkonzentration und bei dreistündiger Inkubation bei 37°C. Die errechnete Enzymkonzentration für das Schneiden der Fd-Fragmente betrug: 112 U XhoI/µg DNA, 27 U SpeI/µg DNA, Inkubation mit Puffer H. Für die Lc-Fragmente: 112 U XbaI/µg DNA, 57 U SacI/µg DNA, Inkubation mit Puffer A (Enzyme und Puffer: Boehringer Mannheim). Das Reaktionsvolumen betrug jeweils das Zehnfache des Enzymvolumens. Die gesamten PCR-Produkte wurden geschnitten, erneut mit Phenol-Chloroform extrahiert und in 1% Agarosegel aufgereinigt.

2.3.2. Klonierung in pComb3H

Herstellung elektrokompenter E.coli XL1-Blue

10 ml Superbroth (SB) mit 10 µg Tetracyclin (Tet) zur Selektion des F-Episoms wurden mit Zellen eines eingefrorenen Stockes E.coli XL1-Blue angeimpft und als Übernachtskultur (ÜNK) bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der ÜNK in 200 ml auf 37°C vorgewärmtes SB/Tet überführt und ca 3 h bis zum Erreichen einer Extinktion von 0,8-1,2 (600 nm) bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach 20 min. Eiskühlung wurden die Zellen in vier 50 ml-Röhrchen aufgeteilt und bei 3000 g und 4°C 15 min. zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in je 50 ml eiskaltem Aqua bidest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde nochmals mit 25 ml Aqua bidest wiederholt. Die sedimentierten Zellen wurden pro Röhrchen in je 1 ml eiskaltem 10% Glycerol gelöst, in 200 µl Portionen aliquotiert und in Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Elektrotransformation von E.coli:

200 µl elektrokompente Zellen wurden aufgetaut und sofort zur Plasmid-DNA (max. 10 µl) gegeben, kurz gemischt und in 2-ml-Biorad-Küvetten transferiert. Die Elektrotransformation erfolgte mit 25 µF, 2500 V, *Pulse-Controller* 200 Ohm, Feldstärke 12,5 kV/cm. Anschließend wurden die elektrotransformierten Zellen sofort mit 3 ml vorgekühltem S.O.C.-Medium vermischt und bei 37°C und 200 rpm für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml vorgewärmten SB-Medium mit 10 µg/ml Tet und 20 µg/ml Carbenicillin (Carb) wurde die

Transformationseffizienz durch Ausplatten von 0,1 µl, 1 µl und 50 µl auf Carb-haltigen LB-Platten (100 µg/ml) bestimmt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurde die Probe mit 100 ml SB/Carb verdünnt und über Nacht bei 37°C weiterinkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen auf 2 50-ml-Röhrchen verteilt und 15 min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Aus den Zellpellets wurde mittels Qiagen-Midi-Prep die Plasmid-DNA isoliert und in TE-Puffer gelöst.

Ligation von pComb3H und Lc-Insert:

2,5 µg pComb3H-DNA wurden, nach Restriktion mit SacI/XbaI (7,8 U/µgDNA respektive 16 U/µgDNA, Puffer A) und gelelektrophoretischer Trennung vom *Stuffer*-Fragment, mit 1 µg der doppelrestringierten Lc-PCR-Fragmente somit im Verhältnis 1:2,5 ligiert. Der Ansatz bestand aus 10 µl Ligase (Boehringer Mannheim), 15 µl 10xLigationspuffer, der gelösten DNA und wurde mit Aqua bidest. auf 150 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz folgte eine Phenol-Chloroformextraktion. Anschließend wurden die Ligationsprodukte in 10 µl Aqua bidest. resuspendiert und wie oben in elektrokompetente E.coli XL1-blue transformiert. Am nächsten Tag wurde mittels Qiagen-Midi-Prep pComb3H-Lc-DANN gewonnen und in 200 µl TE-Puffer gelöst und analysiert.

Analyse der pComb3H-Lc-Library

Von den Platten zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden Einzelklone gepickt und über Nacht in 2 ml SB-Medium mit Carbenicillin bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die ÜNK in 2-ml-Eppendorfröhrchen überführt und bei 12500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Mit einer Phenol-Chloroformextraktion mit zusätzlichem RNase-Verdau (2µl Rnase A) wurde die DNA der Einzelklone aufgereinigt, mit SacI und XbaI geschnitten und anschließend sowohl geschnitten als auch ungeschnitten auf einem 2 %Agarosegel analysiert. Weiterhin wurde auch die pComb3H-Lc-DNA insgesamt mit SacI und XbaI geschnitten und auf einem 1 %Agarosegel analysiert.

Ligation von pComb3H-Lc und Fd-Insert

20 µg der pComb3H-Lc-DNA wurden mit XhoI/SpeI (17,2 U/µgDNA bzw. 2,5 U/µgDNA, Puffer H) 2 h bei 37°C restringiert und vom *Stuffer*-Fragment in einem 1 %Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Danach erfolgte die Ligation von 2,5 µg pComb3H-Lc mit 1 µg Fd-

PCR-Produkten, welche vorher ebenfalls mit XhoI/SpeI restringiert wurden. Der Ligationsansatz bestand aus 10 µl Ligase, 20 µl 10xLigationspuffer und der DNA. Der Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf 200 µl aufgefüllt, über Nacht bei 16°C ligiert und anschließend elektrotransformiert (s.o.).

Produktion der Fab-Phagen

Die mit pComb3H-Lc-Fd transformierten Zellen wurden zunächst wie beschrieben in S.O.C.-Medium und anschließend in 10 und 100 ml SB/Carb kultiviert. Nach 1 h Wachstum der 113 ml-Kultur erfolgte die Zugabe von $1,3 \times 10^{11}$ bis 1×10^{12} pfu VCSM13-Helferphagen (Stratagene). Nach weiteren 2 h Wachstum wurden 70 µg/ml Kanamycin (Kan) zur Selektion der E.coli XL1-blue, die mit Helferphagen infiziert wurden, hinzugegeben. Die ÜNK wurde am nächsten Morgen abzentrifugiert. Aus dem Zellpellet konnte die pComb3H-Lc-Fd-DNA gewonnen werden. Aus dem Überstand wurden mit 3 g NaCl und 4 g PEG die Fab-Phagen präzipitiert, 20 min. auf Eis inkubiert und anschließend mit 12000 xg bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Phagenpellet wurden in 2 ml TBS mit 1% BSA und 0,2% NaN₃ resuspendiert und durch Zentrifugation (6000 rpm, 5 min.) von den restlichen Bakterien geklärt. Die Fab-Phagen wurden kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C aufbewahrt.

Analyse der Bibliothek

Auch hier wurden wieder Einzelklone in ÜNK kultiviert und durch Restriktion mit SacI/XbaI sowie SpeI/XhoI auf das Vorhandensein beider Inserts überprüft. Gleiches geschah mit der Gesamt-DNA der pComb3H-Lc-Fd-Library. Zur Bestimmung der Diversität der Library wurde die DNA der Einzelklone noch mit der Endonuklease BST N1 (New England Biolabs) geschnitten und die Bandenmuster im Agarosegel verglichen. Zusätzlich wurde die Größe der Library an Hand der Transformationseffizienz bestimmt.

Optimierung der Bibliothek

Wollte man nach längerer Zeit erneut Fab-Phagen aus der pComb3H-Lc-Fd-DNA züchten, erwies es sich als günstig, die DNA vorher in einem 1 %Agarosegel aufzureinigen und von den Banden zu trennen, die nur ein oder gar kein Insert enthielten.

2.3.3. Isolierung spezifischer Fab-Phagen

Panning der Fab-Phagen auf Immunglobuline

Vier Maxisorb-Röhrchen (Nunc) wurden mit 300 µl IVIG (Sandoglobulin®, 30 µg/ml in PBS) über Nacht beschichtet. Für jeden Panning-Schritt wurde ein Röhrchen mit 2 ml PBS/1% Casein für 30 min. bei 30°C geblockt und anschließend mit 2 ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS abgesaugt worden war, wurden 300 µl Fab-Phagen (zwischen 10^{10} und 10^{13} Phagen) hinzugegeben und für 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Um die ungebundenen Phagen zu entfernen, wurde das Röhrchen mit 1 ml PBS/1%Casein gevortext, 5 min. stehen gelassen und nochmals gevortext. Dieser Waschschrift wurde bei Panning-Schritt I einmal wiederholt, bei Panning-Schritt II-IV zehnmal, wobei hier beim Waschen nur 2 min. gewartet wurde.

Elution der Fab-Phagen:

Die gebundenen Phagen wurden mit 300 µl 0,1 M HCL/Glycin (pH 2,2) unter mehrmaligem Vortexen eluiert, sofort mit 60 µl 2 M Tris-Puffer (pH 9,0) neutralisiert und in 3 ml E.coli XL1-Blue-Kultur in SB/Tet pipettiert. Nach 20 min. Inkubation bei 37°C und 200 rpm erfolgte die Zugabe von 10 ml SB/Carb mit 100 µl 1 M MgCl₂. Zur *Output*-Titerbestimmung wurden 0,1 µl, 1 µl und 50 µl der Kultur auf LB/Carb-Platten ausgeplattet. Aus der Kultur wurden neue Fab-Phagen für den nächsten Panning-Schritt gezüchtet sowie die Gesamt-DNA gewonnen (s.o.).

Effizienz des Pannings

Die Panning-Prozedur wurde im Allgemeinen 4-mal wiederholt. Eine Anreicherung spezifisch gebundener Fab-Phagen ließ sich durch die Zunahme der eluierten Phagen (*Output*-Titer) ab dem 2. Panning-Schritt erkennen. Weiterhin wurde der Titer der jeweils eingesetzten Fab-Phagen (*Input*) durch Ausplatten von 10^{-7} - 10^{-11} -Verdünnungen bestimmt, so dass das Verhältnis von zugegebenen zu gebundenen Phagen bestimmt werden konnte.

Züchten von Einzelkolonien des letzten Panning-Schrittes

In jedes Loch einer 48-Lochplatte wurden 300 µl SB mit Carbenicillin und MgCl₂ (Ansatz: 50 ml SB + 25 µl Carbenicillin + 25 µl 1 M MgCl₂) pipettiert und mit Einzelklonen des Outputs des letzten Panning-Schrittes angeimpft (Negativkontrollen mit pComb3H transformiertem E.coli und SB). Im gleichen Arbeitsgang wurde eine Stamm-Agarplatte mit allen Einzelklonen und den

Negativkontrollen angelegt. Die 48-Loch-Platte wurde abgedeckt, mit Klebeband versiegelt und 5 h bei 37 °C bei 220 rpm geschüttelt. Anschließend wurden in jedes Loch 50 µl VCSM-13-Helferphagen gegeben, eine weitere Stunde inkubiert und noch 50 µl Kan hinzugefügt. Nun wurde die Platte über Nacht bei 37°C bei 220 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Fab-Phagen durch Zentrifugieren bei 2000 rpm von den E.coli getrennt und zur weiteren Charakterisierung in eine mit PBS/1%Casein geblockte 96-Loch-Platte transferiert. Die Zellpellets wurden zur DNA-Präparation aufbewahrt.

2.3.4. Charakterisierung spezifischer Fab-Phagen

Sandwich-ELISA auf IVIG, PBS und α -M13:

Eine Mikrotiter-Platte (Maxisorb, Nunc) wurde mit je 50µl IVIG, α -M13 (alle Antigene in einer Konzentration von 600 ng pro Loch) und PBS über Nacht beschichtet. Nach einmaligem Waschen mit 0,2%Casein/PBS wurden die Platten mit 1%Casein/PBS bei 37°C für 1h geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 50 µl (bei α -M13 je 5 µl) der Einzelkolonie-Phagen hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten mit pComb3H transformierte E. coli, SB-Medium mit Helferphagen und ein positiver Klon aus einer anderen Bibliothek. Nicht gebundene Phagen wurden durch dreimaliges Waschen entfernt, gebundene durch die Zugabe eines Peroxidase-markierten α -M13-Antikörpers (in einer Verdünnung von 1:3000, Pharmacia) nachgewiesen. Die Farbentwicklung erfolgte durch TMB (Tetramethylbenzidin, Fa. Kirkegard und Perry) und wurde mit 1M H₃PO₄ gestoppt. Die Absorption der Farbreaktion wurde im ELISA-Gerät bei 450 nm (Referenz 650 nm) gemessen. Durch die Absorptions-Bestimmung auf α -M13 konnte der Phagentiter und auf PBS die unspezifische Reaktion der Phagen bestimmt werden. Die aufbewahrte DNA (s.o.) der positiv reagierenden Einzelklone wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme auf das Vorhandensein beider Inserts untersucht.

2.3.5. Sequenzanalyse

Cycle-Sequencing der Immunglobulin-DNA:

Die im ELISA positiven Klone wurden aus den Einzelkolonien der Stamm-Agarplatte in einer ÜNK erneut gezüchtet und die DNA mit Promega Wizard Plus Miniprep A 7500-Kit oder

QIAGEN-Miniprep-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Sequenzierung erfolgte in einem automatischen Sequenzierer (LICOR/MWG, Biotech) mit fluoreszenzmarkierten Primern, basierend auf der Methode nach Sanger.

Gelherstellung

Die Glasplatten wurden mit 99% Ethanol sorgfältig gereinigt und unter Verwendung von 0,25-mm-Abstandshaltern zusammengebaut. 10 ml Sequagel Complete, 40 ml Sequagel XR (Biozym) und 0,4 ml 10% Ammonium-Persulfat wurden vermischt und mit einer Spritzflasche unter Vermeidung von Luftblasen zwischen die Platten gegossen. Nach zwei Stunden war das Gel polymerisiert und die Proben konnten aufgetragen werden.

Cycle Sequencing Ansatz

0,5-5 µg Fab-Phagen-DNA (ca. 5 µl der mit Promega Wizard Plus Miniprep A 7500 gereinigten DNA) wurden mit 2 pmol IRD-Primer (1µl) und 15 µl Aqua bidest. vermischt und kurz zentrifugiert. Die Primer sowie Proben mit Primern wurden stets dunkel gehalten. In 0,5-ml-Eppendorfröhrchen wurden je 2 µl der Nukleotide A,C,G,T vorgelegt und mit je 5 µl des Primer/DNA-Ansatzes gemischt, durch Zugabe von einem Tropfen Mineralöl versiegelt und kurz zentrifugiert.

Cycle Sequencing

Für das Cycle Sequencing verwendete ich folgendes Programm: 1x[95°C, 2 min.], 30x[95°C, 30 sec.; 62/42°C, 15 sec. (Annealing); 70°C, 15 sec.]. Die Annealing-Temperatur musste je nach Primer (SeqGb/Mb, PelB, OmpA: 62°C; SeqLB/Kb: 42°C) im Thermocyclerprogramm verändert werden. Die Reaktion wurde mit 3 µl Sequenzierstoplösung beendet und die DNA für 3 min. bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis gelagert und bis zum Auftragen dunkel gehalten. Pro Bahn wurde je 1,5 µl der Probe aufgetragen. Als Pufferlösung verwendete ich TBE.

Automatischer Lauf und Auswertung im LICOR/MWG Biotech Sequencer:

Lauf und Auswertung erfolgten entsprechend der Herstellerangaben und bei folgenden Parametern: Voltage 1500Volt, Current 35A, Power 31,5W, Heater 50°C, Frames 25. Von allen Proben wurde neben der Sequenz auch das scf-file für die manuelle Kontrolle der Sequenz gespeichert. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit Mac-DNAsis. Alle Sequenzen wurden

sowohl vom 3'- als auch vom 5'-Ende sequenziert. Die Klone wurden auf Beginn und Ende der Antikörpersequenzen untersucht.

IgG V _H Beginn (pelB)	atg gcc GAG GTG CAG CTG CTC GAG
IgG V _H Ende (pelB)	TCC TCA gcc/t tcc acc aag ggc cca
V _κ Beginn (ompA)	gcg gcc GAG CTC ACT
V _κ Ende-C _κ (ompA)	ATC AAA cga act gtg gct gca cca
V _λ Beginn (ompA)	gcg gcc GAG CTC...CAG CCT
V _λ Ende-C _λ (ompA)	CTA GGT cag ccc aag gct gcc ccc

Ab Beginn der Großbuchstaben wurden die Sequenzen zum Analysieren abgespeichert. Schlecht auswertbare Sequenzen wurden mit neu präparierter DNA wiederholt sequenziert und zusätzlich manuell ausgewertet.

Analyse der Sequenzen

Mit dem Programm Mac-DNA_{sis} wurden Homologie-Vergleiche der einzelnen Klone über das Internet mit Sequenzen der EMBL/Bank mit dem Programm BLAST_n durchgeführt. Die Suche nach den zugehörigen Keimbahnsequenzen erfolgte ebenfalls über das Internet mit dem Programm DNA-Plot (entwickelt von W. Müller und H.-H. Althaus, Universität Köln) in V-Base (72). Um verschiedene Klone in unserem Labor und aus anderen Studien zu vergleichen, wurde die CDR- und *Framework Region*- Definition von Kabat benutzt, weiterhin die V-BASE Nomenklatur. In Anlehnung an frühere Studien wurde zur Berechnung von Mutationsraten die volle Länge der V-Keimbahngene verwendet (73). Zur Bestimmung der Mutationsraten wurden die Gen-Anfangssequenzen, die durch pComb3H und den PCR-Primer kodiert waren, nicht in die Berechnung aufgenommen. Eine Zuordnung der D-Gene war nicht immer möglich, da Homologien häufig weniger als sechs Basen umfassten. Weiterhin wurden mit Mac-DNA_{sis} Homologievergleiche der Einzelklone untereinander und mit weiteren Klonen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Bezeichnung der Klone

z. B. m1hie18, m2loe06

m: Patienteninitial

l: 1 für Bibliothek vor IVIG-Therapie, 2 für Bibliothek nach IVIG-Therapie

h: h für schwere Kette, l für leichte Kette

i: i für Klone nach IVIG-Panning, o für Klone aus der ungepannten Bibliothek

e: für Einzelklon

18: Nummer des Klons

3. ERGEBNISSE

3.1. Gewinnung der RNA aus PBL

Aus 5 ml EDTA-Blut der Probe vor IVIG-Therapie konnten mittels Ficoll-Paque $2,3 \times 10^6$ Zellen gewonnen werden, aus denen mit Hilfe von Trizol-Reagent $2 \times 50 \mu\text{l}$ RNA isoliert wurden. Aus 7 ml EDTA-Blut der Probe 2 Monate nach IVIG-Therapie konnten $3,9 \times 10^6$ Zellen und somit $4 \times 50 \mu\text{l}$ RNA isoliert werden. Alle verwendeten RNA-Proben wurden in einem Agarosegel auf das Vorhandensein der 28S und 18S-Bande und auf Verunreinigungen hin überprüft und zeigten sehr gute Qualität und Quantität.

3.2. Amplifikation des Antikörpergenrepertoires

Mit den jeweiligen Primern für die konstante Region wurde die mRNA der schweren und leichten Antikörperketten in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR und den entsprechenden Primerpaaren für die konstante und variable Region amplifiziert. Um eine möglichst hohe Variabilität in den Antikörperbibliotheken zu erreichen, wurden hierbei 25 verschiedene Primer für die variablen Regionen und eine niedrig gewählte Annealingtemperatur benutzt. In der Gelanalyse der PCR-Produkte zeigte sich eine unterschiedlich starke Amplifizierung der verschiedenen Immunglobulinfamilien, die die unterschiedlich starke natürliche Expression widerspiegeln könnte. Weiterhin fielen neben den 680 bp-Banden der Antikörper-DNA größere und kleinere Banden auf, die unspezifische PCR-Produkte infolge der niedrig gewählten Annealingtemperatur darstellen. Um die unspezifischen PCR-Produkte wieder zu entfernen, wurden die gepoolten schweren und leichten Ketten vor der Restriktion nochmals im Agarosegel aufgereinigt. Bei jeder PCR-Reaktion wurde ein Negativkontrolle ohne DNA und eine Positivkontrolle mit einem Primerpaar, das nur die konstante Region erschloß (cG1z/conGa, Ck1d/conK, cL2/conL1), durchgeführt.

3.3. Charakterisierung der beiden Bibliotheken

Nach der Elektrotransformation von pComb3H-Lc-Fd in E.coli wurde durch Ausplatten die Größe der Bibliotheken abgeschätzt. Hierbei ergab sich für die M1-Bibliothek eine Größe von $1,3 \times 10^7$ und für die M2-Bibliothek eine Größe von 6×10^7 unabhängig voneinander transfizierter Zellen. Weiterhin wurden von den Platten zur Ermittlung der Größe zehn zufällig gepickte Einzelklone mittels Restriktionsenzymen auf das Vorhandensein beider Inserts überprüft. Hier ergab sich für beide Bibliotheken, daß 9/10 Klonen beide Inserts enthalten. Zusätzlich wurden die zehn zufällig ausgewählten Einzelklone pro Bibliothek mit dem Enzym BST N1 auf ihre Diversität untersucht, wobei alle ein unterschiedliches Restriktionsmuster zeigten.

Organisationsbedingt begann ich mit dem Panning auf IVIG erst 6 Monate nach Erstellung der Bibliotheken. Dabei erwies es sich als günstig, die pComb3H-Lc-Fd-DNA in einem 1 %Agarosegel aufzureinigen und von den Banden zu trennen, die nur ein oder gar kein Insert enthielten, und erneut Fab-Phagen zu züchten, da diese nur begrenzt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerbar sind.

3.4. Panning der Bibliotheken auf IVIG

Bei jedem Panning-Schritt wurde vorher das Input und nachher das Output ermittelt und ins Verhältnis gesetzt. In beiden Panning-Prozeduren zeigte sich ein deutlicher Abfall des Outputs nach Panning-Schritt II, der durch die Erhöhung der Anzahl der Waschschrte ab dem 2. Panning-Schritt von zwei auf zehnmal erklärt werden kann. In den darauffolgenden Panning-Schritten stieg der Output dann wieder an, was auf die Anreicherung spezifisch bindender Fab-Phagen hinweisen könnte.

M1-Bibliothek

Nr.	Input	Output	Prozent
I	$2,4 \times 10^{12}$	$2,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-4}$
II	$2,4 \times 10^{12}$	$3,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-5}$
III	$1,2 \times 10^{12}$	$6,6 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-5}$
IV	$3,6 \times 10^{12}$	$7,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{-4}$

Tabelle 1: Biopanning der M1-Bibliothek auf IVIG

M2-Bibliothek

Nr.	<i>Input</i>	<i>Output</i>	Prozent
I	$6,9 \times 10^{12}$	1×10^6	$1,4 \times 10^{-4}$
II	$2,1 \times 10^{13}$	$3,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-6}$
III	$2,4 \times 10^{12}$	$3,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-4}$
IV	$6,75 \times 10^{11}$	2×10^6	$2,9 \times 10^{-4}$

Tabelle 2: Biopanning der M2-Bibliothek auf IVIG

Nach Abschluss des Pannings wurde die Gesamt-DNA des Outputs aufgereinigt und im Agarosegel mit der Gesamt-DNA der ungepannten Bibliothek verglichen. Hierbei ergab sich kein Anstieg des Anteils der Klone, die nicht über beide Inserts verfügen.

3.5. ELISA der Fab-Phagen

Von der Output-Platte des 4. Panningschrittes wurden Einzelkolonien gepickt und in 48-Lochplatten Fab-Phagen der Einzelkolonien gezüchtet. Weiterhin wurde eine Stamm-Agarplatte der Einzelkolonien angelegt, um die positiv reagierenden Klone später verfügbar zu haben. Die gezüchteten Fab-Phagen wurden im Sandwich-ELISA auf ihre Reaktivität mit IVIG untersucht. Zur Bestimmung der Hintergrundreaktivität wurde PBS verwandt. Die Absorption wurde mit einem Peroxidase-markierten anti-M13-Antikörper (Pharmacia) ermittelt. Eine Verwendung von Fab-Fragmenten im ELISA mit IVIG erwies sich als nicht praktikabel, da die anti-Fab-Antikörper zur Absorptionsbestimmung mit IVIG kreuzreagieren (74). Außerdem wurden auch aus den ungepannten Bibliotheken zufällig ausgewählte Einzelklone auf ihre Reaktivität mit IVIG im ELISA getestet, um nachzuweisen, dass das Panning wirklich zu einer Anreicherung von IVIG-positiven Fab-Phagen führt. Als Negativkontrollen dienten mit pComb3H transformierte E. coli und SB-Medium mit Helferphagen. Die Absorption der Negativkontrollen war $< 0,1$.

A450		<0,1	>0,1	>0,2	>0,3	>0,4	>0,5	>0,6	>0,7	>0,8	>0,9	>1
M1 ungepannt	N=70	64	5			1						
M1 nach Panning	N=66	19	6	8	9	3	1	5	3	2	2	8
M2 ungepannt	N=73	68	4	1								
M2 nach Panning	N=77		3		1	4	8	5	5	4	6	41

Tabelle 3 : ELISA der Einzelklone auf IVIG vor und nach Panning auf IVIG

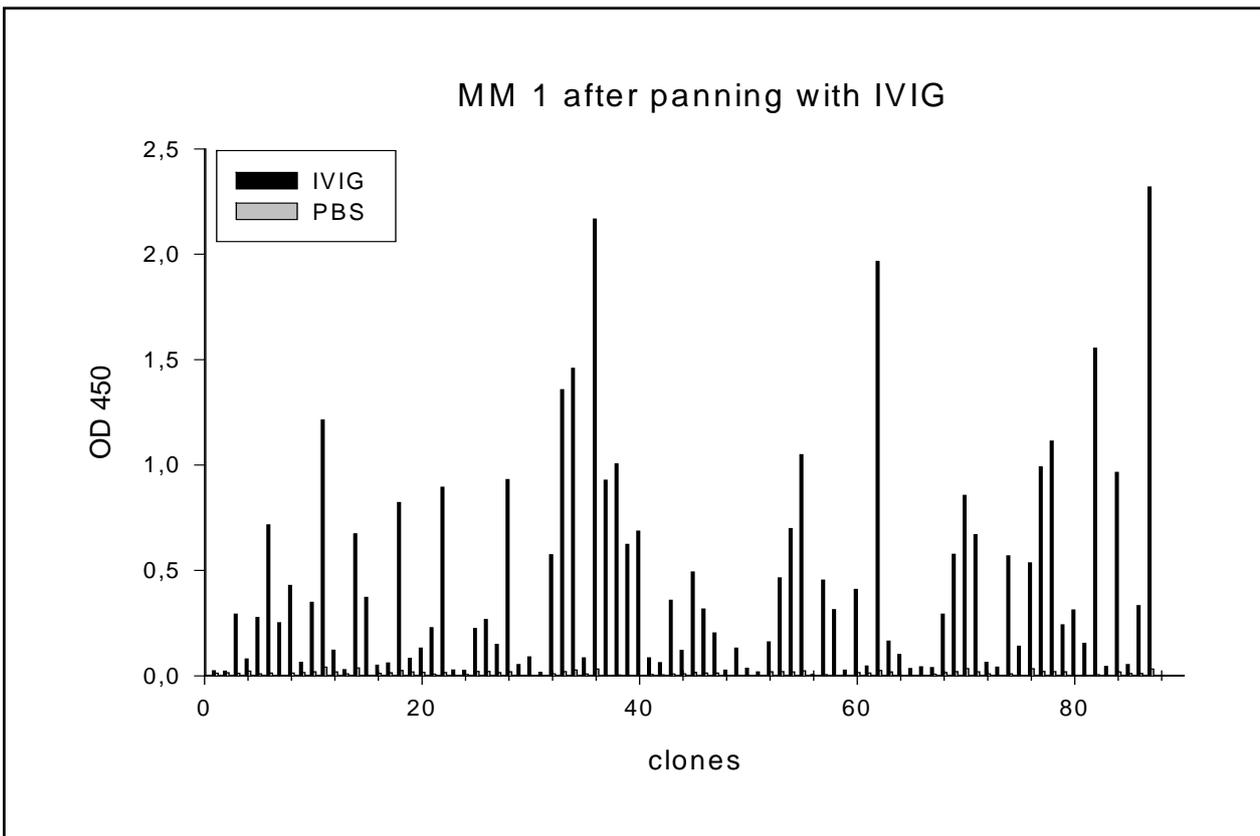


Abbildung 1: ELISA auf IVIG der Einzelklone der Bibliothek M1 nach Panning auf IVIG

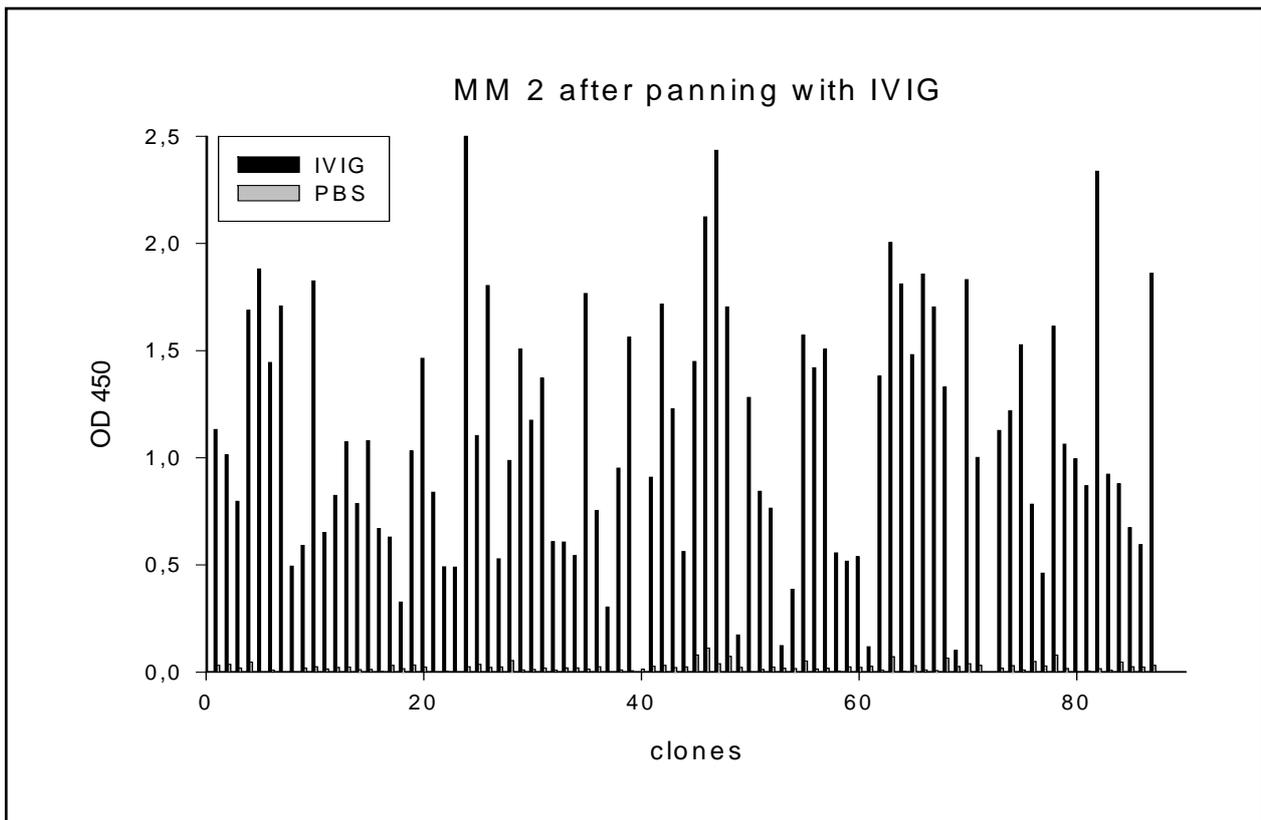


Abbildung 2: ELISA auf IVIG der Einzelklone der Bibliothek M2 nach Panning auf IVIG

Die Tabelle 3 zeigt, dass nur jeweils 1 Klon (1,4%) der ungepannten Bibliotheken eine Absorption A450 > 0,2 zeigte. Nach dem Panning auf IVIG zeigten 50 % der Klone aus der M1-Bibliothek und gar 96 % der Klone aus der M2-Bibliothek eine Absorption A450 > 0,2. Die Reaktivität der Klone der gepannten M2-Bibliothek war hierbei insgesamt deutlich stärker (53 % A450 > 1), als die der Klone aus der gepannten M1-Bibliothek (12% A450 > 1). Somit fand während des Panning eine deutliche Anreicherung von mit IVIG positiv reagierenden Klonen in beiden Bibliotheken statt. Die Hintergrundreaktivität mit PBS war in allen ELISA minimal.

3.6. Sequenzen der IVIG-spezifischen Fab-Phagen

3.6.1. Sequenzen allgemein

Bei der Sequenzierung der auf IVIG positiven Klone stellte sich heraus, dass einige Klone trotz Vorhandenseins der entsprechenden Inserts für leichte und schwere Ketten keine funktionellen

Immunglobulinsequenzen enthielten. Die zugehörigen Proteinsequenzen wiesen in der EMBL-Datenbank Homologien zu anderen humanen Proteinen aus, so dass hier ein Primermismatch bei der cDNA-Umschreibung angenommen werden kann.

Insgesamt wurden die V-Regionen von 32 Klonen sequenziert: 11 positiv auf IVIG reagierende Klone der M1-Bibliothek nach Panning, 10 positiv auf IVIG reagierende Klone der M2-Bibliothek nach Panning sowie jeweils 5 bzw. 6 zufällig ausgewählte Klone aus den ungepannten Bibliotheken. Nur ein Klon (m2.142) kam doppelt vor. Insgesamt 6 Klone (m1.18, m2.10, m2.63, m2.129, m2.134, m2.142) wiesen keine funktionelle leichte Kette vor. Ein Klon (m2.48) hatte eine funktionelle leichte Kette mit einer Frameshift-Mutation nach 220 bp.

3.6.2. Zugehörige Keimbahngene und Mutationsraten

Die Suche nach den zugehörigen Keimbahngensequenzen erfolgte über das Internet mit dem Programm DNA-Plot (entwickelt von W. Müller und H.-H. Althaus, Universität Köln) in V-Base (72). Für die CDR- und *Framework Region* wurde die Definition von Kabat benutzt sowie die V-BASE Nomenklatur. Zur Berechnung von Mutationsraten wurde die volle Länge der V-Keimbahngene verwendet.

M1-Bibliothek vor Panning

Die VH-Segmente entstammten den VH3- und VH4-Familien, wobei nur ein Klon (m1hoe10) dem Locus 3.30 entsprach. Die Homologie der schweren Ketten zu den Keimbahngenen variierte zwischen 89,74% und 99,25%. Die VL-Segmente entstammten zweimal der VL3- und jeweils einmal der VL2-, VL4- und VL10-Familie. Hier variierte die Homologie zwischen 93,25% und 99,24% (sh. Tabelle 4).

Klone	VH/L-Familie	VH/L-Keimbahngen	VH/L-Locus	% Homologie	DH	JH/L
schwere Ketten						
04	4	DP71/3d197d	4-59	99,25	3-10	JH3b
06	4	H4	-	94,32	6-13	JH4b
07	4	DP65/3d75d	4-30.1	89,74	3-03	JH4b
08	3	COS6/DA8	3-74	95,6	2-15	JH6b
10	3	hv3005	3-30	97,78	6-06	JH4b
leichte Ketten						
04	4	4b.68B6/V5-6	4b	97,8		JL2/3a
06	2	2c.118D9/V1-2	2c	97,67		JL3b
07	10	10a.872B9+	10a	99,24		JL2/3a
08	3	3r.9C5	3r	96,43		JL2/3a
10	3	DPL16	3l	93,25		JL2/3a

Tabelle 4: Zuordnung zu Keimbahngen und –lokus der Klone der M1-Bibliothek vor Panning auf IVIG

M2-Bibliothek vor Panning

Hier entstammten die VH-Segmente auch den VH-Familien 3 und 4. Wiederum kam einmal der Locus 3.30 (m2hoe07) vor. Die Homologie der schweren Ketten zu den Keimbahngen lag zwischen 93,04% und 100%. Bei den VL-Segmenten kamen nur die VL-Familien 1 und 3 vor. Hier variierte die Homologie zwischen 95,45% und 99,2% (sh. Tabelle 5).

Klone	VH/L-Familie	VH/L-Keimbahngen	VH/L-Locus	% Homologie	DH	JH/L
schwere Ketten						
01	4	DP63/VH4.21	4-34	100	3-22	JH3b
04	3	V3-49+	3-49	98,55	4-17	JH4b
05	3	DP38/9-1	3-15	97,13	3-22	JH3b
06	3	DP58/hv3d1EG	-	99,63	2-21	JH4b
07	3	DP49/1.9III	3-30	93,04	5-12	JH4b
10	4	DP79/4d154	4-39	97,8	5-24	JH3b
leichte Ketten						
01	3	3r.9C5	3r	96,08		JL2/3a
04	1	DPL7/VL1.2	1e	95,45		JL2/3a
05	1	1c.10.2/DPL2	1c	95,93		JL3b
06	3	3r.9C5	3r	99,2		JL2/3a
07	3	DPL16	3l	98,02		JL2/3a
10	3	DPL16	3l	97,4		JL2/3a

Tabelle 5: Zuordnung zu Keimbahngen und –lokus der Klone der M2-Bibliothek vor Panning auf IVIG

Keimbahngene der IVIG-selektierten Klone

Die schweren Ketten der IVIG-selektierten Klone konnten alle bis auf einen (m2.24) der VH3-Familie zugeordnet werden, wobei der Locus 3.30 mit sieben Klonen am häufigsten vertreten war. Dem folgte der Locus 3.07 mit sechs Klonen und der Locus 3.23 mit 4 Klonen. Der Locus 3.20 war nur einmal vertreten. Weitere Loci kamen nicht vor. Ein Klon (m1.22) konnte keinem Locus zugeordnet werden. Auffällig war hierbei, dass der Locus 3.07 vornehmlich in der M1-Bibliothek nach Panning (5 von 11 Klonen) und der Locus 3.30 vornehmlich in der M2-Bibliothek nach Panning (5 von 9 Klonen) vertreten war (sh. Tabelle 6).

Klone	VH-Familie	VH-Keimbahngen	VH-Locus	% Homologie	DH	JH
schwere Ketten der M1-Bibliothek nach Panning						
6	3	DP54/V3-7	3-07	99,27	6-19	JH4b
11	3	DP47/V3-23	3-23	98,15	1-26	JH4b
18	3	DP54/V3-7	3-07	98,9	6-19	JH4b
22	3	DP58/hv3d1EG	-	96,34	4-11	JH4b
28	3	DP54/V3-7	3-07	98,9	6-19	JH4b
36-IgM	3	DP47/V3-23	3-23	100	2-21	JH1
40	3	DP54/V3-7	3-07	100	6-19	JH4b
45	3	DP54/V3-7	3-07	98,91	6-19	JH4b
57	3	DP49/1.9III	3-30	97,07	2-21	JH6b
74	3	DP49/1.9III	3-30	92,88	7-27	JH3a
77	3	DP47/V3-23	3-23	100	1-26	JH4b
schwere Ketten der M2-Bibliothek nach Panning						
4	3	hv3005	3-30	99,63	-	JH4b
10	3	DP32	3-20	96,67	1-26	JH3b
24	4	DP70/4d68	4-04	99,63	1-20	JH3a
45	3	hv3005	3-30	99,27	-	JH4b
48	3	DP47/V3-23	3-23	99,26	6-19	JH6b
63	3	hv3005	3-30	98,9	-	JH4b
129	3	DP54/V3-7	3-07	99,63	1-26	JH4b
134	3	hv3005	3-30	99,27	-	JH4b
2x 142	3	hv3005	3-30	97,8	2-08	JH3b

Tabelle 6: Zuordnung zu Keimbahngen und –lokus der schweren Ketten der IVIG-selektierten Klone aus beiden Bibliotheken

Die leichten Ketten entstammten den VL-Familien 1 bis 5, wobei in der M1-Bibliothek nach Panning ein Klon (m1.18) und in der M2-Bibliothek nach Panning fünf Klone (m2.10, m2.63, m2.129, m2.134, m2.142) keine funktionelle leichte Kette aufwiesen. Die leichte Kette des Klons m2.48 hatte eine Frameshift-Mutation nach 220 bp (sh. Tabelle 7).

Klone	VL-Familie	VL-Keimbahngen	VL-Locus	% Homologie	JL
leichte Ketten der M1-Bibliothek nach Panning					
6	3	DPL16	3l	97,65	JL2/3a
11	4	4b68B6	4b	99,64	JL3b
22	3	DPL16	3l	98,43	JL2/3a
28	2	2a2.272	2a2	95,4	JL2/3a
36-IgM	5	5c.366F5	5c	99,65	JL2/3a
40	1	1g.400B5	1g	97,07	JL3b
45	3	3r.9C5	3r	99,6	JL2/3a
57	3	DPL16	3l	99,6	JL2/3a
74	5	V4-2+	5c	99,29	JL2/3a
77	1	1c.10.2	1c	98,82	JL3b
leichte Ketten der M2-Bibliothek nach Panning					
4	1	1g.400B5	1g	98,17	JL3b
24	3	DPL16	3l	100	JL2/3a
45	3	3r.9C5	3r	100	JL2/3a
48	2	2a2.272	2a2	220bp	JL2/3a

Tabelle 7: Zuordnung zu Keimbahngen und –lokus der leichten Ketten der IVIG-selektierten Klone aus beiden Bibliotheken

Mutationsraten der IVIG-selektierten Klone

Die Homologie der schweren Ketten zu den Keimbahngen variierte zwischen 92,88% und 100%. Bei den IVIG-selektierten Klonen der M1-Bibliothek waren drei Klone (m1.36, m1.40, m1.77) mit der Keimbahngensequenz identisch. In der CDR 1 und 2 lag noch ein weiterer Klon (m1.11) in der Keimbahngensequenz vor, hatte aber Mutationen in der FR. Drei Klone (m1.22, m1.57, m1.74) hatten in der CDR 1 und 2 ein Verhältnis von Austauschmutation zu stiller Mutation (R/S) größer 2,9, was auf eine Antigen-gerichtete somatische Mutation hindeutet. Die Klone m1.22 und m1.74 hatten auch in der FR relativ viele Mutationen. Bei den IVIG-

selektierten Klonen der M2-Bibliothek lag kein Klon in der Keimbahngensequenz vor. Allerdings hatten hier drei Klone (m2.24, m2.129, m2.142) keine Mutationen in der CDR 1 und 2. Nur der Klon m2.48 hatte in der CDR 1 und 2 ein R/S größer 2,9 (sh. Tabelle 8).

Klone	VH-CDRs	VH-CDRs	VH-FRs	VH-FRs	gesamte VH-Region	gesamte VH-Region
	#/total R/S	% Ratio	#/total R/S	% Ratio	#/total	%
schwere Ketten der M1-Bibliothek nach Panning						
6	1/66 0/1	1,52 0	1/207 1/0	0,48 ∞	2/273	0,73
11	0/66 0	0 0	5/204 2/3	2,45 0,67	5/270	1,85
18	1/66 0/1	1,52 0	2/207 1/1	0,97 1	3/273	1,1
22	3/66 3/0	4,55 ∞	7/207 3/4	3,38 0,75	10/273	3,66
28	2/66 1/1	3,03 1	1/207 1/0	0,48 ∞	3/273	1,09
36 (IgM)	0/66 0	0 0	0/201	0 0	0/267	0
40	0/66 0	0 0	0/207 0	0 0	0/273	0
45	2/66 1/1	3,03 2	1/207 1/0	0,48 ∞	3/273	1,09
57	4/66 4/0	6,06 ∞	4/207 3/1	1,93 3	8/273	2,93
74	10/66 8/2	15,15 4	9/201 7/2	4,48 3,5	19/267	7,12
77	0/66 0	0 0	0/204 0	0 0	0/270	0

schwere Ketten der M2-Bibliothek nach Panning						
4	1/66	1,52	0/207	0	1/273	0,37
	0/1	0	0	0		
10	2/66	3,03	7/204	3,43	9/270	3,33
	1/1	1	4/3	1,33		
24	0/66	0	1/204	0,49	1/270	0,37
	0	0	0/1	0		
45	2/66	3,03	0/207	0	2/273	0,73
	1/1	1	0	0		
48 (lc only 200bp)	1/66	1,52	1/204	0,49	2/270	0,74
	1/0	∞	0/1	0		
63	2/66	3,03	1/207	0,48	3/273	1,1
	1/1	1	0/1	0		
129	0/66	0	1/207	0,48	1/273	0,37
	0	0	1/0	∞		
134	2/66	3,03	0/207	0	2/273	0,73
	1/1	1	0	0		
142 (2x)	0/66	0	6/207	2,9	6/273	2,2
	0	0	5/1	5		

Tabelle 8: Mutationsraten der schweren Ketten der IVIG-selektierten Klone aus beiden Bibliotheken

Anmerkung: Die R/S-Ratio $x/0$ ist mathematisch nicht definiert. Bei meinen Vergleichen wurde sie als ∞ gewertet.

Bei den leichten Ketten lag die Homologie zu den Keimbahngensequenzen zwischen 95,4% und 100%. Bei den leichten Ketten der selektierten Klone der M1-Bibliothek lag keine identische Keimbahngensequenz vor. Nur der Klon m1.45 wies in der CDR keine Mutation auf. Bei vier (m1.06, m1.11, m1.36, m1.77) der neun leichten Ketten lag die R/S-Ratio in der CDR über 2,9. Bei den Klonen aus der M2-Bibliothek waren die leichten Ketten von zwei Klonen (m2.24, m2.45) mit der Keimbahngensequenz identisch. Die leichte Kette von m2.04 wies eine R/S-Ratio größer 2,9 auf. Die verbliebene leichte Kette von m2.48 hatte nach 220 bp eine Frameshift-Mutation, so dass diese nicht in den Vergleich mit einbezogen wurde (sh. Tabelle 9).

Clone	VL-CDRs	VL-CDRs	VL-FRs	VL-FRs	gesamte VL-Region	gesamte VL-Region
	#/total R/S	% Ratio	#/total R/S	% Ratio	#/total	%
leichte Ketten der M1-Bibliothek nach Panning						
6	4/84 4/0	4,76 ∞	2/171 1/1	1,17 0	6/255	2,35
11	1/93 1/0	1,08 ∞	0/183 0	0 0	1/276	0,36
22	3/84 2/1	3,57 2	1/171 1/0	0,58 ∞	4/255	1,57
28	7/84 4/3	8,33 1,33	5/177 2/3	2,83 0,67	12/261	4,6
36 (IgM)	1/96 1/0	1,04 ∞	0/186 0	0 0	1/282	0,35
40	3/90 2/1	3,33 2	5/183 3/2	2,73 1,5	8/273	2,93
45	0/75 0	0 0	1/177 1/0	0,56 ∞	1/252	0,4
57	1/81 0/1	1,23 0	0/171	0 0	1/252	0,4
74	1/96 0/1	1,04 0	1/186 0/1	0,54 0	2/282	0,71
77	1/72 1/0	1,39 ∞	2/183 1/1	1,1 1	3/255	1,18
leichte Ketten der M2-Bibliothek nach Panning						
4	3/90 3/0	3,33 ∞	2/183 0/2	1,1 0	5/273	1,83
24	0/84 0	0 0	0/171 0	0 0	0/255	0
45	0/75 0	0 0	0/177 0	0 0	0/252	0

48 (lc nur 200bp)	8/45 6/2	17,78 3	3/114 3/0	2,63 ∞	11/159	6,92
----------------------	-------------	------------	--------------	------------------	--------	------

Tabelle 9: Mutationsraten der leichten Ketten der IVIG-selektierten Klone aus beiden Bibliotheken

Anmerkung: Die R/S-Ratio $x/0$ ist mathematisch nicht definiert. Bei meinen Vergleichen wurde sie als ∞ gewertet.

3.6.3. Homologien der selektierten Klone

Alle Antikörpersequenzen wurden sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene miteinander verglichen und nach Homologie geordnet aufgelistet. Bei den leichten Ketten zeigten sich keine deutlichen Unterschiede vor und nach Panning bzw. hatten einige Klone keine funktionelle leichte Kette, so dass diese hier nicht gesondert aufgeführt werden. Bei den Sequenzen der schweren Ketten nach Panning zeigte sich, wie schon erwähnt, eine fast ausschließliche Zuordnung zu der VH3-Familie und dabei besonders zu den Loki 3.07, 3.23 und 3.30. Hier erwies es sich als günstig, die Klone der einzelnen Loki gesondert zu vergleichen.

Bei den fünf Klonen des Lokus 3.07 der M1-Bibliothek nach Panning zeigte sich eine außerordentlich große Homologie der einzelnen Klone untereinander. Nur in der Primer-region und in CDR 1 und 2 gab es vereinzelt Unterschiede in der Aminosäuresequenz. In der CDR 3, die sonst die größte Variabilität aufweist, waren auch in der DNA-Sequenz alle fünf Klone identisch. m2.129, der einzige Klon des Lokus 3.07 der M2-Bibliothek nach Panning, wies hingegen gerade in der CDR 3 größere (4 von 8 Aminosäuren) Unterschiede auf (sh. Abbildung 3).

Bei den vier Klonen, die dem Lokus 3.23 zuzuweisen waren, fiel auf, dass alle Klone in der CDR 1 und 2 fast identisch waren. Nur der Klon m2.48 hatte in der CDR 1 in Position 36 ein N anstelle von S. In der CDR 3 wiesen die Klone m1.36 und m2.48 sowohl untereinander als auch verglichen mit den Klonen m1.11 und m1.77 eine komplett unterschiedliche Aminosäuresequenz auf. Die Klone m1.11 und m1.77 waren auch in der CDR 3 vollkommen identisch. In der FR waren bei allen vier Klonen nur vereinzelt Unterschiede in der Aminosäuresequenz vorhanden (sh. Abbildung 4).

Beim Vergleich der Klone des Lokus 3.30 nahm ich auch die beiden Klone der ungepannten Bibliotheken (m1.hoe10 und m2.hoe07) mit auf. Diese wiesen in allen drei CDR erhebliche

Unterschiede auf. In der FR waren sie bis auf einzelne Aminosäuren mit den gepannten Klonen identisch. Bei den Klonen des Lokus 3.30 der gepannten Bibliotheken wiederum fiel auf, dass vier Klone der M2-Bibliothek (m2.04, m2.45, m2.63 und m2.134) vollkommen identisch in den CDR 2 und 3 waren, und in der CDR 1 nur m2.04 in Position 32 ein S statt einem N hatte. Die beiden Klone der M1-Bibliothek und m2.142 hingegen wiesen in der CDR 3 sowohl untereinander als auch verglichen mit den o.g. Klonen der M2-Bibliothek erhebliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf (sh. Abbildung 5).

Die Klone m1.22 (VH3, Lokus unbekannt), m2.10 (VH3, Lokus 3.20) und m2.24 (VH4, Lokus 4.04) wurden nicht in die Homologievergleiche mit einbezogen, da schon allein wegen ihrer Herkunft größere Homologien nicht vorhanden waren.

Weiterhin wurden die Sequenzen aller funktionellen schweren und leichten Ketten über das Internet mit dem Programm BLASTn auf ihre Homologie zu bekannten DNA-Sequenzen der EMBL/GenBank hin untersucht. Dabei zeigten sich zum Teil hohe Homologien mit Autoantikörpern, polyreaktiven Antikörpern und Antikörpern aus dem fetalen Repertoire.

	Primer	10	2	30	CDR1	40	5	
mlhie18	1	EVQLLE-SGG	GLVQPGESLR	LSCAASGFTF	SSYWMSWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie45	1	EVQLLE-SGG	GLVQPGESLR	LSCAASGFTF	SSFGMSWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie28	1	EVQLLEQSGG	GLVQPGESLR	LSCAASGFTF	SSYWMSWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie40	1	EVQLLEQSGG	GLVQPGESLR	LSCAASGFTF	SSYWMSWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie06	1	EEQLLEQSGG	GLVQPGESLR	LSCAASGFTF	SSYWMSWVRQ	APGKGLEWVA		50
m2hie129	1	EVQLLE-SGG	GLVQPGESLR	LSCAASGFTF	GSYWMSWVRQ	APGKGLEWVA		50

		CDR2	7	80	90	CDR3>	
mlhie18	51	NIKQDGSEKY	YVDSVKGFRFT	ISRDNKNSL	YMQMNSLRAE	DTAVYYCARE	100
mlhie45	51	NIKQDGSEKY	YVDSVKGFRFT	ISRDNKNSL	YMQMNSLRAE	DTAVYYCARE	100
mlhie28	51	NIKQDGSEKY	YVDSVKGFRFT	ISRDNKNSL	YMQMNSLRAE	DTAVYYCARE	100
mlhie40	51	NIKQDGSEKY	YVDSVKGFRFT	ISRDNKNSL	YMQMNSLRAE	DTAVYYCARE	100
mlhie06	51	NIKQDGSEKY	YVDSVKGFRFT	ISRDNKNSL	YMQMNSLRAE	DTAVYYCARE	100
m2hie129	51	NIKQDGSEKY	YVDSVKGFRFT	ISRDNKNSL	YMQMNSLRAE	DTAVYYCAR	100

		<CDR3	110	12	130	140	150	
mlhie18	101	VAGHFDYWGQ	GTLVTVSS..	150
mlhie45	101	VAGHFDYWGQ	GTLVTVSS..	150
mlhie28	101	VAGHFDYWGQ	GTLVTVSS..	150
mlhie40	101	VAGHFDYWGQ	GTLVTVSS..	150
mlhie06	101	VAGHFDYWGQ	GTLVTVSS..	150
m2hie129	101	DSGIFDYWGQ	GTLVTVSS..	150

Abbildung 3: Aminosäuresequenzen der schweren Ketten des VH-Lokus 3.07

	Primer	10	20	30	CDR1	40	50	
mlhie11	1	EVQLLEESGG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SSYAMSWVRQ	APGKGLEWV		50
mlhie77	1	EVQLLE-SSG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	SSYAMSWVRQ	APGKGLEWV		50
m2hie48	1	EVQLLE-SSG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	SSYAMSWVRQ	APGKGLEWV		50
mlhie36	1	EVQLLEQSSG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	SSYAMSWVRQ	APGKGLEWV		50
							S	
			CDR2	70	80	90	CDR3>	
mlhie11	51	AISGSGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCAK		100
mlhie77	51	AISGSGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCAK		100
m2hie48	51	AISGSGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCAK		100
mlhie36	51	AISGSGGSTY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCAK		100
							-	
			<CDR3	120	130	140	150	
mlhie11	101	IGVGATKGP-	FDYWGQGLV	TVSS.....	150
mlhie77	101	IGVGATKGP-	FDYWGQGLV	TVSS.....	150
m2hie48	101	RRSSGWYGP	MDVWGQGLV	TVSS.....	150
mlhie36	101	-NGGDSYSGY	FQHWGQGLV	TVSS.....	150

Abbildung 4: Aminosäuresequenzen der schweren Ketten des VH-Lokus 3.23

	Primer	10	2	30	CDR1	40	5	
m2hie134	1	EVQLLEQSSG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SNYAMHWVRQ	APGKGLEWVA		50
m2hie63	1	EVQLLEESGG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SNYAMHWVRQ	APGKGLEWVA		50
m2hie04	1	EVQLLEQSSG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SSYAMHWVRQ	APGKGLEWVA		50
m2hie45	1	EVQLLE-SSG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SNYAMHWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie57	1	EVQLLE-SSG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFIF	SGHAMHWVRQ	APGKGLEWVA		50
m2hie142	1	EVQLLE-SSG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFTF	SSYAMHWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie74	1	EVQLLE-SSG	GVVQPGRSLR	LSCAASGFSE	SNYAIHWVRQ	APGKGLEWVA		50
mlhie22	1	EVQLLE-SSG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFPE	SSFEMHWVRQ	APGKGLEWVS		50
			CDR2	7	80	90	CDR3>	
m2hie134	51	VISYDGSNKY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCARD		100
m2hie63	51	VISYDGSNKY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCARD		100
m2hie04	51	VISYDGSNKY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCARD		100
m2hie45	51	VISYDGSNKY	YADSVKGRFT	ISRDN SKNTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCARD		100
mlhie57	51	VISYDGSNKY	YADSVKGRFT	ISRDN SKSTL	Y LQMNSLRAE	DTAVYYCARD		100
m2hie142	51	VISYDGSNKY	YADSVKGRFT	ISRDN SRNTL	Y LAMNSLRVE	DTAVYYCVRE		100
mlhie74	51	VISFDGRQKD	YADSVKGRFT	ISRDN SKNKV	Y LQMNSLTTE	DTAMYYCVRE		100
mlhie22	51	YISSGGSSII	YADSVKGRFT	ISRDN SKNSL	Y LQMNSLRAE	DTAIYYCARD		100
			<CDR3	12	130	140	150	
m2hie134	101	RS-----RG-	GFDYWGQGLV	VTVSS.....	150
m2hie63	101	RS-----RG-	GFDYWGQGLV	VTVSS.....	150
m2hie04	101	RS-----RG-	GFDYWGQGLV	VTVSS.....	150
m2hie45	101	RS-----RG-	GFDYWGQGLV	VTVSS.....	150
mlhie57	101	RG-----YSY	GMDVWGQGLT	VTVSS.....	150
m2hie142	101	VD-----	AFDIWGQGLM	VTVSS.....	150
mlhie74	101	RRSKLGIKGG	AFDVWGQGLV	VTVSS.....	150
mlhie22	101	AS-----NH-	FFDYWGQGLV	VTVSS.....	150

Abbildung 5: Aminosäuresequenzen der schweren Ketten des VH-Lokus 3.30

4. Diskussion

4.1. Phage Display Bibliotheken und die Selektion von humanen Fab-Fragmenten

Die Technik der Phage Display Bibliotheken eröffnete in den letzten Jahren die Möglichkeit, viele humane Fab-Fragmente vom IgG-Isotyp mit hoher Affinität für ein spezifisches Antigen zu selektieren (75;76;77). Insbesondere von Patienten mit Autoimmunerkrankungen gelang es, Fab-Fragmente mit einer hohen spezifischen Bindung für das potentielle Autoantigen zu isolieren (78;79;80;81;82;83). Ob diese isolierten Antikörper Kettenkombinationen enthalten, die dem natürlichen Antikörperrepertoire entstammen oder ob sie Artefakte sind, wurde initial widersprüchlich diskutiert. Hier konnte die Arbeitsgruppe von Duchosal et al erstmals zeigen, dass mittels Phage Display Technik durchaus relevante Antikörper isoliert werden können. Sie injizierten Lymphozyten eines Patienten, welcher zuletzt vor 17 Jahren mit Tetanustoxoid Kontakt hatte, in hu-PBL-SCID Mäuse und konnten mittels Phage Display und Biopanning auf Tetanustoxoid spezifisch auf dieses Antigen reagierende Fab-Fragmente isolieren. Bei nicht mit Tetanustoxoid immunisierten Patienten gelang dies jedoch nicht (84). Weiterhin wurde angezweifelt, dass die isolierten Antikörper einer Phage Display Bibliothek eine biologische Relevanz besitzen. Die Arbeitsgruppe von Chazenbalk et al konnte aus verschiedenen Phage Display Bibliotheken Fab-Fragmente isolieren, welche spezifisch mit Thyroid Peroxidase reagieren. Diese inhibierten dann in vitro die Autoantikörperaktivität von Patientenserum auf Thyroid Peroxidase (85).

In unserem Labor konnten in drei Phage Display Bibliotheken von Patienten mit Autoimmunthrombozytopenie (AITP) durch antiidiotypisches Biopanning auf IVIG erstmalig humane antithrombozytäre Antikörper selektiert und molekular analysiert werden. Die spezifische Bindung an Thrombozyten verschiedener Spender wurde sowohl im ELISA als auch in der FACScan-Analyse mit kompletten Fab-Phagen nachgewiesen. Die schweren Ketten der dabei selektierten Fab-Fragmente konnten interessanterweise nur einer limitierten Anzahl von Keimbahngenen zugeordnet werden (73).

In einer weiteren Arbeit in unserem Labor wurde eine Phage Display Bibliothek einer gesunden Probandin erstellt und die antiidiotypische Interaktion von IgG- und IgM-Fabs mit IVIG

untersucht. Auch die hierbei selektierten Fab-Fragmente wiesen bei den schweren Ketten nur eine limitierte Nutzung von Keimbahngenen auf (86).

Das Ziel dieser Arbeit war nun die Selektion und molekulare Charakterisierung von humanen, monoklonalen Fab-Fragmenten in Interaktion mit IVIG durch Herstellung einer Phage Display Bibliothek einer Patientin mit Kawasaki-Syndrom vor und 2 Monate nach Behandlung mit IVIG. Ausgangspunkt der Phage Display Bibliotheken war jeweils eine Blutprobe des Kindes. Aus den Lymphozyten wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um die funktionellen Gensequenzen des Antikörperrepertoires zu erhalten. Mittels einer möglichst großen Anzahl von Primern zur Amplifizierung der Gensequenzen für die leichten und schweren Ketten wurde eine möglichst große Diversität angestrebt. Nach Elektrotransformation der pComb3H-Lc-Fd in *E.coli* konnte für die Bibliothek vor Behandlung mit IVIG (M1-Bibliothek) eine Größe von $1,3 \times 10^7$ unabhängig voneinander transfizierter Klone abgeschätzt werden, respektive für die Bibliothek nach Behandlung (M2-Bibliothek) eine Größe von 6×10^7 . Als weiteren Nachweis der Diversität zeigten jeweils zehn zufällig ausgesuchte Klone jeder Bibliothek nach Behandlung mit einem Restriktionsenzym zehn unterschiedliche Restriktionsmuster. Um die Qualität der Bibliotheken zu sichern, wurden diese zufällig ausgewählten Klone auf das Vorhandensein beider Ketten überprüft. Hierbei wiesen nur 10 % der Klone keine leichte Kette auf. Somit boten beide Phage Display Bibliotheken sowohl in der Diversität als auch in der Qualität einen guten Ausgangspunkt.

4.2. Charakterisierung der IVIG-selektierten Fab-Phagen

Um mit IVIG interagierende Fab-Phagen anzureichern, wurden beide Bibliotheken einem Biopanning mit IVIG unterzogen. Ein ELISA auf IVIG von ca. 70 zufällig ausgewählten Klonen beider Bibliotheken vor dem Panning konnte eine bereits bestehende Anreicherung von mit IVIG interagierenden Fab-Phagen ausschließen. Nach dem Panning wurden erneut ca 70 Klone aus jeder Bibliothek isoliert und im ELISA auf ihre Reaktivität mit IVIG untersucht. 50 % der Klone aus der M1-Bibliothek und gar 96 % der Klone aus der M2-Bibliothek eine Absorption $A_{450} > 0,2$. Die Reaktivität der Klone der M2-Bibliothek war hierbei insgesamt deutlich stärker (53 % $A_{450} > 1$) als die der Klone aus der gepannten M1-Bibliothek (12% $A_{450} > 1$). Die insgesamt deutlich stärkere Anreicherung von mit IVIG-reagierenden Klonen in der gepannten M2-Bibliothek sowohl in der Quantität als auch in der Affinität lassen eine Veränderung des

Antikörperrepertoires des Kindes durch die Behandlung mit IVIG vermuten (sh. Tabelle 3; Abbildung 1+2).

Bei der Sequenzierung der mit IVIG interagierenden Klone stellte sich heraus, dass einige Klone trotz Vorhandenseins der entsprechenden Inserts für leichte und schwere Ketten keine funktionellen Immunglobulinsequenzen enthielten. Die zugehörigen Proteinsequenzen wiesen in der Embl-Datenbank Homologien zu anderen humanen Proteinen aus, so dass hier ein Primermismatch bei der cDNA-Umschreibung angenommen werden muss.

Insgesamt konnten die V-Regionen von 32 Klonen sequenziert werden: 11 positiv auf IVIG reagierende Klone der M1-Bibliothek nach Panning, 10 positiv auf IVIG reagierende Klone der M2-Bibliothek nach Panning sowie zur Kontrolle jeweils 5 bzw. 6 zufällig ausgewählte Klone aus den ungepannten Bibliotheken.

Wie schon in den vorangegangenen Arbeiten unseres Labores fiel auch hier bei der Sequenzierung der IVIG-selektierten Fab-Phagen auf, dass insbesondere bei der M2-Bibliothek nach Panning nur 3 von 10 Klonen (m2.04, m2.24, m2.45) ein funktionelles Leichtkettenfragment besitzen sowie ein Klon (m2.48) nach 220 bp eine Frameshiftmutation in der leichten Kette mit nachfolgendem Stopcodon aufwies. In der M1-Bibliothek nach Panning hingegen wiesen 10 von 11 Klonen ein funktionelles Leichtkettenfragment auf. Dass die Ursache dafür nicht in der Qualität der ursprünglichen Bibliotheken zu suchen ist, zeigen die 11 Kontrollklone der ungepannten Bibliotheken, welche in allen Fällen ein funktionelles Leichtkettenfragment aufweisen.

Ein möglicher Grund für das gehäufte Auffinden von Fab-Phagen ohne funktionelle leichte Kette nach Panning könnte in einem Selektionsvorteil hinsichtlich des Wachstums der transfizierten E.coli liegen. E.coli, welche mit Fab-Phagen transfiziert sind, die beide funktionellen Inserts enthalten, wachsen langsamer (87;88). Fab-Phagen mit nur einer funktionellen Kette können sich somit in mehreren Panningschritten leichter anreichern. Da das Fab-Fragment über die schwere Kette mit dem G3-Protein des Phagen verbunden ist und sich die leichte Kette nur kovalent an die schwere Kette bindet, konnten selbstverständlich keine Fab-Phagen isoliert werden, die nur eine leichte Kette aufweisen.

Weiterhin fiel auf, dass alle sequenzierten leichten Ketten - egal ob vor oder nach Panning – vom λ -Isotyp waren (sh. Tabelle 7), obwohl in der Amplifikation auch Primer des κ -Isotyps verwendet wurden. Dies wurde auch schon bei den anderen Bibliotheken aus unserem Labor beobachtet (73;86). Möglich wäre, dass die Verarbeitung der leichten Ketten vom κ -Isotyp

weniger effizient ist oder nach Transformation in den *E. coli* auch hier einen Selektionsnachteil hinsichtlich des Wachstums besteht.

Nimmt man die Absorption im ELISA auf IVIG als Maß der Reaktivität mit IVIG, so fällt auf, dass das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein einer leichten Kette keinen Einfluss auf die Reaktivität hat. Insgesamt weisen die Klone der M2-Bibliothek eine höhere Absorption im ELISA mit IVIG auf (sh. Tabelle 3; Abbildung 1+2), was ebenso auf die sequenzierten Klone zutrifft, jedoch unabhängig davon, ob sie eine leichte Kette haben oder nicht.

Diese Daten lassen vermuten, dass die Interaktion der Fab-Phagen mit IVIG hauptsächlich über die schweren Ketten vermittelt wird.

In der Arbeit von Melanie Hoffmann fanden sich in der IgG-Bibliothek zwei Klone, die in ihren schweren Ketten bis auf drei Aminosäuren identisch waren. Zwei der Unterschiede befanden sich in der Primerregion und der dritte in der Framework 3-Region. Somit waren die CDR-Regionen komplett identisch. Obwohl der eine Klon eine leichte Kette aufwies und der andere nicht, zeigten die beiden Fab-Phagen in mehreren, unabhängigen ELISA-Untersuchungen nahezu das gleiche Bindungsverhalten. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine spezifische Interaktion von IVIG mit den schweren Ketten der Fab-Phagen (86).

4.2.1. Keimbahngene der schweren Ketten der IVIG-selektierten Fab-Phagen

Nur bei 3 (m1hoe06, m1hie22, m2hoe06) der insgesamt 32 sequenzierten Gensegmente der schweren Ketten konnten keine bekannten und funktionell exprimierten Keimbahngene (72) identifiziert werden. In den 11 Kontrollklonen der ungepannten Bibliotheken wurden 9 verschiedene Keimbahngene der V_H -Loci 3-15, 3-30, 3-49, 3-74, 4-30.1, 4-34, 4-39 und 4-59 genutzt (sh. Tabelle 4+5). Bei 2 Kontrollklonen konnte kein Keimbahngen identifiziert werden. Dies weist auch darauf hin, dass das System der Phage Display Bibliothek keine bevorzugte Utilisation von Keimbahngenen beinhaltet, sondern annähernd dem natürlichen Repertoire entspricht.

Erst nach dem Panning auf IVIG zeigte sich in den isolierten Klonen eine Häufung der Keimbahngene der V_H -Loci 3-07, 3-23 und 3-30 (sh. Tabelle 6). So entstammten 5 Klone der gepannten M1-Bibliothek und 1 Klon der gepannten M2-Bibliothek dem Keimbahngen DP54/V3-7 des V_H -Lokus 3-07. 3 Klone der gepannten M1-Bibliothek sowie 1 Klon der gepannten M2-Bibliothek nutzten das Keimbahngen DP47/V3-23 des V_H -Lokus 3-23. 2 Klone der gepannten M1-Bibliothek entstammten der Keimbahngensequenz DP49/1.9III vom V_H -Lokus

3-30 sowie 5 Klone der gepannten M2-Bibliothek der Keimbahngensequenz hv3005 ebenfalls vom V_H-Lokus 3-30. Nur ein Klon der gepannten M2-Bibliothek nutzte den V_H-Lokus 4-04 mit der Keimbahngensequenz DP70/4d68.

Die schweren Ketten der 5 Klone der gepannten M1-Bibliothek, welche vom Keimbahngen DP54/V3-7 des V_H-Lokus 3-07 stammen, weisen interessanterweise sowohl in Hinsicht auf das Keimbahngen als auch untereinander kaum Mutationen auf. Insbesondere die CDR3-Region ist bei allen 5 Klonen identisch, in der CDR1-Region weist nur der Klon m1hie45 eine Austauschmutation auf, in der CDR2-Region ist nur der Klon m1hie28 in einer Aminosäure verschieden. Im Unterschied dazu unterscheidet sich die schwere Kette des Klon m2hie129, welche ebenfalls dem Keimbahngen DP54/V3-7 des V_H-Lokus 3-07 entstammt, in der CDR3-Region in 4 von 8 Aminosäuren, bei der CDR1 und CDR2 besteht wiederum eine 100%ige Homologie zum Keimbahngen (sh. Tabelle 8; Abbildung 3). Somit kann man wohl davon ausgehen, dass die schweren Ketten der 5 Klone der gepannten M1-Bibliothek einen gemeinsamen Ursprung haben und kaum einer antigenspezifischen Selektion unterlaufen sind. Da alle 5 Klone unterschiedliche leichte Ketten beziehungsweise in einem Fall (m1hie18) auch keine leichte Kette besitzen, können sie jedoch nicht einem Fab-Phagen entstammen, der sich vielleicht während des Pannings, aus welchen Gründen auch immer, durchgesetzt hat. Auch in den Kontrollen der M1-Bibliothek vor Panning findet sich kein Klon des Keimbahngens DP54/V3-7 des V_H-Lokus 3-07 (sh. Tabelle 4), so dass man auch ausschließen kann, dass das Keimbahngen schon bei der Erstellung der Bibliothek vor der Kombination mit leichten Ketten bevorzugt amplifiziert worden ist.

Bei den schweren Ketten der IVIG-selektierten Klonen der Phage Display Bibliotheken in den Arbeiten von Melanie Hoffmann und Nina Jendreyko (73;86) hingegen findet sich kein Klon des Keimbahngens DP54/V3-7 des V_H-Lokus 3-07. Einzig in der ungepannten IgM-Bibliothek aus der Arbeit von Melanie Hoffmann ist ein Klon mit einer schweren Kette, die diesem Keimbahngen entstammt. Somit wäre es möglich, dass Antikörper, welche dieses Keimbahngen bei Erstellung ihrer schweren Kette nutzen, eine besondere Rolle in der Genese des Kawasaki-Syndroms spielen. Leider war es im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht möglich, noch weitere Phage Display Bibliotheken von Kawasaki-Patienten zu erstellen und somit zu überprüfen, ob die gehäufte Nutzung des Keimbahngens DP54/V3-7 des V_H-Lokus 3-07 bei den IVIG-selektierten Fab-Phagen eine individuelle Besonderheit meiner Patientin oder allen Kawasaki-Patienten gemein ist. Auch die BLAST-Analyse ergab keine auffälligen Homologien zu bereits bekannten Autoantikörpern.

Die gehäufte Nutzung der V_H-Loki 3-23 und 3-30 in IVIG-selektierten Phage Display Bibliotheken zeigte sich auch schon in den vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (73;74;86). Interessanterweise fand sich in der Arbeit von Melanie Hoffmann der V_H-Lokus 3-23 nur bei den IgM-Fab-Fragmenten, wo hingegen der V_H-Lokus 3-30 nur bei den IgG-Fab-Fragmenten vorhanden war. In den IVIG-selektierten Fab-Phagen der AITP-Patienten in der Arbeit von Nina Jendreyko kamen jedoch beide V_H-Loki vor. Anders als in dieser Arbeit, wo der V_H-Lokus 3-30 auch in jeweils einem Kontrollklon vor Panning genutzt wurde, kamen die V_H-Loki 3-23 und 3-30 in den vor Panning zufällig sequenzierten Klonen nicht vor.

Bei den Klonen des V_H-Lokus 3-30 der gepannten M2-Bibliothek fällt auf, dass 3 von 5 (m2hie134, m2hie63 und m2hie45) in ihren CDR eine 100%-Homologie aufweisen und sich nur durch eine einzige Austauschmutation in der FR1-Region unterscheiden. Der Klon m2hie04 zeigt jeweils in der CDR1- als auch in der CDR2-Region eine Austauschmutation, ist aber in der CDR3-Region ebenfalls mit den 3 oben genannten Klonen identisch. Somit kann man auch hier vermuten, dass die schweren Ketten dieser 4 Klone einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Die restlichen Klone (m2hie142, m1hie57, m1hie74), welche in ihren schweren Ketten den V_H-Lokus 3-30 nutzen, unterscheiden sich insbesondere in der CDR3-Region deutlich. Auf die Rolle des V_H-Lokus 3-30 gehe ich im nächsten Kapitel noch gesondert ein (sh. Abbildung 5).

Die 4 IVIG-selektierten Klone der Keimbahngensequenz DP47/V3-23 des V_H-Lokus 3-23 sind in ihrer Aminosäuresequenz deutlich heterogener. Auffällig ist hier, dass die Klone m1hie11 und m1hie77 zwar in allen drei CDR-Regionen identisch sind, aber insbesondere die FR1-Region sich in 3 Aminosäuren unterscheidet. Somit haben die schweren Ketten dieser 4 Klone wohl einen unterschiedlichen Ursprung. Auf die Rolle des V_H-Lokus 3-23 gehe ich ebenfalls im nächsten Kapitel noch gesondert ein (sh. Abbildung 4).

4.3. Die Rolle der Keimbahngen-Loki 3-23 und 3-30

Bislang wurden in unserem Labor sieben Phage Display Bibliotheken erstellt – 3 von Patienten mit ITP, eine IgG- und eine IgM-Bibliothek einer gesunden Patientin sowie je eine Bibliothek vor und nach Behandlung mit IVIG einer Patientin mit Kawasaki-Syndrom – und durch Panning auf Interaktion mit IVIG untersucht. Bei allen IVIG-selektierten Fab-Phagen fiel bei den schweren Ketten eine gehäufte Nutzung der Keimbahngen-Loki 3-23 und 3-30 auf (73;74;86). Deshalb möchte ich im folgenden Kapitel die besondere Rolle dieser beiden Keimbahngen-Loki genauer darstellen.

Bei der somatischen Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente zur Bildung einer schweren Kette erfolgt der Einbau der verschiedenen V_H-Gensegmente nicht zufällig, sondern wird von wenigen Keimbahngenen dominiert. Obwohl bislang 34 verschiedene funktionelle V_H-Keimbahngene aus sieben verschiedenen V_H-Familien bekannt sind, werden 70-80% der Antikörper des peripheren Repertoires bei ihren schweren Ketten von nur 10 Keimbahngenen kodiert. Den größten Anteil stellen hierbei die V_H-Loki 3-23 und 3-30 der V_H-3-Familie sowie die V_H-Loki 4-34 und 4-39 der V_H-4-Familie .

Suzuki et al analysierten mehr als 2500 unabhängige Antikörper aus dem peripheren Repertoire von zwei gesunden erwachsenen Männern. Hierbei dominierte die V_H-3-Familie mit den beiden Keimbahngenen-Loki 3-23 und 3-30. Auch bei einer Wiederholung der Untersuchung nach 8 Monaten zeigte sich dieselbe Verteilung in der Utilisation der Keimbahngene (89). Wildt et al untersuchte 365 IgG-B-Lymphozyten von drei Erwachsenen und konnte ebenfalls eine bevorzugte Nutzung der V_H-Loki 3-23 (12,3%), 3-30 (8,8%) als auch 4-39 (6,6%) nachweisen (90).

Huang et al erstellte zur Untersuchung der Keimbahngenverteilung im peripheren Antikörperrepertoire aus Blutproben gesunder Probanden eine IgG- und drei IgM-Bibliotheken. Hierbei fiel auf, dass 2/3 aller sequenzierten Klone keine oder nur bis zu 3 Basen Mutationen aufwiesen. Bei den schweren Ketten wurde hierbei am häufigsten das Keimbahngen DP47/V3-23 des V_H-Lokus 3-23 benutzt (91). In einer weiteren Studie untersuchte Huang et al die V_H-3-Familie noch genauer. Die V_H-3-Familie setzt sich aus ca 60 Gensegmenten zusammen, von denen jedoch nur die Hälfte funktionell ist. Mittels Hybridisierung mit Oligonukleotid-Primern analysierte Huang et al 4500 unabhängige schwere Ketten V_H-3-Familie von zwölf Probanden und fand auch hier eine klare Präferenz in der Utilisation nur weniger Gen-Loki. Der V_H-Lokus 3-23 wurde mit 24,3 % am häufigsten genutzt, an zweiter Stelle kam der V_H-Lokus 3-30 mit 16,1 % und an dritter Stelle der V_H-Lokus 3-33 mit 12,5 %. Die Verteilung der Utilisation war unabhängig von Geschlecht und Alter der untersuchten Personen (92).

Auch in den Antikörpern des fetalen Repertoires zeigt sich eine Dominanz des V_H-Lokus 3-23. Rao et al erstellte hierzu ein Phage Display Library aus FACS-sortierten CD34+/CD19+ pro-B-Zellen eines 21 Wochen alten Fetus. In diesem Stadium präsentieren die pro-B-Lymphozyten noch kein Immunglobulin auf ihrer Oberfläche und unterliegen somit noch keiner positiven oder negativen Selektion durch Auto- oder externe Antigene. Theoretisch müsste hierbei die Utilisation der Keimbahngene einer zufälligen Verteilung unterliegen. Interessanterweise dominierten jedoch auch hier die Gen-Loki 3-30 (ca 24%) und 3-23 (ca 20%) (93;13). Somit

muss also schon vor der Selektion durch Auto- oder externe Antigene eine bevorzugte Nutzung dieser beiden Keimbahngene vorliegen.

Durch die Nutzung des Phage Display Systems gelang es in den letzten Jahren, viele Autoantikörper molekulargenetisch zu analysieren. Interessanterweise nutzen auch viele dieser Autoantikörper in ihren V_H-Regionen die Keimbahngene 3-23 und 3-30 (73;79;80;81;82). Trotz der Nutzung derselben Keimbahngene binden diese jedoch hochaffin und spezifisch an verschiedene Autoantigene wie dsDNA, Thyroid-Peroxidase, Thrombozyten etc. In der Arbeit von Nina Jendreyko (73) nutzten über die Hälfte der antithrombozytären Fab-Phagen entweder das Keimbahngene 3-30 oder 3-23. Unter den von Guo et al isolierten anti-Thyroid-Peroxidase-Fabs stammte ebenfalls ein großer Teil vom Keimbahngenen 3-23. Es ließen sich hier noch viele weitere Beispiele aufführen (94).

Welche Ursache die Dominanz dieser beiden Keimbahngene hat, bleibt jedoch weiterhin unklar. Es wird diskutiert, dass vielleicht die Position der beiden Gensegmente in der Mitte des V_H-3-Gens eine Rolle spielt (95). Ihre noch größere Dominanz im fetalen Repertoire lässt vermuten, daß sie auf Grund ihrer Polyreaktivität und Fähigkeit zur Vernetzung sowohl für die Entwicklung eines vielfältigen Antikörperrepertoires als auch für die spätere Regulation des Repertoires verantwortlich sein könnten. Einen interessanten Hinweis gaben hierbei die Arbeiten von Projen P. Chen et al. Sie untersuchten die Häufigkeit der homozygoten Deletion des Keimbahngensegments hv3005, einer allelen Variante des Keimbahngensegments 3-30 mit 99% Homologie. Dabei fiel auf, dass die homozygote Deletion bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen signifikant häufiger war als bei gesunden Probanden. Bei Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (SLE) wurde bei 24%, bei Patienten mit chronischer idiopathischer Thrombozytopenie (cITP) bei 31,8% der Fälle eine homozygote Deletion von hv3005 gefunden. Die gesunde Kontrollgruppe hingegen wies diese Deletion nur in 8% der Fälle auf. Daraus schloss Projen et al, dass Antikörper, welche das Keimbahngensegment hv3005 nutzen, eine wichtige regulatorische Funktion in der Entwicklung und Beibehaltung des Selbsttoleranz besitzen (96).

4.4. Mögliche Wirkungsweisen von IVIG

Wie in der Einleitung beschrieben, hat die Behandlung mit IVIG nicht nur kurzzeitige Effekte wie die Neutralisation von zirkulierenden Autoantikörpern, sondern bewirkt auch

Langzeiteffekte, welche sich nur über eine immunmodulatorische Wirkung von IVIG erklären lassen.

Schon in den vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe fiel auf, dass IVIG-selektierte Fab-Phagen in ihren schweren Ketten vornehmlich die Keimbahngene V3-23 und V3-30 nutzen (73;73;86). Selbst bei einer gesunden Probandin, welche bislang noch nie mit IVIG behandelt worden war, trat diese bevorzugte Utilisation auf (86). Auch in dieser Arbeit, bei der erstmals vor und nach der Therapie mit IVIG eine Phage Display Bibliothek erstellt wurde, reicherten sich beim Panning mit IVIG Antikörper an, die die oben genannten Keimbahngene nutzen. Bei den IVIG-selektierten Fab-Phagen vor der Behandlung mit IVIG fiel außerdem eine verstärkte Nutzung des Keimbahnlokus V3-07 auf, der in den anderen Arbeiten keine Rolle spielte. Auch in den IVIG-selektierten Fab-Phagen nach der Therapie fand sich kein Klon, der diesen Lokus nutzte.

In der Utilisation der D- und J-Keimbahngene bei den schweren Ketten bzw. den V- und J-Keimbahngenen der leichten Ketten wurde keine auffällig häufige Nutzung einzelner Keimbahngene beobachtet.

Offenbar spielen die V-Regionen der schweren Kette, welche durch diese beiden Keimbahngene kodiert werden, bei der Interaktion mit IVIG eine besondere Rolle. Die CDR3-Region, die schon vom D-Segment mitbestimmt wird, als auch die leichten Ketten scheinen nur wenig Einfluss auf die Selektion zu nehmen. Diese Beobachtungen bestätigen die Hypothese, dass die Interaktion mit IVIG außerhalb der antigenbindenden Domäne im Bereich der V-Region der schweren Kette stattfindet. Eine V-Region-vermittelte Interaktion zwischen Antikörpern mit einer regulatorischen Komponente sowohl im fetalen als auch im reifen, peripheren Antikörperrepertoire wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben.

Dietrich et al fanden eine V-Region-vermittelte Interaktion zwischen IgG-Antikörpern in gesunden Individuen (51;52;95). Coutinho postulierte ein V-Region-vermitteltes Netzwerk von keimbahngenkonfigurierten Antikörpern in der frühen Entwicklung des Immunsystems (96). Huarez et al untersuchte die Rolle von IgM-Antikörpern als Modulatoren des Immunsystems. Ihm fiel auf, dass aufgereinigte IgG-Fraktionen von gesunden Probanden unterschiedlichen Alters eine Bindung an bekannte Auto-Antigene zeigen, wo hingegen das Gesamtserum derselben Probanden keine oder eine weitaus geringere Reaktivität aufweist. Bei externen Antigenen zeigte sich kein Unterschied in der Reaktion zwischen aufgereinigter IgG-Fraktion und Gesamtserum. Folglich bewirkt die IgM-Fraktion eine V-Region-vermittelte Regulation der natürlichen Autoreaktivität von IgG-Antikörpern (97;98).

Die Modulation des Immunsystems durch IVIG könnte somit über eine Interaktion von IVIG mit der V-Region von membranständigen Ig-Rezeptoren von B-Zellen und einer unspezifischen Aktivierung einer großen Anzahl von B-Lymphozyten vermittelt werden. Dies würde auch den Wechsel im Antikörperrepertoire sowie den Anstieg des Serum-IgM erklären. Das erhöhte Serum-IgM könnte nun zu einer Abschwächung der Aktivität von Autoantikörpern führen. Mouthon et al vermuten auch eine direkte immunmodulatorische Wirkung durch spezifische Bindung von in IVIG enthaltenen Autoantikörpern an membranständigen Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten. So konnte die Gruppe Antikörper, welche spezifisch an CD5-Moleküle binden, in IVIG nachweisen (99;100). Die CD5+B-Lymphozyten spielen ebenfalls in der Modulation des Immunsystems eine große Rolle.

Die unspezifische Aktivierung einer großen Anzahl von B-Lymphozyten ist auch charakteristisch für B-Zell-Superantigene (45;46) . Wie in der Einleitung beschrieben binden diese ebenfalls außerhalb antigenbindenden Domäne an die schwere Kette im Bereich der V-Region. Insbesondere das Protein A des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (SpA) bindet ausschließlich an keimbahngenkonfigurierte V-Regionen der V_H-3-Familie. Innerhalb der V_H-3-Familie variierte die Affinität von SpA zwischen den verschiedenen Keimbahngenen, war aber interessanterweise bei den V3-23-kodierten schweren Ketten am stärksten. Die Analyse der kristallinen Struktur ergab, dass die für die Bindung wichtigen Aminosäuren in der V-Region außerhalb antigenbindenden Domäne im Bereich der *framework region* (FR) 1 und 3 sowie der *complementarity determining region* (CDR) 2 liegen (45).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das erste Mal eine Phage Display Bibliothek als Spiegelbild des Antikörperrepertoires einer Patientin mit Kawasaki-Syndrom nach Diagnosestellung aber vor Behandlung mit IVIG sowie 2 Monate nach Behandlung mit IVIG erstellt. Durch *biopanning* mit IVIG wurden diejenigen Fab-Phagen isoliert, welche intensiv von IVIG gebunden wurden.

Bei den IVIG-selektierten Fab-Phagen der Phage Display Bibliothek vor Behandlung mit IVIG fiel auf, dass 5 der 11 sequenzierten Klone bei der schweren Kette das Keimbahnsegment DP54/V3-7 des Keimbahnlokus V3-07 nutzten. In den zufällig ausgewählten Klonen vor *biopanning* kam dieses Keimbahnsegment jedoch überhaupt nicht vor. In den CD-Regionen der schweren Kette dieser Klone kam es zu maximal einer Austauschmutation, was die Vermutung nahelegt, dass diese Klone nicht eine Antigenselektion durchlaufen haben, sondern vielleicht die Stimulation eines Superantigens außerhalb der antigenbindenden Region zur Vermehrung dieser Klone geführt hat. Leider ließ der zeitliche Rahmen dieser Dissertation nicht der Erstellung weiterer Phage Display Bibliotheken von Kawasaki-Patienten zu, so dass diese Beobachtung auch eine individuelle Besonderheit der von mir untersuchten Patientin sein kann. Im Vergleich der gewonnenen Sequenzen dieser Klone mit bereits bekannten Sequenzen aus Genbanken fand sich leider auch keine Homologie zu bekannten antiepithelialen Antikörpern. Aufgabe fortführender Arbeiten könnte hier die Etablierung eines ELISAs mit endothelialen Zellen sein, um die vielleicht vorhandene Interaktion dieser Klone mit Endothelzellen zu untersuchen und sie somit ursächlich mit der endothelialen Schädigung der Koronargefäße in Verbindung zu bringen. Die schweren Ketten von 5 der verbleibenden 6 IVIG-selektierten Klone der Phage Display Bibliothek vor Behandlung mit IVIG entstammten den Keimbahngenloki V3-23 und V3-30.

Die schweren Ketten der 10 IVIG-selektierten Fab-Phagen der Phage Display Bibliothek 2 Monate nach Behandlung mit IVIG entstammten alle bis auf 3 den Keimbahngenloki V3-23 und V3-30. Bereits in den anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Häufung dieser beiden Loki unter den IVIG-selektierten Fab-Phagen beobachtet werden. Obwohl diese beiden Keimbahngenloki im fetalen als auch im reifen Antikörperrepertoire am häufigsten genutzt werden, fand sich in den zufällig ausgewählten Klonen vor *biopanning* in dieser wie auch den vorangegangenen Arbeiten keine Präferenz von bestimmten Keimbahngenloki.

Somit stärkt auch diese Arbeit die Hypothese, dass IVIG vornehmlich mit den variablen Regionen der schweren Ketten, welche den Keimbahngenloki 3-23 und 3-30 entstammen, interagiert. Antikörper dieser beiden Keimbahngenloki spielen in der Regulation des natürlichen

Antikörperrepertoires eine besondere Rolle. Eine V-Region vermittelte Interaktion von IVIG mit membranständigen IgG-Rezeptoren, die in ihren schweren Ketten diese beiden Keimbängenloki nutzen, könnte zu einer Stimulation einer großen Anzahl von B-Zellen führen und somit die natürliche Hömostase des Antikörperrepertoires wieder herstellen und folglich die Bildung von Autoantikörpern unterdrücken. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die immunmodulatorische Langzeitwirkung von IVIG auch in der Therapie des Kawasaki-Syndroms.

6. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Gaedicke für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit bedanken, sowie für die Geduld und stete Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Peter Fischer danke ich für die Betreuung im Labor und die Möglichkeit, überwiegend selbständig zu arbeiten. Ganz besonderer Dank gebührt der MfLA Heike Lerch als „guter Geist“ des Labores für ihre geduldige Einarbeitung in die Mühen und Geheimnisse der Labortätigkeit. Weiterhin möchte ich mich bei Nina Jendreyko und Melanie Hoffmann bedanken für stete Aufmunterung und Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre finanzielle als auch nichtfinanzielle Unterstützung und Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Jörg Schindler für das Korrekturlesen dieser Arbeit .

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. Veröffentlichungen

Veröffentlichungen:

Stephan Leucht, Martina M. Uttenreuther-Fischer, Gerhard Gaedicke, Peter Fischer

The B Cell Superantigen-like Interaction of Intravenous Immunglobulin (IVIG) with Fab Fragments of V_H 3-23 and 3-30/3-30.5 Germline Gene Origin Cloned from a Patient with Kawasaki Disease is enhanced after IVIG Therapy

Clinical Immunology 2001, **99**:18-29

Abstracts:

Gerhard Gaedicke, Stephan Leucht, Rita Bunikowski, Rolf Keitzer, Martina M. Uttenreuther-Fischer, Peter Fischer

Cause of Kawasaki Disease: Dual Infection and Superantigen?

Poster: 6th International Symposium on Kawasaki disease 1998, Hawaii, USA

Stephan Leucht, Martina M. Uttenreuther-Fischer, Gerhard Gaedicke, Peter Fischer

Kawasaki disease : genetic origin of IgG antibodies specifically bound by intravenous immunoglobulin preparations

Poster: 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie 1999, Hannover

Stephan Leucht, Martina M. Uttenreuther-Fischer, Gerhard Gaedicke, Peter Fischer

Genetische Charakterisierung von IgG-Antikörpern aus Phagen-Display-Bibliotheken einer Patientin mit Kawasaki Syndrom vor und nach Behandlung mit IVIG

Poster: 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin 2000, Stuttgart

9. Literaturverzeichnis

1. **Kawasaki T.** 1967. Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children. *Arerugi (Jpn J Allergy)* **16**:178-222.[in Japanese]
2. **Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, et al.** 1974. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatrics* **54**:271-276.
3. **Falcini F.** 2006. Kawasaki disease (Vasculitis Syndrom). *Curr Opin in Rheumat* **18(1)**:33-38.
4. **Wang CL, Wu YT, Liu CA, et al.** 2005. Kawasaki disease: Infection, Immunity and Genetics. *Ped Infect Dis J* **24**:998-1004.
5. **Yeung, Rae SM.** 2005. Pathogenesis and treatment of Kawasaki's disease. *Curr Opin Rheumat* **17**:617-623.
6. **Oates-Whitehead RM, Baumer JH, Haines L et al.** 2003. Intravenous immunoglobulin for treatment of Kawasaki disease in children. *Cochrane Database Syst Rev.* **4**:CD004000.
7. **Burgner D, Hardner A.** 2005. Kawasaki disease: What is epidemiology telling us about the etiology. *Intern. J. of Infectious Diseases* **9**:185-194.
8. **Matsubara K, Fukaya T.** 2007. The role of superantigens of group A *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* in Kawasaki disease. *Curr Opin Infect Dis* **20**:298-303.
9. **Leung DY, Meissner C, Fulton D, Schlievert PM.** 1995. The potential role of bacterial superantigens in the pathogenesis of Kawaski syndrome. *J Clin Immunol* **15**:11S-17S.
10. **Matsubara K, Fukaya T, Miwa K, et al.** 2006. Development of serum IgM antibodies against superantigens of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* **143**:427-434.
11. **Janeway CA, Travers P.** 1995. Die Struktur des Antikörpermoleküls und der Immunoglobulingene, p. 115-158. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), *Immunologie*.
12. **Janeway CA, Travers P.** 1995. Grunbegriffe der Immunologie, p. 1-43. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), *Immunologie*.
13. **Kraj P, Rao SP, Glas AM, Hardy RR, Milner EC, Silberstein LE.** 1997. The human heavy chain Ig V region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *J Immunol* **158**:5824-5832.
14. **Potter KP, Capra JD.** 1995. Immunoglobulin variable region gene segments in human autoantibodies, p. 379-392. In T. Honjo and F.W. Alt (ed.), *Immunoglobulin Genes*.

16. **Shiokawa S, Mortari F, Lima JO, Nunez C, Bertrand FE, Kirkham PM, Zhu S, Dasanayake AP, Schroeder HWJ.** IgM heavy chain complementarity-determining region 3 diversity is constrained by genetic and somatic mechanisms until two months after birth.
15. **Janeway CA, Travers P.** 1995. Die adaptive Immunantwort, p. 281-389. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), Immunologie.
18. **Sönnichsen N, Apostoloff E.** 1992. Immunologische Grundlagen, N. Sönnichsen and E. Apostoloff (ed.), Autoimmunkrankheiten.
17. **Casali P, Schettino EW.** 1996. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol*
19. **Janeway CA, Travers P.** 1995. Die Entwicklung des Lymphozytenrepertoires, p. 209-278. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), Immunologie.
20. **Kearney JF, Bartels J, Hamilton AM, Lehuen A, Solvason N, Vakil M.** 1992. Development and Function of the Early B Cell Repertoire. *Int.Rev.Immunol.* **8**:247-257.
21. **Kaveri S, Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Kazatchkine M.** 1998. Human Natural Autoantibodies: Lessons from Physiology and Prospects for Therapy. *The Immunologist* 227-233.
22. **Ronda N, Hurez V, Kazatchkine MD.** 1993. Intravenous immunoglobulin therapy of autoimmune and systemic inflammatory diseases. *Vox Sang.* **64**:65-72.
23. **Cohen IR, Young DB.** 1991. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol.Today*
24. **Burnet FM.** 1959. The Clonal Selection Theorie of Aquired Immunity, p. 209pAnonymous
25. **Janeway CA, Travers P.** 1995. Kontrolle und Manipulation der Immunantwort, p. 541-597. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), Immunologie.
26. **Logtenberg T, Schutte ME, Ebeling SB, Gmelig-Meyling FH, van Es JH.** 1992. Molecular approaches to the study of human B-cell and (auto)antibody repertoire generation and selection. *Eur.J.Immunol.*
27. **Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW.** 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4+T Cells. *Science* **271**:1276-1278
28. **Willimiams N.** 1996. T Cell Inactivation linked to Ras Block. *Science* **271**:1234
29. **Müller-Ruchholz W.** 1991. Konzepte immunologischer Autoreaktivität. *Jahrbuch für Dermatologie*:13-20
30. **Adams D.** 1996. How the immune system works and why it causes autoimmune diseases. *Immunol.Today* **17**:300-302.

31. **Janeway CA, Travers P.** 1995g. Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion, p. 489-540. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), Immunologie.
32. **Fischer P, Gaedicke G.** 1995. Molekulare Immunologie: Neue Konzepte zur Ätiologie und Therapie von Autoimmunerkrankungen in der Pädiatrie, p. 81-99. In AnonymousJaubuch der Kinderheilkunde.
33. **Naparstek Y, Plotz PH.** The role of autoantibodies in autoimmune disease.
34. **Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA.** 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* **17**:435-466.
35. **Proft T, Fraser JD.** 2003. Review: Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* **133**:299.
36. **Krakauer T.** 1999. Immune response to staphylococcal superantigens. *Immunol Res* **20**:163-173.
37. **Zamoyska R.** 2006. How Superantigens: supersignalers? *Sci STKE* **358**:pe45.
38. **Bueno C, Criado G, McCormick JK, Madrenas J.** 2007. T cell signalling induced by bacterial superantigens. *Chem Immunol Allergy* **93**:161-180.
39. **Baker MD, Acharya KR.** 2004. Superantigens: Structure-function relationship. *Int J Med Microbiol* **293**:529-537.
40. **Alouf JE, Muller-Alouf H.** 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* **292**:429-440.
41. **Krakauer T.** 2005. Chemotherapeutics targeting immune activation by staphylococcal superantigens. *Med Sci Monit* **11**:RA290-5.
42. **Proft T, Fraser JD.** 2007. Streptococcal superantigens. *Chem Immunol Allergy* **93**:1-23.
43. **Racke M, Quigley L, Canella B et al.** 1994. Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis: activation of anergy determines outcome. *J Immunol* **152**:2051-9.
44. **Schiffenbauer J, Johnson H, Butfiloski E et al.** 1993. Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Ac Sci USA* **90**:8543-6.
45. **Goodyear CS, Silverman GJ.** 2005. B cell superantigens: a microbe's answer to innate-like b cells and natural antibodies. *Springer Semin Immun* **26**:463-484.
46. **Wahn V, Eibl M, Späth P.** 1999. Anwendung polyvalenter intravenöser Immunglobuline in der Pädiatrie. *Monatsschr.Kinderheilkd.* 293-297.
47. **Gaedicke G.** 1994. Childhood autoimmune thrombocytopenia: to treat or not to treat, p. 129-139. In A.H. Sutor and K. Thomas (ed.), Thrombocytopenia in childhood. Schattauer Verlag, Stuttgart.

48. **Imbach P, Wagner HP, Berchthold W, Gaedicke G, Hirt A, Joller P, Baradun S.** 1985. Intravenous immunoglobulin versus oral corticosteroids in acute immune thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* **2**:464-468.
49. **Debre M, Bonnet MC, Fridman WH.** 1993. Infusion of Fc fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. First international workshop on: "Platelets, endothelial cells: from autoimmunity to immunomodulation". (Abstract)
50. **Berchthold P, Dale GL, Tani P, McMillan R.** 1989. Inhibition of autoantibody binding to platelet glycoprotein IIb/IIIa by anti-idiotypic antibodies in intravenous gammaglobulin. *Blood* **74**:2414-2417.
53. **Rossi F, Dietrich G, Kazatchkine MD.** 1989. Anti-idiotypes against autoantibodies in normal immunoglobulins: evidence for network regulation of human autoimmune responses. *Immunol Rev.* **110:135-49**:135-149.
55. **Kazatchkine MD, Coutinho A.** 1993. Clonal taxonomy versus network physiology - are lymphocytes concerned with our definition of idiotypes? *Immunol. Today* **14**:513-515.
56. **Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Spalter SH, Kaveri S, Kazatchkine M.** 1996. Immunoglobulins and the regulation of autoimmunity through the immune network. *Clin. Exp. Rheumatol.* **14**:S9-S15
57. **Fischer P, Uttenreuther-Fischer MM, Gaedicke G.** 1996. Superantigen in the aetiology of kawasaki disease. *Lancet* **348**:202.
58. **Kaul M, McGeer A, Norrby-Teglund A, Kotb M, Schwartz B, O'Rourke K, Talbot J, Low DE.** 1999. Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome-a comparative observational study. *Clin Infect Dis* **28(4)**:800-7
59. **Barbas CF, Burton DR.** Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries. 1993. The Scripps Research Institute, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037. (GENERIC)
Ref Type: Pamphlet
60. **Burton DR, Barbas CF.** 1992. Antibodies from libraries [letter; comment]. *Nature* **359**:782-783.
61. **Burton DR, Barbas CF.** 1994. Human Antibodies from Combinatorial Libraries. *Advances in Immunology* **57**:191-280.
62. **Carson DA.** 1992. Genetic factors in the etiology and pathogenesis of autoimmunity. *The FASEB Journal* **6**:2800-2805.
63. **Fischer P.** 1996. Expression des humanen Antikörperrepertoires mit Bakteriophagen: Techniken, Anwendungen und Perspektiven. *Biospektrum* **2**:26-29.
65. **Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH.** 1988. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**:1041-1043.

66. **Skerra A, Pluckthun A.** 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fvfragment in *escherichia coli*. *Science* **240**:1041
67. **Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA.** 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [see comments]. *Science* **246**:1275-1281.
68. **Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ.** 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gen III site. *Proc Natl Acad Sci USA* **88(18)**:7978-82.
69. **Lerner RA, Barbas CF, Kang AS, Burton DR.** 1991. On the use of combinatorial antibody libraries to clone the "fossil record" of an individual's immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* **88(21)**:9705-6.
70. **Janeway CA, Travers P.** 1995g. Die Antigenerkennung, p. 115-158. In C.A. Janeway and P. Travers (ed.), *Immunologie*.
71. **Fischer P.** Molekulare Charakterisierung humaner Autoantikörper durch kombinatorische Phagen Display-Bibliotheken. 1997. Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
72. **Tomlinson I M, Williams SC, Ignatovich O, Corbett SJ, Winter G.** V BASE sequence directory. 1998. (GENERIC)
Ref Type: Internet Communication
73. **Jendreyko N, Uttenreuther-Fischer MM, Lerch H, Gaedicke G, Fischer P.** 1998. Genetic origin of IgG antibodies cloned by Phagen Display and antiidiotypic panning from three patients with autoimmune thrombocytopenia. *Eur.J.Immunol.* **28**:4236-4247.
74. **Fischer P, Jendreyko N, Hoffmann M, Lerch H, Uttenreuther-Fischer MM, Chen PP, Gaedicke G.** 1999. IgG platelet autoantibodies cloned by Phagen Display from three patients with autoimmune thrombocytopenia reveal differences between chronic and transient disease. *Br.J.Haematol.* **105**:626-640.
75. **Burton DR, Barbas CF, Persson MA, Koenig S, Chanock RM, Lerner RA.** 1991. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic, seropositive individuals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**:10134-10137.
76. **Hoogenboom HR, Winter G.** 1992. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J.Mol.Biol.* **227**:381-388.
77. **Williamson RA, Burioni R, Sanna PP, Partridge LJ, Barbas CF, Burton DR.** 1995. Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**:4141-4145.

78. **Barbas SM, Ditzel HJ, Salonen EM, Yang WP, Silverman GJ, Burton DR.** 1995. Human autoantibody recognition of DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**:2529-2533.
79. **Escher R, Muller D, Vogel M, Miescher S, Stadler BM, Berchtold P.** 1998. Recombinant human natural autoantibodies against GPIIb/IIIa inhibit binding of autoantibodies from patients with AITP. *Br.J.Haematol.* **102**:820-828.
80. **Graus YF, Debaets MH, Parren PWHI, Berrihaknin S, Wokke J, Vriesman PJV, Burton DR.** 1997. Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived Phagen Display libraries from Myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies. *J.Immunol.* **158**:1919-1929.
81. **Portolano S, Prummel MF, Rapoport B, McLachlan SM.** 1995. Molecular cloning and characterization of human thyroid peroxidase autoantibodies of lambda light chain type. *Mol.Immunol.* **32**:1157-1169.
82. **Roben P, Barbas SM, Sandoval L, Lecerf JM, Stollar BD, Solomon A, Silverman GJ.** 1996. Repertoire cloning of lupus anti-DNA autoantibodies. *J.Clin.Invest.* **98**:2827-2837.
83. **Schier R, Bye J, Apell G, McCall A, Adams GP, Malmqvist M, Weiner LM, Marks JD.** 1996. Isolation of high-affinity monomeric human Anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J.Mol.Biol.* **255**:28-43.
84. **Duchosal MA, Eming SA, Fischer P, Leturcq D, Barbas CF, McConahey PJ, Caothien RH, Thornton GB, Dixon FJ, Burton DR.** 1992. Immunization of hu-PBL-SCID mice and the rescue of human monoclonal Fab fragments through combinatorial libraries. *Nature* **355**:258-262.
85. **Chazenbalk GD, Portolano S, Russo D, Hutchison JS, Rapoport B, McLachlan S.** 1993. Human organ-specific autoimmune disease. Molecular cloning and expression of an autoantibody gene repertoire for a major autoantigen reveals an antigenic immunodominant region and restricted immunoglobulin gene usage in the target organ. *J Clin Invest* **92**:62-74.
86. **Hoffmann M, Uttenreuther-Fischer MM, Lerch H, Gaedicke G, Fischer P.** 2000. IVIG-bound IgG and IgM cloned by phage display from a healthy individual reveal the same restricted germ-line gene origin as in autoimmune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol.* **121**(1):37-46.
87. **Knappik A, Plückthun A.** 1995. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **8**:81-89.
88. **Krebber A, Burmester J, Plückthun A.** 1996. Inclusion of an upstream transcriptional terminator in Phagen Display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene* **178**:71-74.
89. **Suzuki I, Pfister L, Glas A, Notenburg C, Milner EC.** 1995. Representation of rearranged VH gene segments in the human adult antibody repertoire. *J Immunol.* **154**(8):3902-11.

90. **de Wildt RM, Hoet RM, vanVenrooij WJ, Tomlinson IM, Winter G.** 1999. Analysis of Heavy and Light Chain Pairings Indicates that Receptor Editing Shapes the Human Antibody Repertoire. *J.Mol.Biol.* **285**:895-901.
91. **Huang SC, Stollar BD.** 1993. A Majority of Ig H Chain cDNA of Normal Human Adult Blood Lymphocytes Resembles cDNA for Fetal Ig and Natural Antibodies. *J Immunol* **151**:5290-5300.
92. **Huang SC, Jiang RH, Glas AM, Milner ECB.** 1996. Non-stochastic utilization of Ig V region genes in unselected human peripheral B cells. *Mol.Immunol.* **33**:553-560.
93. **Rao SP, Riggs JM, Friedman DF, Scully MS, LeBien TW, Silberstein LE.** 1999. Biased VH gene usage in early lineage B cells: evidence for preferential Ig gene rearrangement in the absence of selection. *J Immunol.* **163(5)**:2732-40.
94. **Guo J, Mcintosh RS, Czarnocka B, Weetman AP, Rapoport B, McLachlan SM.** 1998. Relationship between autoantibody epitopic recognition and immunoglobulin gene usage. *Clin.Exp.Immunol.* **111**:408-414.
95. **Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD.** 1992b. Modulation of autoimmunity by intravenous immune globulin through interaction with the function of the immune/idiotypic network. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **62**:S73-S81
96. **Coutinho A.** 1995. The network theory: 21 years later. *Scand.J.Immunol.* **42**:3-8.
97. **Hurez V, Kaveri SV, Kazatchkine MD.** 1993. Expression and control of the natural autoreactive IgG repertoire in normal human serum. *Eur.J.Immunol.* **23**:783-789.
98. **Hurez V, Kazatchkine MD, Vassilev T, Ramanathan S, Pashov A, Basuyaux B, Dekozak Y, Bellon B, Kaveri SV.** 1997. Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease. *Blood* **90**:4004-4013.
99. **Mouthon L, Kaveri SV, Spalter SH, Lacroix-Desmazes S, Lefranc C, Desai R, Kazatchkine MD.** 1996. Mechanisms of action of intravenous immune globulin in immune-mediated diseases. *Clin.Exp.Immunol.* **104**:3-9.
100. **Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD.** The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life.

Erklärung

„Ich, Stephan Leucht, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Klonierung und molekulare Charakterisierung humaner, monoklonaler Antikörper einer Patientin mit Kawasaki-Syndrom vor und nach Behandlung mit IVIG mittels kombinatorischer Phagen Display Bibliothek“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift