

# **Pathogenität rekombinanter Anti-Desmoglein-3- Antikörper in humanen Keratinozyten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Yad Galaly

aus Erbil

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**  
Biochemisches Institut

Gutachterin und Betreuerin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen  
Gutachterin: Frau PD Dr. Ahlemeyer, Barbara

Tag der Disputation: 07. Januar 2025

*Für meine Mutter*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DESMOSOMEN .....	1
1.1.1	<i>Struktur und Funktion .....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine.....</i>	<i>4</i>
1.2	PEMPHIGUS .....	5
1.2.1	<i>Allgemeines zur Erkrankung Pemphigus .....</i>	<i>5</i>
1.2.2	<i>Pathogenese .....</i>	<i>6</i>
1.2.3	<i>Therapeutische Ansätze.....</i>	<i>10</i>
1.3	DER NEONATALE FC-REZEPTOR (FcRn) .....	11
1.3.1	<i>Struktur.....</i>	<i>11</i>
1.3.2	<i>IgG-Homöostase .....</i>	<i>13</i>
1.3.3	<i>Fc-Engineering zur Modulation der Affinität zu FcRn.....</i>	<i>15</i>
1.3.4	<i>Efgartigimod (Argx113).....</i>	<i>17</i>
1.4	ANWENDUNG VON REKOMBINANTEN ANTIKÖRPERN IN DER FORSCHUNG AN PEMPHIGUS .....	19
1.5	ZIELE DER ARBEIT.....	21
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN.....</b>	<b>22</b>
2.1	TECHNISCHE INSTRUMENTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	22
2.2	CHEMIKALIEN .....	26
2.3	PUFFER.....	29
2.4	ENZYME .....	30
2.5	ANTI-KÖRPER .....	31
2.5.1	<i>Für die Western Blot Analyse verwendete primäre und sekundäre Antikörper .</i>	<i>31</i>
2.5.2	<i>Monoklonale pathogene Anti-Dsg3-Antikörper mit unterschiedlichen Fc- Varianten.....</i>	<i>31</i>
2.5.3	<i>Antikörperfragmente .....</i>	<i>34</i>
2.6	ZELLINIE .....	35
2.7	SOFTWARE .....	35
2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	35
2.9	DENSITOMETRISCHE ANALYSE MITTELS IMAGEJ .....	35
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>36</b>

3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	36
3.1.1	<i>Kultivieren der hTert-Zellen</i> .....	36
3.1.2	<i>Passagieren der hTert-Zellen</i> .....	36
3.1.3	<i>Zählung der hTert-Zellen</i> .....	36
3.1.4	<i>Kultivierung der hTert-Zellen mit den Anti-Dsg3-Antikörpern</i> .....	37
3.1.5	<i>Monolayer-Dissoziationsversuch</i> .....	37
3.2	BIOCHEMISCHE METHODEN .....	38
3.2.1	<i>Herstellen der Proteinlysate</i> .....	38
3.2.2	<i>Bradford-Proteinbestimmung</i> .....	38
3.2.3	<i>SDS-PAGE und Western Blot</i> .....	39
3.2.4	<i>Immundetektion</i> .....	40
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
4.1	WIRKUNG VON REKOMBINANTEN ANTI-DSG3-ANTIKÖRPERN (HAK23 IGG1) AUF DIE INTERZELLULÄRE ADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN .....	41
4.2	VERGLEICH DER AUSWIRKUNG VOM REKOMBINANTEN MAUS-ANTI-DSG3-ANTIKÖRPER (MAK23) UND HUMANEN-ANTI-DSG3-ANTIKÖRPER (HAK23) AUF DIE INTERZELLULÄRE ADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN .....	44
4.3	WIRKUNG DER REKOMBINANTEN ANTI-DSG3-ANTIKÖRPER (HAK23/MAK23) AUF DEN RELATIVEN DSG3-PROTEINLEVEL IN hTERT-ZELLEN .....	46
4.4	DIE ROLLE VON FcRN IN DER PATHOGENESE VON PEMPHIGUS.....	48
4.4.1	<i>Wirkung verschiedener hAK23 Fc-Varianten auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten</i> .....	48
4.4.2	<i>Wirkung von bivalentem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment auf die interzelluläre Zelladhäsion in Keratinozyten</i> .....	51
4.4.3	<i>Wirkung der AK23 Fc-Varianten und der F(ab')<sub>2</sub> auf den Dgs3-Proteinlevel in hTert-Zellen</i> .....	54
4.5	WIRKUNG VON EFGARTIGIMOD AUF DIE INTERZELLULÄRE ZELLADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN.....	56
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
5.1	VERSUCHSANORDNUNG .....	59
5.2	DER IGG-SUBTYP HAT KEINEN SIGNIFIKANTEN EFFEKT AUF DIE PATHOGENITÄT VON ANTI-DSG3-ANTIKÖRPERN .....	61

5.3	DER MURIN-REKOMBINANTE MAK23-ANTIKÖRPER IST WENIGER PATHOGEN ALS DIE ENTSPRECHENDE VARIANTE MIT DER HUMANEN FC-REGION .....	63
5.4	DIE AFFINITÄT DER ANTI-DSG3-ANTIKÖRPER ZUM FCRN BEEINFLUSST DIE PATHOGENITÄT .....	65
5.5	DIE PATHOGENITÄT VON ANTI-DSG3-ANTIKÖRPERN KORRELIERT NICHT MIT DEM RELATIVEN DSG3-PROTEINSPIEGEL.....	67
5.6	EFGARTIGIMOD HAT EINE STABILISIERENDE WIRKUNG AUF DIE INTERZELLULÄRE ADHÄSIONSKRAFT VON hTERT-ZELLEN.....	69
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>73</b>
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	73
8.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	76
8.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	77
8.4	LITERATURVERZEICHNIS .....	78
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>94</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Desmosomen

### 1.1.1 Struktur und Funktion

Erstmalig erwähnte Josef Schaffer 1920 den Begriff „Desmosomen“, der sich aus dem griechischen Wort „*desmo*“ für Bindung und „*soma*“ für Körper zusammensetzt. Diese geordneten Membrandomänen vermitteln sowohl die Zell-Zelladhäsion als auch die Verbindung mit dem Zytoskelett, um so physische Kräfte im Zellverband gleichmäßig zu verteilen und den Zusammenhalt der Zellen zu ermöglichen. Sie sind vor allem in Gewebe präsent, das hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt ist. Hierzu gehören neben der Haut die Blase, Magen-Darm-Schleimhaut und der Herzmuskel (Delva et al., 2009). Bei näherer ultrastruktureller Betrachtung der Desmosomen lassen sie sich als dichte Strukturen mit einem Durchmesser von 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  abbilden (Kowalczyk et al., 2013). Zudem sind sie in drei morphologische Bereiche zu unterteilen: einer extrazellulären Kernregion (Desmoglea), welche für die Zell-Zelladhäsion verantwortlich ist, und einer intrazellulären Zone mit einer äußeren und einer inneren dichten Plaque, bestehend aus den Keratin-Intermediärfilamenten und weiteren Proteinen (Delva et al., 2009; Kowalczyk et al., 2013). Die Struktur der Desmosomen wird von den desmosomalen Cadherinen und den Proteinen der Plakin- und Armadillo-Familie bestimmt (Abbildung 1).

Zu den desmosomalen Cadherinen gehören zwei Transmembranproteine: die Desmogleine (Dsg) mit vier Isotypformen (Dsg1-Dsg4) und die Desmocolline (Dsc) mit drei Isotypformen (Dsc1-Dsc3) (Hatzfeld, 2007). Die für die Zell-Zelladhäsion wichtige extrazelluläre Domäne (ECD) der desmosomalen Cadherine wird durch die Bindung der N-terminalen Domänen zweier angebundener Zellen ermöglicht. Zudem bedarf es einer stabilisierenden Funktion von Kalzium für die Bindung der transmembranösen Glykoproteine (Waschke, 2008). So kommt es durch die Zufuhr von Kalziumionen ( $\text{Ca}_{2+}$ ) in einer höheren Konzentration zur vermehrten Dsg-Expression und zur Stabilisierung der interzellulären Haftung, während eine geringe  $\text{CaCl}_2$ - Konzentration zu mangelhafter Zelladhäsion zwischen zwei benachbarten Zellen führt (Green et al., 2010). Für die Bindung am Zytoskelett benötigen die Desmosomen die sich im Zytosol befindenden Mediatorproteine, wie die Plakoglobine und Plakophiline aus der Armadillo-Familie. Sie binden sowohl an die intrazelluläre Domäne der desmosomalen Cadherine,

welche die äußere Plaqueregion (ÄPR) darstellt, und an die Keratin-Intermediärfilamente des Zytoskeletts durch ein weiteres Verankerungsprotein. Das Verankerungsprotein bildet hierbei das in zwei Isoformen vorkommende Desmoplakin aus der Plakin-Proteinfamilie. Es besitzt zudem drei unterteilbare und aneinandergrenzende Domänen, mit denen es unterschiedliche Funktionen ausführen kann (D. Garrod & Chidgey, 2008). So kann die N-terminale Domäne mit den im Zytosol vorhandenen Plaquelproteinen eine Bindung eingehen, während die C-terminale Domäne an den Keratin-Intermediärfilamenten anknüpft und die innere Plaqueregion (IPR) bildet. Durch diese Verbindungen entsteht eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen dem Zytoskelett und der Plasmamembran (Garrod & Chidgey, 2008; Waschke, 2008a; Abbildung 1).

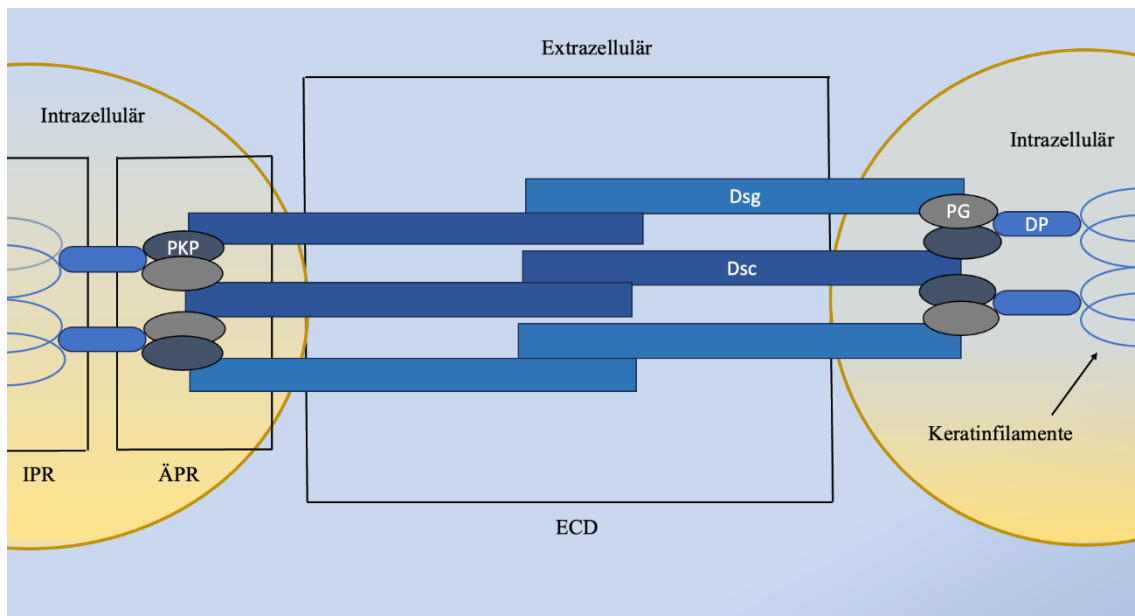


Abbildung 1: Desmosomaler Aufbau (modifiziert nach Delva et al., 2009)

Die desmosomalen Adhäsionsproteine Dsg (blau) und Dsc (dunkelblau) sind in der Zellmembran integriert. Mit ihrer extrazellulären Domäne (ECD) können sie die Verbindung zu benachbarten Zellen herstellen. Innerhalb der Zelle bilden die desmosomalen Cadherine mit dem Ankerprotein, Desmoplakin (DP), und den Mediatorproteinen, Plakophilin (PKP) und Plakoglobin (DP), die äußere Plaqueregion (ÄPR). Die Verbindung von DP zum Zytoskelett (Keratinfilamente) bildet dabei die innere Plaqueregion (IPR). Diese intrazelluläre Verbindung erscheint unter dem Mikroskop als zytoplasmatische Plaque.

Die strukturellen Komponenten der Dsc/Dsg bestehen aus mehreren extrazellulären und intrazellulären Domänen, die in der Zellmembran verankert sind. Die vier extrazellulären Domänen sind hochkonserviert und wichtig für die Bindung an Nachbarzellen (Harrison et al., 2016). Eine fünfte Domäne, die unter der Bezeichnung „extracellular anchor“ (EA) bekannt ist, befindet sich in der Nähe der Plasmamembran. Die Membran wird hierbei

durch die Transmembrandomäne (TM) der desmosomalen Cadherine durchdrungen. Innerhalb der Zelle sind Ankerdomänen (IA) vorhanden. Hierauf folgt bei Dsg und der längeren a-Form von Dsc eine intrazelluläre cadherinähnliche Sequenz (ICS) im Gegensatz zur kürzeren b-Form von Dsc, in der diese ICS fehlt. An die Dsg-Domänen innerhalb der Zelle schließen zusätzlich noch der intrazelluläre prolinreiche Linker (IPL) und die Repeat-Unit-Domäne (RUD), welche je nach Dsg-Isoform variiert, und eine Desmoglein-terminale Domäne (DTD) an (Delva et al., 2009; Abbildung 2).

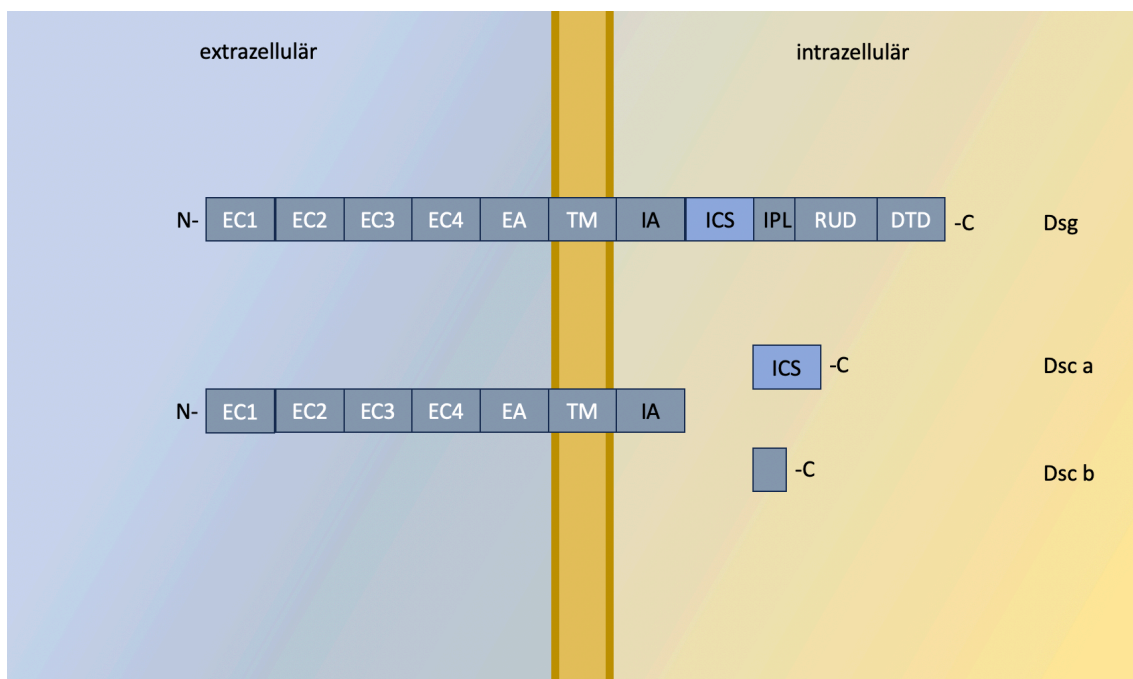


Abbildung 2: Desmosomale Domänenstruktur (modifiziert nach Delva et al., 2009)

Dsg and Dsc besitzen fünf EC-Domänen (EC1-5), die durch die transmembranöse Domäne (TM) an die intrazelluläre Region angebunden sind. Die EC-Domäne ist sowohl für Dsg als auch für Dsc gleich, jedoch unterscheiden sie sich in der intrazellulären Region, denn es folgt bei den Desmogleinen nach der intrazellulären Ankerdomäne (IA) eine intrazelluläre cadherin-like sequence (ICS). Sie stellt eine Andockstelle für weitere Mediatorproteine dar, wie den prolinreichen Linker (IPL), Repeat-Unit-Domänen (RUD) und eine Desmoglein-terminale Domäne (DTD). Hingegen schließt sich eine ICS nur bei manchen Formen bei den Desmocollinen (Dsc a) nach dem intrazellulären Bereich an, wodurch sie generell eine kürzere Struktur aufweisen.

### 1.1.2 Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine

Dsg und Dsc zeigen unterschiedliche Expressionsmuster in verschiedenen Geweben (Waschke, 2008). Primär kommen Dsg2 und Dsc2 in allen Geweben mit desmosomalen Cadherinen vor, im Gegensatz zu anderen Unterformen, die spezifisch in den unterschiedlichen Epithelschichten vorhanden sind (Dusek et al., 2007; Harrison et al., 2016). Dagegen treten Dsc3/Dsg3 und Dsc1/Dsg1 zahlreich in unterschiedlichen Schichten der Epidermis auf. Während Dsc3/Dsg3 im proliferativen Stratum basale und Stratum spinosum vorhanden sind, findet sich Dsc1/Dsg1 in den höher liegenden Schichten der Epidermis (Stratum corneum und Stratum granulosum). Dsc2/Dsg2 hingegen sind vor allem in der unteren Region der Epidermis basal des Stratum spinosum, wiederzufinden (Waschke, 2008). Vergleichbar mit den oben liegenden Dsc1/Dsg1 tritt das Dsc4/Dsg4 ebenfalls vorwiegend in den cornealen Schichten der Epidermis in Erscheinung. Das unterschiedliche Vorkommen der desmosomalen Cadherine überlappt sich in den verschiedenen Epidermisschichten, sodass mehrere Isoformen pro Epithelschicht vorhanden sein können (Dusek et al., 2007; Abbildung 3).

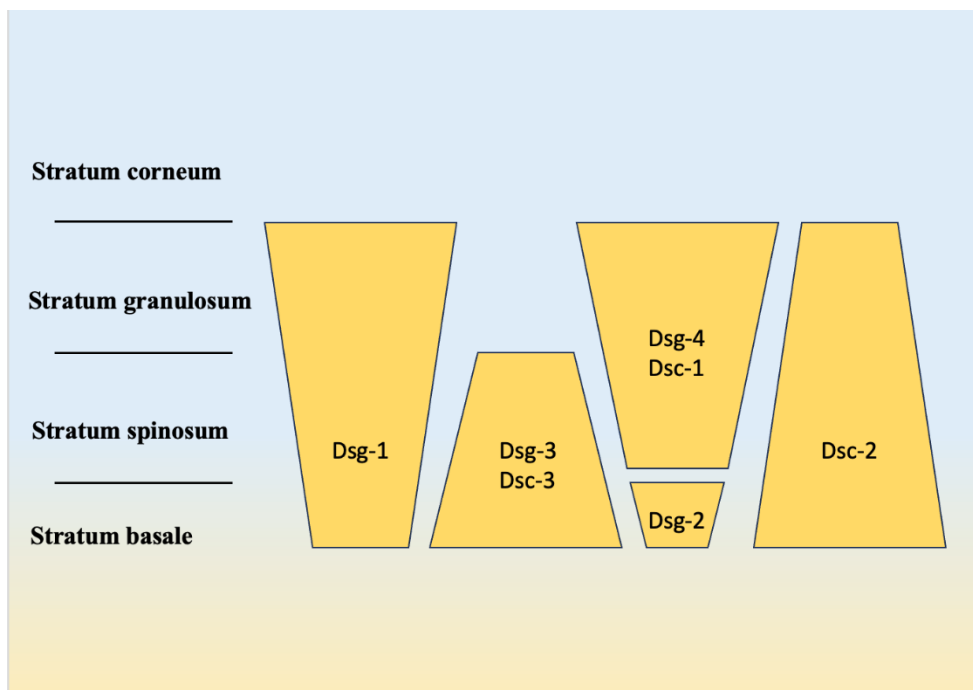


Abbildung 3: Expressionsmuster desmosomaler Cadherine (modifiziert nach Waschke, 2008)

Die Epidermisschichten (links) und die Verteilung der Desmosom-Cadherine (gelbe Balken), Desmogleine 1-4 (Dsg1-4) und Desmocolline 1-3 (Dsc1-3) sind entsprechend dem Gradienten dargestellt.

Aufgrund der überlappenden Erscheinungsweise, die für die Epidermisschicht spezifisch ist, sind die desmosomalen Cadherine für die Zelladhäsion sowohl als Desmocolline als auch Desmogleine essenziell, sodass ein Mangel an bereits eines der transmembranösen Glykoproteine zu reduzierten Zellhaftungsmechanismen führen kann. Diese Zellhaftungsprozesse sind trotz der bekannten Grundstruktur der EC-Domänen der Desmosomen und den damit verbundenen Haftungsinteraktionen derzeit Gegenstand der Forschung (Dusek et al., 2007; Harrison et al., 2016; Waschke, 2008). Auch die Bindung desmosomaler Cadherine gleicher Art (homophil) und unterschiedlicher Art (heterophil) bedarf weiterer Studien (Kowalczyk & Green, 2013).

## **1.2 Pemphigus**

### *1.2.1 Allgemeines zur Erkrankung Pemphigus*

Der Begriff „Pemphigus“ leitet sich vom griechischen Wort „pemphix“ ab, was übersetzt „Blase“ bedeutet (van der Wier et al., 2023). Bei der chronischen Autoimmunkrankheit Pemphigus handelt es sich um eine lebensbedrohliche Immunopathie, bei der die Betroffenen an Haut- und Schleimhaut-belastenden bullösen und erosiven Symptomen leiden, die mit einer bakteriellen Superinfektion einhergehen können (Nguyen et al., 2000; Payne et al., 2004; Stanley et al., 1999). Die Krankheit beschrieb Stephen Dickson bereits 1788, der orale Manifestationen der Krankheit bei einem Patienten entdeckt hatte (van der Wier et al., 2023).

Die Prävalenz für Pemphigus vulgaris wird derzeit laut Hübner et al. (2014) auf 148 Fälle pro Million Personen geschätzt, während sie im Jahr 2015 auf 53 Fälle pro Million Kinder und/oder Jugendliche sank, und PV gehört somit zu den seltenen Erkrankungen (Hübner et al., 2020, 2016). Hohe Inzidenzen zeigen sich vor allem im Mittelmeerraum bei den Ashkenazi-Juden, bei denen sechs bis 32 Fälle pro 1 Million Einwohner jährlich auftreten. Die Krankheit ist zudem geschlechtsunspezifisch und wurde anhand von verschiedenen bekannten Krankheitsformen beschrieben: Zu diesen gehören der Pemphigus vulgaris (PV), Pemphigus foliaceus (PF), paraneoplastische Pemphigus (PP), der Pemphigus herpetiformis (PH) und der Immunglobulin A (IgA) Pemphigus (IP). Erstere (PV) stellt dabei die häufigste Pemphigusform dar, die ca. 70 % der Fälle ausmacht. Zudem ist diese

mit einem schweren Verlauf der Krankheit verbunden (Joly & Litrowski, 2011; Kridin & Schmidt, 2021; Porro et al., 2019).

### *1.2.2 Pathogenese*

Pemphigus vulgaris wird vorwiegend durch Autoantikörper ausgelöst, welche der Immunoglobulin G (IgG)-Klasse angehören und gegen Dsg1 und/oder Dsg3 gerichtet sind. So kommt es zum Verlust der interzellulären Adhäsion durch die angeriffenen desmosomalen Cadherine auf den Keratinozytenoberflächen. Klinisch manifestiert sich dieser pathogene Prozess in Form von Blasen, die mit schmerzhaften Erosionen einhergehen (Amagai et al., 1999; Porro et al., 2019).

Für ein besseres Verständnis der Pathogenese ist es zunächst von wesentlicher Bedeutung, die Antikörper Struktur zu veranschaulichen: Alle Immunglobuline vom Typ G bestehen aus vier Polypeptidketten: zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die schweren Ketten haben eine variable (VH) und drei konstante Domänen (CH1, CH2, CH3) und sind in der Scharnierregion miteinander verbunden, während jede leichte Kette eine konstante (CL) und eine variable (VL) Domäne besitzt und mit einer schweren Kette verbunden ist. Der Antikörper hat zwei identische antigenbindende Fragmente (Fab) und einen Fc-Teil, der die CH2- und CH3-Domänen enthält und für die Bindung an Fc-Rezeptoren zuständig ist. IgGs sind in vier Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) unterteilt, wobei IgG1 am häufigsten im Serum vorkommt (Teicher & Chari, 2011).

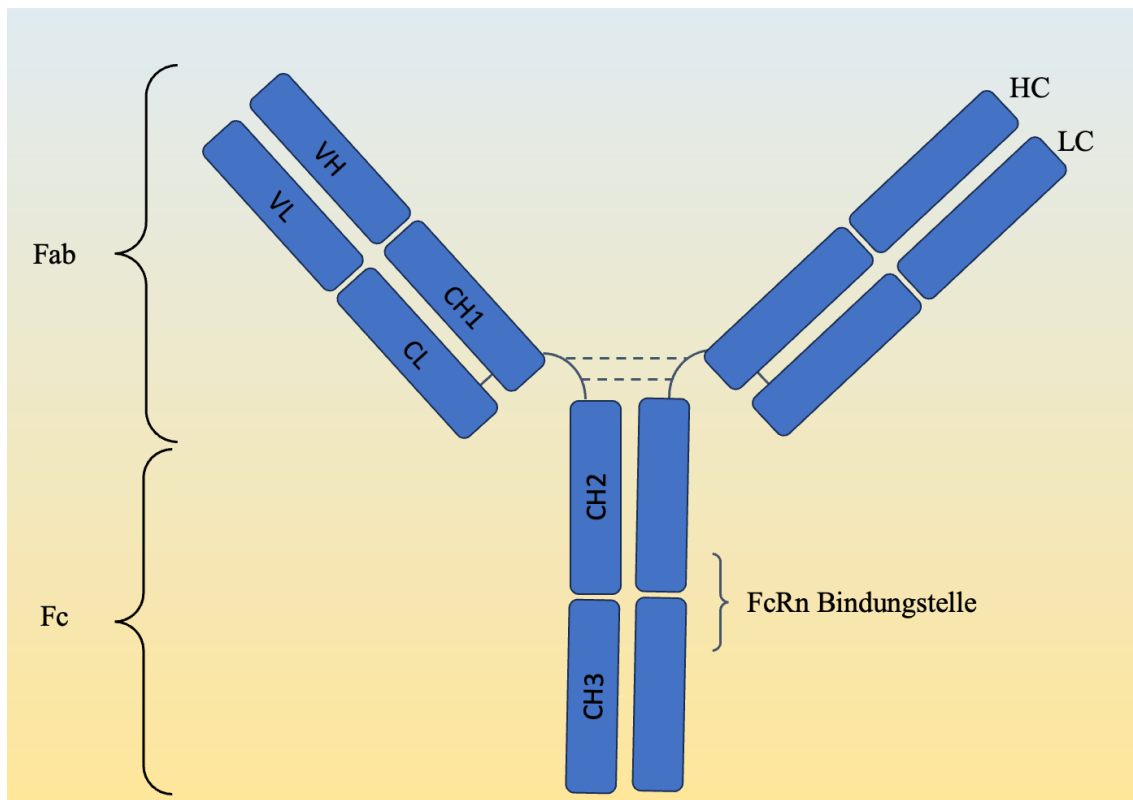


Abbildung 4: Struktur von Immunglobulin G (modifiziert nach Hussain et al., 2021)

Die IgG-Struktur besteht aus zwei identischen schweren (HC) und leichten Ketten (LC). Die schwere Kette hat drei konstante (CH1, CH2, CH3) und eine variable Domäne (VH), während die leichte Kette aus einer konstanten (CL) und einer variablen Domäne (VL) besteht. Das antigenbindende Fragment (Fab) entsteht aus der leichten Kette und der CH1- sowie VH-Domäne der schweren Kette. Der dorsale Abschnitt besteht aus den CH2- und CH3-Domänen und bildet das kristallisierbare Fragment (Fc).

Die vier IgG-Subklassen stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 90 Prozent überein. Die Hauptunterschiede, befinden sich in der N-terminalen CH2-Domäne des Fc-Bereiches und in dem benachbarten Scharnierbereich (Vidarsson et al., 2014). Mit 15 Aminosäuren hat IgG1 eine sehr flexible Scharnierregion, während IgG2 und IgG4 weniger flexibel sind. IgG3 hat die längste und somit flexibelste Scharnierregion und das höchste Molekulargewicht unter den IgG-Subklassen. Die Flexibilität beeinträchtigt nicht nur die Bindungsstellen, sondern auch die Antigenbindung und die damit verbundene Ausbildung von Immunkomplexen (Hamilton et al., 1987; Papadea & Check, 2008; Vidarsson et al., 2014).

*Tabelle 1: Strukturelle und funktionelle Unterschiede der IgG-Subklassen hinsichtlich der Eigenschaften Komplementaktivierung und FcRn- Bindung (modifiziert nach Vidarsson et al., 2014)*

<b>Eigenschaften</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
Molekulargewicht	146	146	170	146
Aminosäure in der Scharnierregion	15	12	62	12
Vorkommen (%)	60	32	4	4
Halbwertszeit	21	21	7/21	21
<b>Komplementaktivierung</b> (C1q- Bindung)	++	+	+++	–
<b>FcRn-Bindung</b> (at pH ≤ 6,5)	+++	+++	++/+++	+++

Das Krankheitsbild von Pemphigus vulgaris lässt sich in zwei Phasen einteilen, eine aktive Phase und eine Phase der Remission. In der akuten und aktiven Krankheitsphase wurden vermehrt PV-Autoantikörper der IgG4-Subklasse entdeckt, wohingegen in der Remissionsphase eine Anhäufung der PV-IgG1 ermittelt wurde (Vidarsson et al., 2014). Die Frage nach der Ursache für die Entstehung dieser Autoantikörper ist derzeit noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass neben einem ungesunden Lebensstil und einer Verbindung mit anderen Krankheiten auch das Vorhandensein bestimmter humaner Leukozyten-Antigene (HLA) der Klasse II, insbesondere derjenigen, die mit PV assoziiert sind, mit der Krankheit zusammenhängt. Diese Theorie wurde aufgrund der von der Krankheit betroffenen aschkenasischen Juden weiterverfolgt, bei denen das HLA ermittelt wurde. Die Assoziation mit dem HLA lässt auf eine genetische Prädisposition schließen (Porro et al., 2019).

Die bei der Krankheit entstehende Akantholyse der Haut durch die Entstehung von leicht eruptierenden Blasen und der damit verbundenen Destruktion der Epithelschichten wird auf die Zerstörung der interzellulären Zellkontakte zurückgeführt. Dabei kommt es beim mukösen Typ zur Beeinträchtigung des Stratum intermediums, während beim epidermalen Typ der Defekt vom Stratum spinosum ausgeht. Bei der foliaceus-Variante richten sich Autoantikörper gegen Dsg1, das im Stratum corneum und Stratum granulosum vorhanden ist. Hierbei treten hauptsächlich in der oberen Hautbarriere schmerzhafte Blasen und Erosionen auf, welche durch defekte Epithelschichten entstehen. Im Vergleich dazu sind für die vulgaris-Variante Autoantikörper charakteristisch, welche sich gegen Dsg3 (Mukosa-betreffend) und/oder Dsg1 und Dsg3

(Mukosa und Epidermis-betreffend) richten. Hierbei kommt es zusätzlich neben einer Hautdestruktion zu weiteren Läsionen im Bereich der Schleimhäute. Die Betroffenen leiden bei dieser Form der Autoimmundermatose an Mangelernährung, welche eine Folge der verringerten Nahrungsaufnahme ist, die sich aufgrund der im Mund- und Rachenraum vorkommenden und schmerzhaften Schleimhautwunden erklären lässt (Amagai et al., 1999; Joly & Litrowski, 2011; Porro et al., 2019).

Mehrere Theorien zur Beschreibung der antikörpervermittelten Akantholyse wurden ausgeführt und verschiedene Einflussfaktoren diesbezüglich erwähnt (Sinha & Sajda, 2018). Laut einer der Haupttheorien wird die Zell-Zellverbindung durch die sterische Hinderung der EC-Domänen der Adhäsionsproteine durch PV-IgG aufgelöst. Dieser Ansatz wird mit der „Desmoglein-Kompensationstheorie“ fortgeführt (Hanakawa et al., 2002). Sie deutet auf die verschiedenen Expressionsmuster der Desmogleine in den unterschiedlichen Epithelzellverbänden hin. Es wird vermutet, dass sich desmosomale Cadherine kompensieren können. Dies wiederum bedeutet, dass das Vorhandensein von Anti-Dsg3-Antikörpern nicht zur Blasenbildung in der Haut führen können, da mittels Dsg1 der Defekt von Dsg3 aufgrund der gleichverteilten Expressionsmuster der Desmogleine ausgeglichen werden kann. Die kutane Blasenbildung entsteht also nur dann, wenn beide Autoantikörper (Anti-Dsg3- und Anti-Dsg1-Antikörper) präsent sind. Anders ist die Situation jedoch bei PF, da das Dsg1 in den Schleimhautregionen weniger vertreten ist, sodass bereits allein PV-IgG gegen Dsg3 die Krankheit auslöst (Hanakawa et al., 2002; Waschke, 2008).

Andere Studien untersuchen, wie PV-IgG an desmosomale Cadherine bindet und dadurch signalvermittelte Zellteilungen auslöst (van der Wier et al., 2023). Hierzu ist die „direkte Inhibitionstheorie“ anzuführen, die auf die Kombination der beiden erwähnten Haupttheorien zum Krankheitsbild des Pemphigus vulgaris hinweist (sterische Hinderung der Adhäsionsmoleküle und die Signalweg-induzierte Zellseparation) (Sitaru & Zillikens, 2005). Durch Akkumulation von PV-Antikörpern werden Signalkaskaden wie u.a. die Proteinkinase C (PKC), p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK), Sarkoma-assoziierte Kinase (Src) und extrazelluläre signal-regulierte Kinase (ERK) ausgelöst. Es wird weiter vermutet, dass der Störung der interzellulären Haftungsmechanismen mehrere Ursachen zugrunde liegen. Eine davon basiert auf der Annahme, dass durch die Internalisierung des extradesmosomalen Dsg3 mittels Bindung von PV-IgG eine vertikale Anordnung der desmosomalen Kompartimente zur Zellmembran erfolgt (sog. „Linear

arrays“). Die anschließende Endozytose von Dsg3 entlang der vertikalen Streifen resultiert somit in einen krankheitstypischen Zelladhäsionsverlust (Jennings et al., 2011). Näher betrachtet wirkt die p38MAPK-Hemmung der Auflösung der Dsg3 entgegen, wodurch eine Verbesserung des blasenbildenden Zustandes angestrebt wird (Kaur et al., 2022). Die Regulierung der Kinasen für die Regression der Krankheit ist somit entscheidend, ebenso wie die PV-IgG-induzierte Src, welche neben der Dsg3-Regulierung noch zusätzlich die Phosphorylierung der Plakophiline auslöst. Eine Hemmung von Src führte daher zu einer deutlichen Verbesserung der mukosa-dominanten Form der PV (Kaur et al., 2022; Kugelmann et al., 2019).

Inwiefern die Hemmung weiterer Signalkaskaden beim pathophysiologischen Prozess entscheidend ist, wird derzeit erforscht. Eine weitere Erklärung des komplexen PV-Pathomechanismus ist der u.a. UVB-vermittelte oxidative Stress, welcher durch die Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Schwächung der antioxidativen Funktion des Immunsystems beiträgt. Dieser Zustand führt vor allem durch nachgeschaltete Signalkaskaden zu pathogenen Hautveränderungen. So ließ sich durch die Hemmung der dabei ausgelösten Signalwege eine protektive Wirkung der Keratinozyten vor antioxidativen Defekten herbeiführen (Liang et al., 2017).

### *1.2.3 Therapeutische Ansätze*

Durch das bessere Verständnis der Pathomechanismen von Pemphigus in der letzten Dekade konnten Therapieoptionen erweitert werden (Abulikemu et al., 2023). Die aktuelle Therapie richtet sich auf die Beseitigung bzw. Reduzierung der klinischen Symptome durch die Immunsuppression. Hierbei kommt es zum Einsatz von Kortikosteroiden, was die gängigste Behandlungsoption darstellt. Zu den für die Krankheit eingesetzten Immunsuppressiva gehört neben den Glukokortikoiden wie Prednisolon noch das Azathioprin und das als Kombipräparat einsetzbare Mycophenolat-Mofetil (Murrell et al., 2008). Diese Arzneimittelgruppen sind insbesondere zu Beginn der Krankheit das Mittel der Wahl, da eine rasche Wirkung bereits nach wenigen Tagen eintritt. Zudem können sie sowohl topisch als adjuvante Therapie oder auch als alleinige Therapie bei leichter Manifestation der Krankheit eingesetzt werden (Kasperkiewicz et al., 2017). Trotz der rapiden Erfolgsaussichten werden aufgrund der Nebenwirkungen von Glukokortikoiden andere Therapieansätze auf Dauer bevorzugt.

Als eine bedeutsame Therapie wird der Ansatz mit Anti-CD20-Antikörpern (Rituximab) von der US-amerikanischen „*Food and Drug Administration*“ (FDA), mit dem Ziel der Reduzierung der Antikörper im Blutserum, angesehen. Dies gelingt durch chimäre und monoklonale Antikörper, welche sich gegen das CD20-Oberflächenantigen der B-Zelle richten. Durch die Bindung von Rituximab kommt es zur Depletion der B-Zellen, wodurch die Antikörperproduktion eingestellt wird. Eine frühzeitige Einnahme von Rituximab kann das klinische Bild der Krankheit bereits deutlich verbessern und für eine längere Remissionsphase sorgen. Dennoch sollte die Rezidivgefahr nach dem Absetzen des Medikamentes nicht außer Acht gelassen werden (Kasperkiewicz et al., 2017). Weiterhin stellt die Immunabsorption der pathogenen PV-Antikörper eine weitere Therapieoption dar, welche auch als Zusatztherapie neben systemischer Immunsuppression eingesetzt werden kann. Diese Möglichkeit wird jedoch vorrangig bei stark vorangeschrittenen Krankheitsstadien eingesetzt, bei der Immunkomplexe aus dem Blutplasma filtriert werden (Eming & Hertl, 2009).

### **1.3 Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn)**

Die IgG Region, welche die CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-Domänen verbindet, beherbergt die Bindungsstelle für den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn). Dieser Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle bei der Verlängerung der Halbwertszeit von IgG-Antikörpern. Entdeckt wurde der neonatale Fc-Rezeptor vom Zoologieprofessor Francis William Rogers Brambell, sodass er auch als Brambell-Rezeptor bekannt ist (Pyzik et al., 2019). Der Wissenschaftler beschrieb die Funktion des Rezeptors mit der Übertragung der mütterlichen Immunglobuline auf den Fötus und den Schutz dieser vor dem Abbau, um so die Immunität der Nachkommen sicherzustellen (Junghans, 1997). Der heute geläufige Name des neonatalen Fc-Rezeptors geht auf die Entdeckung der Arbeitsgruppe von Rodewald zurück, die eine pH-vermittelte Bindung des Rezeptors in neonatalen Ratten feststellte (Eming & Hertl, 2009; Kuo et al., 2010).

#### *1.3.1 Struktur*

Strukturell ähnelt FcRn dem „major histocompatibility complex“ (MHC)-Klasse-I-Molekül. Er besitzt homolog zur  $\alpha$ 3-Domäne des (MHC)-Klasse-I-Moleküls eine 40 kDa

schwere alpha Kette, welche nicht kovalent mit der 12 kDa leichten  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ )-Kette verbunden ist (Pyzik et al., 2019b). Die alpha-Kette enthält drei extrazelluläre Domänen:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  (Bindungsstelle für das Fc-Fragment von IgG) und  $\alpha_3$  (Ankermolekül für  $\beta_2$ -Mikroglobulin). Weiter besteht diese schwere alpha-Kette aus einem 44 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Termini und einer transmembranösen Domäne (Kuo et al., 2010; Raghavan et al., 1993; Abbildung 5).

An einem IgG können zwei FcRn bei einem pH zwischen 6,0 und 6,5 binden, wobei es zu einer geringfügigen IgG-Konformationsänderung kommt. Dabei wird von einer Bindungsstelle innerhalb der  $\alpha_2$ -Domäne und den N-Terminus von  $\beta_2m$  als Schnittstelle mit dem IgG gesprochen. Weitere Versuche diesbezüglich weisen auf die CH2-CH3-Domäne der IgGs als Bindungsregion für die FcRn-IgG-Wechselwirkung hin (Kuo et al., 2010). Bei einem physiologischen pH-Wert (pH ca. 7,5) können gebundene IgGs abgelöst und wieder in das Blutserum freigesetzt werden (Raghavan et al., 1993).

FcRn bindet zudem Albumin mit einer 1:1-Stöchiometrie bei einem saurem pH-Wert an seiner  $\alpha_3$ -Domäne. Diese Bindungsstelle ist auf der gegenüberliegenden Seite des IgG-FcRn-Schnittpunktes. Inwiefern ein FcRn den Transport von IgG und Albumin gleichzeitig ausführen kann, ist Gegenstand aktueller Forschung (Kuo et al., 2010). Es wird davon ausgegangen, dass der Transport sowohl gleichzeitig als auch unabhängig voneinander passieren kann, da beide Moleküle verschiedene Bindungsstellen haben (Andersen et al., 2010; Chaudhury et al., 2006).

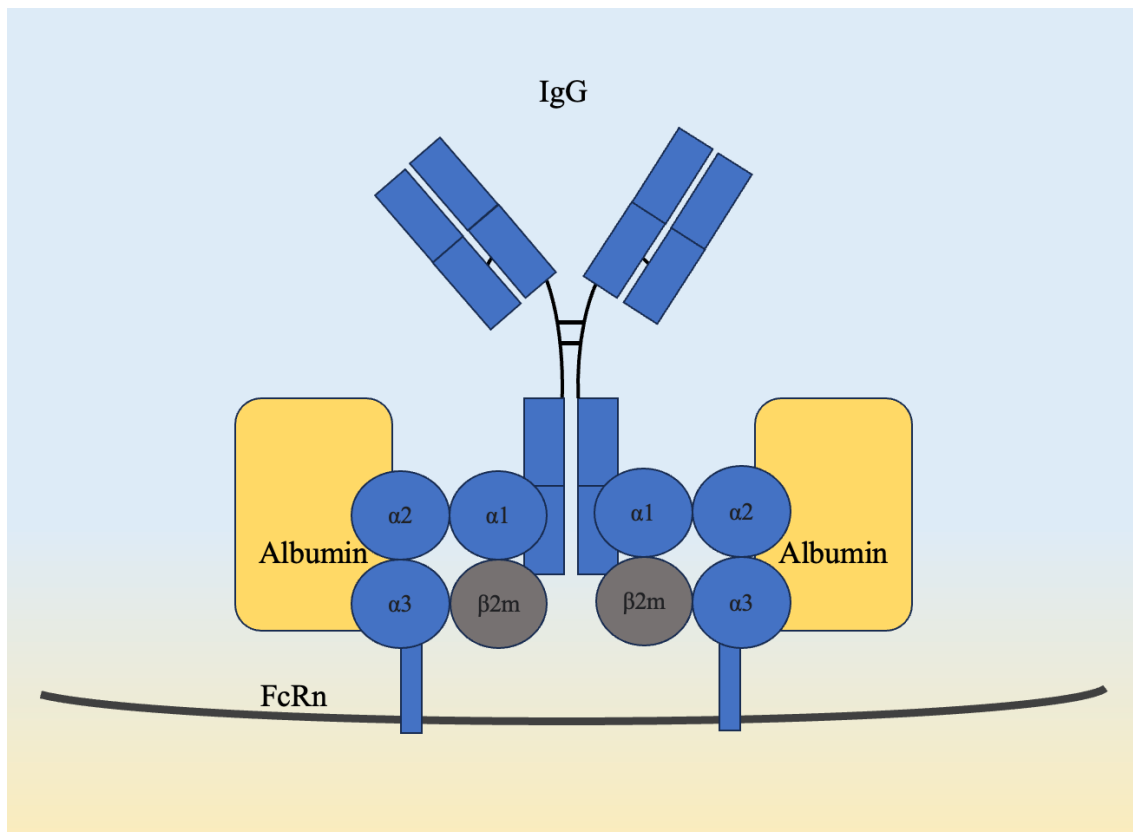


Abbildung 5: Darstellung des neonatalen Fc-Rezeptors (modifiziert nach Patel & Bussel, 2020)

Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) besitzt die Fähigkeit, mit verschiedenen Bindungsstellen der schweren Kette ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) an Albumin und der Fc-Region von IgGs zu binden. Die schwere Kette des FcRn ist in der Membran verankert und über eine nicht-kovalente Bindung mit der leichten Kette ( $\beta 2m$ ) verbunden.

Die Expression von FcRn wurde anfangs auf die Synzytiotrophoblasten der Plazenta und den Enterozyten des Darmes aufgrund des plazentaren Transportes beschränkt. Schnell wurde jedoch erkannt, dass FcRn neben der Plazenta auch in weiteren Geweben und verschiedenen Organen wie in den Podozyten der Niere und in den Hepatozyten der Leber vorkommt (Pyzik et al., 2019). Zudem können Zellen der Immunabwehr wie die dendritischen Zellen, Monozyten und den phagozytosefähigen Makrophagen FcRn exprimieren (Cianga et al., 2011). Auch Keratinozyten in der Epidermis sind in der Lage, endogene FcRn zu exprimieren (Zakrzewicz et al., 2022).

### 1.3.2 IgG-Homöostase

Eine wichtige Funktion hat die IgG-Homöostase, welche mittels der Bindung des Fc-Teils von IgG mit dem FcRn entsteht. Dabei bindet das FcRn an die flexible IgG-CH2-CH3-Region (Burmeister et al., 1994). Diese Bindung ist pH-abhängig und läuft nur unter

pH-sauren Umständen ab. Sollte solch ein Zustand nicht erreicht werden und ein physiologischer pH-Wert von 7,4 vorliegen, wie man ihn im menschlichen Blut wiederfindet, ist eine FcRn-IgG-Bindung kaum möglich. Daher ist für die Aufrechterhaltung der IgG-Homöostase das saure Milieu der Endosomen (pH 6-6,5) unabdingbar. Genauer führen die Histidinreste in der CH2- und CH3-Region der IgGs mit den Aminosäureresten der  $\alpha 2$ -Domäne von FcRn durch eine Salzbrücke zu dieser Bindung. Sollten jedoch die IgG-Histidinintermini zur Aminosäure Alanin mutieren, ist die Bindung beeinträchtigt und kann dementsprechend nicht erfolgen (Roopenian & Akilesh, 2007). Die Bindung an IgG führt überdies zu einer geringen Konformationsänderung des Rezeptors (Vaughn & Bjorkman, 1998).

Der Vorgang des IgG-Recyclings wird zunächst durch den Prozess der pinozytotischen Aufnahme der freien IgGs und dem anschließenden endosomalen Transport ermöglicht. In den Endosomen kommt es anschließend zur Bindung von zwei FcRn an ein IgG durch den sauren pH-Wert von etwa 6 (Sockolosky & Szoka, 2015; Vaccaro et al., 2005). Dadurch wird die lysosomale Degradation verhindert, und die Immunglobuline können zur Plasmamembran zurücktransportiert werden. Hier kann diese Bindung nun durch den neutralen pH-Wert aufgelöst werden, sodass die IgGs von FcRn dissoziieren. FcRn kann wieder zurück in die Endosomen transportiert werden, sodass das Vorhandensein des Rezeptors an der Zellmembran, im Gegensatz zu den Endosomen, beschränkt ist. Außerdem können nur an FcRn gebundene IgGs vor der lysosomalen Degradation geschützt werden (Montoyo et al., 2009; Sockolosky & Szoka, 2015; Vaccaro et al., 2005; Ward & Ober, 2009; Abbildung 6).

FcRn spielt somit bei der Verlängerung der Halbwertszeit von IgG im Blutserum eine zentrale Rolle. Veränderungen der IgG-Struktur können die Wechselwirkung mit FcRn beeinflussen und therapeutische Wirkungen erzielen (Sockolosky & Szoka, 2015).

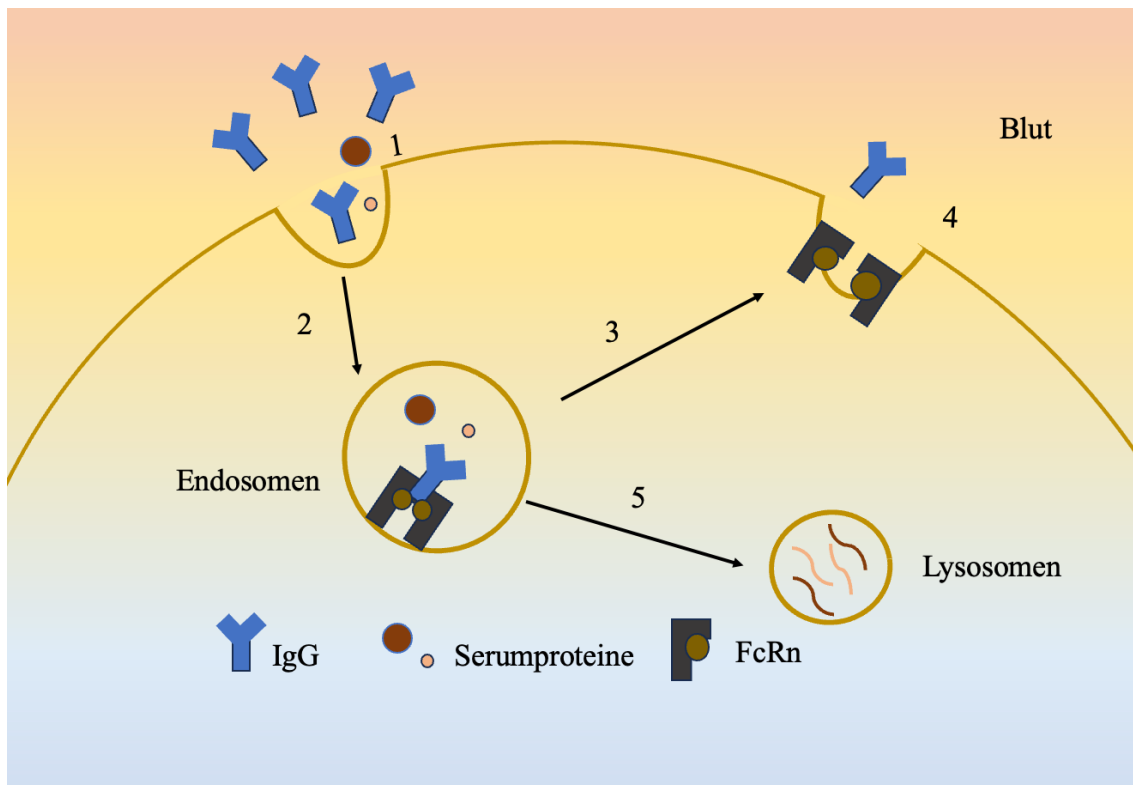


Abbildung 6: FcRn bedingte IgG-Homöostase (modifiziert nach Sockolosky & Szoka, 2015)

Zunächst kommt es zur Aufnahme der freien IgGs durch Pinozytose (1), welche dann entlang des endosomal Pfads transportiert werden (2). Innerhalb der Endosomen treffen die IgGs bei einem pH-Wert von etwa 6 auf FcRn. Diese Bindung verhindert die lysosomale Degradation, sodass IgGs zur Plasmamembran transportiert werden (3), wo sie beim neutralen pH-Wert wieder freigegeben werden (4). Serumproteine, welche keine Bindung mit dem FcRn eingehen, werden lysosomal abgebaut (5).

### 1.3.3 Fc-Engineering zur Modulation der Affinität zu FcRn

Die Möglichkeit der monoklonale Antikörper (mAb)-Therapie lieferte einen erheblichen Vorteil für die vielfältige und gezielte Behandlung von diversen Krankheiten. So versprechen Antikörperansätze häufig eine hohe Erfolgswahrscheinlichkeit (Booth et al., 2018; X. Wang et al., 2018). Es konnte weiter durch die Hemmung der Interaktion von IgGs mit FcRn ein wichtiges therapeutisches Prinzip aufgezeigt werden, das zur Reduzierung autoreaktive IgGs bei Autoimmunkrankheiten wie Myasthenia gravis führte (Abdeldaim & Schindowski, 2023). Diese Erfolge wurden durch das Eingreifen in die Antikörperaffinitäten zugunsten der besseren und stärkeren Bindung an FcRn ermöglicht. Unter Berücksichtigung der pH-Abhängigkeit konnten sog. IgG-Mutanten mit höherer Affinität an den neonatalen Fc-Rezeptor binden. Außerdem wurden auch durch das Fc-Engineering Antikörper entwickelt, welche als Fc-IHH-Mutationen bekannt sind und

keine Bindung mit FcRn eingehen. Dies wird durch einen Austausch von drei Aminosäuren (I253H/H310A/H435A) in den konstanten Domänen des Fc-Fragmentes der Antikörper ermöglicht (Qiao et al., 2008). Verantwortlich für diese verstärkten bzw. schwächeren Bindungen sind Modifizierungen, die an unterschiedlichen Positionen der CH2-CH3-Bindungsstelle der IgGs vorgenommen wurden (Acqua et al., 2002; Booth et al., 2018; Monnet et al., 2015; X. Wang et al., 2018).

Durch Blockierung von FcRn-IgG-Bindungen in sauren und neutralen pH-Wert-Verhältnissen ist es somit möglich, den endosomal Abbau der Antikörper und so die damit verbundene IgG-Clearance zu fördern. Diese FcRn-Blockade entsteht durch sogenannte „*antibodies that enhance IgG degradation*“ (ABDEGs) (Dos Santos et al., 2022; Vaccaro et al., 2005). Den therapeutischen Nutzen wiesen Vaccaro et al. (2005) bereits durch die in vitro gezeigte Erhöhung der IgG-Clearance und den vorteilhaften Nutzen des Konzeptes nach. Demgegenüber steht jedoch der Kritikpunkt, dass ABDEGs globale Antikörper mitbeeinflussen können und spezifische Antikörper nicht selektiv angreifen.

So wurde eine „*selective degradation of antigen-specific antibodies*“ (Seldegs) entwickelt, welche die Eigenschaft besitzen, gezielt nur antigen-spezifische Antikörper, die eine spezifische Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen auslösen, zu bekämpfen. Hierbei werden die antigen-unspezifischen Antikörper, die allgemein darauf gezielt sind, Eindringlinge zu bekämpfen, nicht beeinträchtigt. Ein weiterer zugleich interessanter Aspekt sind zudem die Bindungsstellen der IgGs mit anderen Rezeptoren wie den Fcγ-Rezeptoren, C1q und TRIM21. So kommt es zur Überlappung des Letzteren mit Epitopen, die ebenfalls vom neonatalen Fc-Rezeptor erkannt werden. TRIM21 ist ein immunologischer Sensor und für die intrazelluläre Neutralisierung zuständig. Es bindet gleichzeitig an beide schweren Ketten von IgG und zeigt eine erhöhte Antikörper-Bindungsaffinität. Diese Interaktionen zu den Effektormolekülen sollten daher im Rahmen des Fc-Engineerings im Hinblick auf ihre Auswirkungen stets mitberücksichtigt werden (de Taeye et al., 2019).

### 1.3.4 Efgartigimod (*Argx113*)

Ein mittels ABDEG-Technologie entstandenes Fc-Fragment ist das Efgartigimod (Vyvgart oder ARGX113) (Goebeler et al., 2022). Es ist ein natürlicher und humaner IgG-Fc-Fragment, der anders als herkömmliche IgGs die Bindung an FcRn auch bei neutralem pH-Wert beibehält. Efgartigimod ist zudem mit 5 Mutationen modifiziert (M252Y, S254T, T256E, H433K und N434F), wodurch die Bindungsaffinität zu FcRn in unterschiedlichen pH-Milieus, wie den neutralen Zelloberflächen oder in den sauren Endosomen, steigt (Zhou & Jiang, 2023). Endogene IgGs konkurrieren so mit Efgartigimod um die FcRn Bindungsstelle, wobei diese aufgrund der erhöhten Bindungsaffinität des modifizierten Fc-Regions in Efgartigimod keine Bindung mit dem FcRn eingehen können und so lysosomal abgebaut werden (Howard et al., 2021; Sockolosky & Szoka, 2015; Abbildung 7).

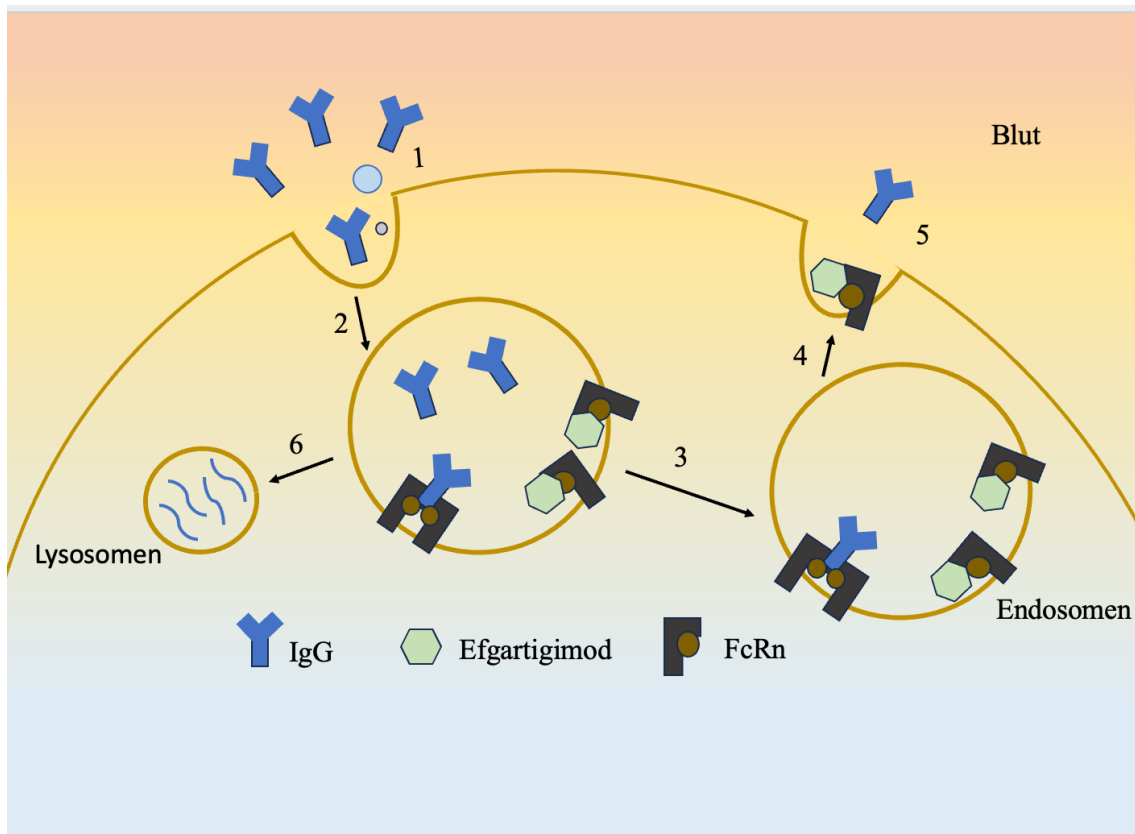


Abbildung 7: Blockierung der FcRn bedingten IgG-Homöostase durch Efgartigimod (modifiziert nach argenx, 2021)

Zunächst kommt es zur Aufnahme der freien IgGs durch Pinozytose (1). Diese werden folgend zu den Endosomen transportiert (2), wo sie in Anwesenheit von Efgartigimod, das eine höhere Bindungsaffinität zu FcRn aufweist, um die Bindungsstelle des neonatalen Fc-Rezeptors konkurrieren. Letztendlich werden

aufgrund der stärkeren Bindung von Efgartigimod weniger IgGs recycelt (3) und dadurch lysosomal abgebaut (6). Die wenigen gebundenen IgGs werden zur Plasmamembran transportiert (4), wo sie bei einem neutralen pH-Wert wieder freigegeben werden (5).

Efgartigimod wurde mit dem Ziel der Antikörperreduzierung und zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen entwickelt. Für die Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis wurde das Präparat bereits von der FDA zugelassen (Howard et al., 2021; Argenx, 2022). Auch in der ADVANCE IV Studie für Immunthrombozytopenie (ITP) erzielte Efgartigimod signifikante Ergebnisse. Es wurde festgestellt, dass Patienten, die mit Efgartigimod behandelt wurden, eine konstante Erhöhung der Thrombozytenzahl erreichten, verglichen mit der Placebo-Gruppe. Dadurch konnte eine wirksame und zugleich sichere Behandlung durch Efgartigimod bei der Behandlung von chronischer ITP bestätigt werden (Broome, 2023).

In den ersten durchgeführten Studienphasen bei Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) konnte Efgartigimod zur Reduzierung der IgGs führen, ohne dabei andere Immunglobulinklassen oder das auch vom IgG bindende Albumin zu beeinträchtigen. Weitere klinische Studien zu Patienten mit PV konnten die Effizienz von Efgartigimod bestätigen, indem der IgG-Spiegel um die Hälfte bei einer einmaligen Dosis von 10 bis 50 mg/kg reduziert wurde. Bei mehrmaliger Anwendung der Dosis konnte eine Reduzierung des Serumspiegels der IgGs um etwa 75% im Vergleich zu den Placebo-Probanden erzeugt werden (Ulrichs et al., 2018). Weiter konnte die Reduzierung der IgG-Autoantikörper im Vergleich zur Gesamt-IgG bestätigt werden, wobei zusätzliche Zellen der Immunabwehr bei einer Langzeittherapie durch Efgartigimod nicht beeinflusst wurden. Außerdem zeigten sich weitere Effekte wie die Reduzierung von Desmoglein-spezifischen B-Zellen, wodurch sich in der Folge die Autoantikörpermenge im Serum anhaltend verringerte (Maho-Vaillant et al., 2022). In der zuletzt durchgeführten Phase-III-Studie wurde die Wirksamkeit und Sicherheit von Efgartigimod untersucht. Diese randomisierte, placebokontrollierte Studie konnte bei Patienten mit PV keinen signifikanten Unterschied zwischen Efgartigimod und der Placebogruppe in Bezug auf die Erreichung einer vollständigen Remission unter minimaler Steroidgabe ermitteln. Der primäre Endpunkt der Studie wurde nicht erreicht, da 35,5% der Probanden in der Efgartigimod-Gruppe im Vergleich zu 30,3% in der Placebo-Gruppe eine vollständige Remission erreichten (Argenx, 2023).

## 1.4 Anwendung von rekombinanten Antikörpern in der Forschung an Pemphigus

Durch den Einsatz der Hybridom-Technologie durch Köhler und Milstein im Jahre 1975 gewann der therapeutische Aspekt von monoklonalen Antikörpern zunehmend an Bedeutung in der Wissenschaft. Antikörper können gezielt gegen Antigene entwickelt werden, um diese systematisch zu eliminieren. Dies kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen: Antikörper können zum einen durch den Internalisierungsprozess der Endozytose in die Zielzelle gelangen, was eine Clearance auslöst, die von der verabreichten Dosis abhängt, oder sie sind gegen Zelloberflächenmoleküle gerichtet, sodass sie durch rezeptorvermittelte Aufnahmemechanismen in die Zelle eingeschleust werden und dadurch die Clearance bewirken. Letzteres hängt somit nicht von der Dosis der verabreichten Antikörper, sondern von den Zielzellen ab (Mould & Green, 2010; Wang et al., 2008).

Zu den bereits angewendeten Antikörpern in der Forschung zu Pemphigus zählt zunächst der monoklonale AK23 (mAK23) Anti-Dsg3-Antikörper aus der Maus (Amagai et al., 1999; Tsunoda et al., 2003). Dieser wurde durch die Immunisierung von Dsg3<sup>-/-</sup>-KO-Mäusen mit rekombinantem Dsg3, induziert (Tsunoda et al., 2003). Übertragungen von mAK23 in neonatale Mäuse ergaben das typische Bild der Blasenbildung. Sie zeigten somit identische Phänotypen wie PV-Modellmäuse und Dsg3-KO-Mäuse.

Der mAK23-Antikörper erkennt ein Konformationsepitop von Dsg3 mit vier Aminosäureresten an der N-terminalen transadhäsiven Schnittstelle, die vermutlich an der Bestimmung der Bindungsspezifität von Dsg3 beteiligt sind. Andere desmosomale Proteine wie Dsg1 werden nicht von mAK23 erkannt. Die Herstellung des originalen mAK23-Antikörpers ist im Vergleich zum rekombinanten und teilweise humanisierten AK23-Antikörper (hAK23 IgG4) anders (Zakrzewicz et al., 2022,). Der mAK23-Antikörper wurde durch die Hybridom-Technologie entwickelt, indem Hybridomzellen durch die Fusion von Myelomzellen mit B-Lymphozyten generiert wurden. Dieser Hybridom mit den unsterblichen Wachstumseigenschaften der Krebszellen besitzt daher die Eigenschaft, spezifische Antikörper zu produzieren. Mit diesem Verfahren lassen sich somit große Mengen monoklonaler Antikörper über eine längere Zeit herstellen.

Durch das Einbauen der Maus-DNA-Sequenzen der variablen Teile der schweren und leichten Kette in ein menschliches IgG4-Leichtketten-Rückgrat wurde der Anti-Dsg3-

AK23-Antikörper neu formatiert und damit neu strukturiert (Zakrzewicz et al., 2022). Das Ergebnis ist der chimäre hAK23-Antikörper, welcher die menschliche CL-, CH1- und Scharnierregionen sowie einen menschlichen Fc-Teil trägt, der die Bindung an menschliche FcRn ermöglicht (Zakrzewicz et al., 2022; Tsunoda et al., 2003). Ein weiterer, bereits erforschter Antikörper ist der rekombinante 4B3, dessen Sequenz von John R. Stanley geliefert wurde. Der rekombinante 4B3-Antikörper wurde aus einer Antikörperbibliothek eines PV-Patienten mittels Phagen-Display isoliert (Payne et al., 2005). Er bindet vor Allem an Dsg3, geht aber auch eine Kreuzreaktivität mit Dsg1 in der menschlichen Epidermis ein (Payne et al., 2005; Zakrzewicz et al., 2022). Die rekombinanten Antikörper hAK23 und 4B3 wurden zunächst im Zelldissoziationsverfahren eingesetzt und verglichen. Das Ergebnis der Antikörper-Untersuchungen zeigte, dass hAK23 und 4B3 mit einer dosisabhängigen Monolayerfragmentierung einhergingen (Zakrzewicz et al., 2022). Auch der mAK23 Antikörper wurde im selben Versuch untersucht und sorgte zugleich für eine dosisabhängige Fragmentierung. Im nächsten Versuch wurde die Dsg3-Expression unter Einfluss dieser Antikörper ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Antikörper zu einer Verringerung der relativen Dsg3-Menge führten, wobei die Menge je nach eingesetzter Antikörperkonzentration variierte. Auffällig war, dass für den Antikörper mAk23 im Vergleich zum rekombinanten hAk23 Antikörper eine höhere Dosis erforderlich war, um eine Fragmentierung des Zellmonolayers zu erreichen (Zakrzewicz et al., 2022). Die Tatsache, dass mAK23 und hAK23 zwar an dasselbe Dsg3-Epitop binden und trotzdem verschiedene Dosen benötigt wurden, um dieselbe Fragmentanzahl zu erzeugen, lässt vermuten, dass die unterschiedlichen Herstellungsverfahren zu berücksichtigen sind.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris weist in der aktiven Phase vorwiegend IgG4-Autoantikörper und in der Remission häufiger IgG1-Autoantikörper im Serum auf (Futei et al., 2001). Der Vergleich dieser beiden unterschiedlichen IgG-Subklassen stellt ein Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Dabei ist nicht nur der Vergleich zwischen den IgG-Subklassen von Interesse, sondern auch der Vergleich von Antikörpern unterschiedlicher Spezies (Maus vs. Mensch) und deren Bindung an hFcRn. Zusätzlich wurde der Maus-Anti-Dsg3-Antikörper (mAK23) der Subklasse mIgG1 mit dem teils humanisierten Antikörper hAK23 derselben Subklasse gegenübergestellt. Außerdem wurden weitere Anti-Dsg3-Antikörper sowohl mit unterschiedlichen Fc-Regionen als auch mit fehlendem Fc-Abschnitt hinsichtlich ihrer Pathogenität untersucht. Zusätzlich beschäftigt sich die Arbeit mit der Rolle des FcRn auf den therapeutischen Nutzen durch sogenannte FcRn-Antagonisten. Einer dieser Antagonisten stellt das Efgartigimod dar, welches in humanen Keratinozyten untersucht wurde.

## 2 Materialien

### 2.1 Technische Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten technischen Instrumente und Materialien sowie der jeweilige Hersteller sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

*Tabelle 2: Technische Instrumente und Verbrauchsmaterialien mit dem jeweiligen Hersteller*

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid-Gelelektrophorese-Kammer, Mighty-small	GE Healthcare, München (DE)
Amicon™ Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Millipore/Sigma, Darmstadt (DE)
Cellstar® Plastikröhrchen (15 ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Deckgläschen Ø15 mm	Menzel, Braunschweig (DE)
Elektrophorese-Netzgerät, Typ Midi-large	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
FALCON™ Rundboden- Polystyrolröhrchen (14 ml)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Frischhaltefolie	Papstar, Kall (DE)
Flockeneisbereiter, Scotsman Flockeneisbereiter AF 80	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Glaskolben	Schott-AG, Mainz (DE)

Heizblock, HLC	Labomedic, Bonn (DE)
Impfnadeln	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Inkubationsschütter, New Brunswick <sup>TM</sup> Innova® 42/42R	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Konfokales Laserscan Mikroskop, Zeiss LSM710	Carl-Zeiss, Jena (DE)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Küvetten (10x4x45mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Lichtmikroskop, AE 31	Motic, Wetzlar (DE)
Mikroplattenleser, Infinite M200	Tecan, Männedorf (CH)
Mikrotiterplatte 96-Well F / 24-Well-Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen (DE)
Nitrozellulosemembran	Whatman, Buckinghamshire (UK)
Objektträger, 76 x 26 mm	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Parafilm	Bemis, Wisconsin (USA)

Pasteurpipetten, Glas	Roth, Karlsruhe (DE)
Petrischale, Ø 10 cm, Glas	Roth, Karlsruhe (DE)
Photometer, Bio Photometer Plus	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf (DE)
Pinzette aus Edelstahl, 120 mm lang	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Pipetten, Research Plus™	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf (DE)
Pipetman L	Gilson, Internatinal B.V., Limburg a.d. Lahn (DE)
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Pipettenspitzen	nerbe plus, Winsen (DE)
Pipettierhilfe accu jet®	A. Hartenstein, Würzburg (DE)
ReagiergefäÙe (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Röntgenfilm Entwickler, Curix 60	AGFA, Düsseldorf (DE)
Röntgenfilm, Super RX-N	Fujifilm, Düsseldorf (DE)
Rotilabo®-Blottingpapiere, 0,35 mm	Roth, Karlsruhe (DE)

Scanner, Epson Perfection 3200 Photo Scanner	Herzog Computer Systeme, Frankfurt a.M. (DE)
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler, Hechingen (DE)
Skalpell	Schreiber GmbH, Fridingen (DE)
Sonifikator, Sonoplus	Bandelin electronics, Berlin (DE)
Spektralphotometer, BioPhotometer Plus	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Sterilbank, HeraSafe KS	ThermoFisher Scientific, Dreieich (DE)
Transfertank für WB, Criterion blotter	BioRad, München (DE)
Vortex, V-1 Plus	A. Hartenstein, Würzburg (DE)
Waagen, Toledo PB602-S	Mettler-Toledo, Gießen (DE)
Wasserbad	LAUDA Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen (DE)
Zellkulturflasche T 25, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellkulturplatte 6; 12; 24; 96 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellkulturinkubator, MCO-18AIC CO <sub>2</sub> Incubator	Sanyo, Osaka (JP)

Zellkulturschale (6 cm, 10 cm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zentrifugen, Mikro 200 R Optima LE-800K	Hettich, Tuttlingen (DE) Beckmann
Universal 32 R Universal 320 J2-21	Coulter, Sinsheim (DE)

## 2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sowie der jeweilige Hersteller sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

*Tabelle 3: Chemikalien*

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetazolium Bromid ( <i>MTT</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Acrylamid	Roth, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat ( <i>APS</i> )	AppliChem, Darmstadt (DE)
Bovine Serum Albumin ( <i>BSA</i> )	PAA, Cölbe (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
Dithiothreitol ( <i>DTT</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)

Dubecco's Modified Eagle Medium ( <i>DMEM</i> )	Gibco® ThermoFisher Scientific, Dreieich (DE)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>EDTA</i> )	Roth, Karlsruhe (DE)
Fötales Kälberserum ( <i>FSC</i> )	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Paisley (UK)
Gentamycin	Serva, Heidelberg (DE)
Glycerol	Glycerol
Glycin	AppliChem, Darmstadt (DE)
Hanks' Balanced Salt Solution ( <i>HBSS</i> )	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe (DE)
Keratinocyte Growth Medium 2 ( <i>KGM2</i> )	PromoCell, Heidelberg (DE)
LB-Medium	Roth, Karlsruhe (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Natrium-Phosphat-Puffer	AppliChem, Darmstadt (DE)
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt (DE)

Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt (DE)
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumdodecylsulfat ( <i>SDS</i> )	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumpyruvat	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt (DE)
Proteinase Inhibitor Cocktail ( <i>PI</i> )	Proteinase Inhibitor Cocktail ( <i>PI</i> )
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
Röntgenentwickler	Calbe Chemie GmbH, Calbe (DE)
Röntgenfixierer	Calbe Chemie GmbH, Calbe (DE)
SuperSignal™ West Femto/Pico Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Tetramethylethyldiamin, 1,2-bis(dimethylamino)-ethan ( <i>TEMED</i> )	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ( <i>Tris</i> )	Roth, Karlsruhe (DE)
Trypanblau	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Trypsin	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe (DE)

Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt (DE)
-------------	---------------------------

## 2.3 Puffer

Die verwendeten Puffer sowie die jeweilige Zusammensetzung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

*Tabelle 4: Puffer*

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierungspuffer für Western-Blot (WB)	5% Milchpulver in TBST
Lämmli-Gelelektrophorese-Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
PBS, pH 7,4	150 mM NaCl 20 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Ponceau-Färbelösung	100 mM Dithiotreitol (DTT) 250 mM Tris-HCl pH 6,8 8% SDS 40% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 20% 2-Mercaptoethanol
SDS-Urea-Puffer	1% SDS 10 mM Tris-HCl pH 7,5 8 M Urea 5 mM EDTA 2 mM EGTA 140 mM NaCl

Stürmer-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris pH 7,4 2 mM EDTA 1% Nonoxinol 40 (NP-40)
Tris-buffered saline Tween 20 ( <i>TBST</i> )	150 mM NaCl 0,05% Tween-20 100 mM Tris-HCl pH 7,4
Transferpuffer für WB	192 mM Glycin 25 mM Tris 10% Methanol
Triton-Puffer	1% Triton 2 mM EGTA 10 mM Tris 140 mM NaCl 5 mM EDTA

## 2.4 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

*Tabelle 5: Enzyme*

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Dispase II	Roche, Basel (CH)
Trypsin	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Für die Western Blot Analyse verwendete primäre und sekundäre Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die Antikörper aufgelistet, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden. Hierbei handelte es sich um Primär- und Sekundär-Antikörper, welche in einem Verhältnis von 1: 1000 (Primärantikörper) und 1:10 000 (Sekundärantikörper) mit TBST (pH 7,4) verdünnt wurden.

Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Dsg1 (B-11)	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)
Anti-Dsg3 (5H10)	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)
Anti-GAPDH	Maus	1:10 000	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-Maus/ Meerrettich peroxidase (HRP) gekoppelte	Ziege	1:10 000	Dako, Wiesentheid (DE)

### 2.5.2 Monoklonale pathogene Anti-Dsg3-Antikörper mit unterschiedlichen Fc-Varianten

Die chimär-rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23-Isotypen (IgG1 und IgG4) stellen die humane Ableitung des Anti-Dsg3-Antikörpers mAK23 dar. Das „m“ repräsentiert die Abkürzung für Maus, während „AK“ für akantholytische Keratinozyten steht. Der mAK23 wurde durch die Dsg3<sup>-/-</sup> Knock-Out Mäuse mittels der Hybridoma-Technik ermittelt. Als bedeutsames Werkzeug in der Forschung zu Pemphigus erwies sich der Antikörper, der von einer monoklonalen Antikörpergruppe (mAbs) gegen Dsg3 aus PV-Modellmäusen stammt (Tsunoda et al., 2003). Die hAK23 Wildtypvariante unterscheidet sich zudem durch das humanisierte Fc-Fragment vom mAK23, um so eine

optimierte Interaktion zum FcRn zu ermöglichen. Die rekombinanten pathogenen Anti-Dsg3- Antikörper mit unterschiedlichen Fc-Varianten wurden alle von dem Antikörperunternehmen *ImmunoPrecise Antibodies Ltd.* hergestellt.

In folgender Tabelle finden sich alle verwendeten pathogenen Antikörper sowie der Kontroll-Antikörper.

*Tabelle 7: Pathogene anti-Dsg3 Antikörper mit unterschiedlichen Fc-Varianten und Kontrollantikörper*

<b>Antikörpername</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Antigen</b>
hAK23 IgG1-Fc-WT	ImmunoPrecise	chimär-rekombinant-vollständiges IgG1  Human: CL, CH1, Scharnier- und Fc-Region  Maus: VL-Region	Anti-Dsg3-Antikörper
hAK23 IgG1-Fc-IHH	ImmunoPrecise	chimär-rekombinant-vollständiges IgG1 mit modifiziertem Fc-Teil durch den Austausch von drei Aminosäuren (I253H/H310A/H435A) im Fc-Region  Human: CL, CH1, Scharnier- und Fc-Region  Maus: VL-Region	Anti-Dsg3-Antikörper
hAK23 IgG1-Fc-DHS	ImmunoPrecise	chimär-rekombinant-vollständiges IgG1 mit modifiziertem Fc-Teil durch Substitutionen von	Anti-Dsg3-Antikörper

		<p>L309D, Q311H und N434S</p> <p>Human: CL, CH1, Scharnier- und Fc-Region</p> <p>Maus: VL-Region</p>	
hAK23 IgG4-Fc-WT	ImmunoPrecise	<p>chimär-rekombinant-vollständiges IgG4</p> <p>Human: CL, CH1, Scharnier- und Fc-Region</p> <p>Maus: VL-Region</p>	Anti-Dsg3-Antikörper
hAK23 IgG4-Fc-IHH	ImmunoPrecise	<p>chimär-rekombinant-vollständiges IgG4 mit modifiziertem Fc-Teil durch den Austausch von drei Aminosäuren (I253H/H310A/H435A) im Fc-Region</p> <p>Human: CL, CH1, Scharnier- und Fc-Region</p> <p>Maus: VL-Region</p>	Anti-Dsg3-Antikörper
hAK23 IgG4-Fc-DHS	ImmunoPrecise	<p>chimär-rekombinant-vollständiges IgG4 mit modifiziertem Fc-Teil durch Substitutionen von L309D, Q311H und N434S</p>	Anti-Dsg3-Antikörper

		Human: CL, CH1, Scharnier- und Fc- Region  Maus: VL-Region	
mAK23	argenx, Gent (BEL)	murin-rekombinant- vollständiges mIgG1	Anti-Dsg3- Antikörper
Motavizumab (hIgG1/ hIgG4)	argenx, Gent (BEL)	vollständiges IgG1/IgG4	Anti- Humane Respirator- ische Synzytial-Virus (RSV)- Antikörper

### 2.5.3 Antikörperfragmente

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten AK-Fragmente dargestellt.

*Tabelle 8: AK-Fragment*

<b>Fc-Fragment Derivate</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Eigenschaft</b>
Efgartigimod (Argx133)	argenx, Gent (BEL)	IgG1 Fc-Fragment Derivat, modifiziert mit erhöhter Affinität an FcRn, pH unabhängig
hAK23-F(ab') <sub>2</sub>	FairJourney, Porto (PRT)	IgG1 Fab-Fragment ohne Affinität an FcRn

## 2.6 Zelllinie

Als Zelllinie wurden immortalisierte humane Keratinozyten, hTert/KER-CT-Zellen verwendet (ATCC®, CRL4048TM, Wesel, DE; immortalisierte humane Keratinozyten) (Beckert et al., 2019). Als Wachstumsmedium diente dabei das „Keratinocyte Growth Medium 2“ (KGM2), bestehend aus 0.004 ml/ml Rinderhypophysenextrakt, 0,125 ng/ml Epidermalem Wachstumsfaktor, 5 µg/ml Insulin, 0,33 µg/ml Hydrokortison, 0,39 µg/ml Adrenalin, 10 µg/ml Transferrin, 0,05 mM CaCl<sub>2</sub> und 30 mg/ml Gentamycin. Die Inkubation der Zellen verlief bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.7 Software

GraphPad 5 Prism

Microsoft Office System 2016

Mendeley

## 2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Experimente mindestens dreimal durchgeführt. Durch das Programm GraphPad Prism5 konnte die Mittelwert-Standardabweichung der Daten erhoben, und anhand von one-way oder two-way ANOVA ließ sich die statistische Signifikanz (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001) festlegen. Die Alphafehlerkumulierung wurde durch die Bonferroni-Korrektur adjustiert.

## 2.9 Densitometrische Analyse mittels ImageJ

Die Densitometrie-Analyse erfolgte mittels Software *ImageJ* (Schneider et al., 2012) und die Berechnung mittels Microsoft Excel-Software, wobei die Intensität von Dsg3 bzw. -1 für jede Zellgruppe durch die GAPDH-Intensität geteilt wurde. Die unbehandelte Zellgruppe diente hierbei als Referenz und erhielt den Normierungsfaktor 1.

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellbiologische Methoden**

#### *3.1.1 Kultivieren der hTert-Zellen*

Die bereits in Kapitel „Materialien“ erwähnten immortalisierten hTert/KER-CT-Zellen dienten in der vorliegenden Arbeit zur Durchführung aller Experimente. Sie wurden bei 37°C in ihrem für sie hergestellten Nährmedium, dem KGM2, bei einem 5-prozentigen CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Das KGM2 wurde zusätzlich zum Supplement-Gemisch vermischt. Dabei wurde eine CaCl<sub>2</sub>-Konzentration von 0,05 mM eingesetzt und anschließend zur Sicherstellung der adäquaten Ausprägung der desmosomalen Cadherine, vor allem der Dsg3, eine CaCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mM verwendet (Beckert et al., 2019).

#### *3.1.2 Passagieren der hTert-Zellen*

Die hTert-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert und anschließend gesplittet. Dies geschah zunächst durch das Auswechseln des alten Nährmediums mit dem Gemisch von 5 ml PBS und 0,05% EDTA. Nach einer 10-minütigen Inkubation mit diesem und durch das Mikroskop kontrollierten Kohärenz der Zellen wurde der Überstand ausgeschüttet. Die Zellen wurden folgend mit 200 µl Trypsin für 2-3 Minuten benetzt, um so die Kohärenz der Zellen aufzulösen. Anschließend wurden die Zellen mit 800 µl eines 2% FCS in PBS resuspendiert. Hiernach wurde die in einem Eppendorfgemisch gegebene Suspension für 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet isoliert. Das Pellet wurde mit 1 ml KGM2 resuspendiert, sodass 150 µl der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche (T-25) gegeben und mit 5 ml KGM2 mit 0,05 mM CaCl<sub>2</sub> aufgefüllt wurde. Das Passagieren der Zellkultur diente somit zur Erhaltung der hTert-Zellen und der Durchführung weiterer Versuche. Die neuen Zellkulturflaschen wurden mit der jeweiligen Passage-Nummer versehen.

#### *3.1.3 Zählung der hTert-Zellen*

Gezählt wurden die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer (30 mm x 80 mm x 5 mm), die aus vier integrierten quadratischen Flächen besteht. Die vorher mit Trypanblau angefärbte Zellsuspension wurde seitlich des Deckglases gleichmäßig pipettiert und breitete sich

unterhalb von diesem aus. Die Zellsuspension wurde vorher gut gemischt, sodass sie gleichmäßig diffus über die Quadratflächen verteilt war.

Anschließend wurde mit dem Lichtmikroskop die Anzahl der Zellen pro Zählfeld ermittelt und der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert wurde dann mit dem Produkt aus der Quadratfläche multipliziert. Die mittlere Grenze wird durch drei Linien, die zwischen den Feldern verlaufen, dargestellt. Nur die auf den jeweils äußeren Flächen liegenden Zellen dieser mittleren Grenzlinie wurden beim Zählen berücksichtigt. Außerdem wurden nur lebende Zellen in die Zählung einbezogen.

#### *3.1.4 Kultivierung der hTert-Zellen mit den Anti-Dsg3-Antikörpern*

Wie zuvor beschrieben, diente die Vorbehandlung der hTert-Zellen mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> zur sicheren Ausbildung der Desmosomen. Daher wurde vor Behandlung der Zellen mit den Anti-Dsg3-Antikörpern eine Erhöhung der CaCl<sub>2</sub>-Konzentration vorgenommen. Das anschließende 24-stündige Inkubieren der Zellen mit den Anti-Dsg3-Antikörpern erfolgte parallel mit der Negativkontrolle durch die hIgG1-Kontrolle. Zur Charakterisierung des therapeutischen Fc-Liganden (Efgartigimod) wurden die Zellen zunächst für 30 Minuten mit Efgartigimod vorbehandelt, bevor sie der Behandlung der Anti-Dsg3-Antikörper für weitere 24 Stunden ausgesetzt wurden.

#### *3.1.5 Monolayer-Dissoziationsversuch*

Die Dissoziationsversuche dienen der Ermittlung der interzellulären Adhäsionsstörung der Keratinozyten durch die Anti-Dsg3-Antikörper. Hierbei bleiben die Zell-Zellkontakte, jedoch nicht die Zell-Matrixkontakte durch das Enzym Dispase unversehrt. Es kommt zu einem Ablösen des Zellblattes vom Gefäßboden (Ishii et al., 2005).

Auf einer 24-Well-Platte wurden hierfür hTert-Zellen bis zur 100-prozentigen Konfluenz kultiviert und anschließend mit dem 2 mM CaCl<sub>2</sub> versehenem KGM2 ausgetauscht. Für weitere 24 Stunden wurden die Zellen daraufhin mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und für 25 Minuten mit 2,5 U/ml Dispase II inkubiert, bis der entstandene Zell-Monolayer sich vom Plattenboden abgelöst hat. Die abgelösten Zellblätter wurden anschließend von der dispasehaltigen Suspension durch das vorsichtige Abpipettieren der Lösung isoliert. Anschließend wurde jeder der Zell-Monolayer mit HBSS versehen und

mit zusätzlich 0,25 mg/ml kühlbewahrtem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) für 15 Minuten inkubiert. Dieser Vorgang diente dem Anfärben des Monolayers.

Schließlich wurden die blauen Zell-Monolayer mechanischem Stress ausgesetzt. Dieser erfolgte durch das Auf- und Abpipettieren der Zellblätter, wodurch deren Fragmentierung initiiert wurde. Zur Anzahl des Pipettierens diente der bereits charakterisierte hAK23 (IgG4) als Kontrolle, sodass die Reihenfolge mit dieser Zellgruppe begann. Die Zellblätter wurden mindestens 30-mal auf- und abpipettiert. Die Fragmentanzahl wurde anschließend gezählt, um so die interzelluläre Adhäsionsstärke zu ermitteln.

## **3.2 Biochemische Methoden**

### *3.2.1 Herstellen der Proteinlysate*

Um Proteine aus den Zellen zu extrahieren wurden die Zellen mittels einer 12-Wellplatte bis zur benötigten Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit dem Stürmer-Lysepuffer mit Proteaseinhibitor-Cocktail versehen. Danach wurden die Zellen mit dem Lysepuffergemisch für 10 Minuten inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber von der Platte abgetragen und in ein frisches Eppendorfgefäß übertragen. Die Gefäße wurden über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und am nächsten Tag mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Zellreste unter  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten bei 15 000 rpm zentrifugiert, sodass sich Zelltrümmer auf dem Gefäßboden ablagerten und der Überstand mit den extrahierten Proteinen in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert wurde. Die Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### *3.2.2 Bradford-Proteinbestimmung*

Die Bradford-Methode ist ein photometrisches Verfahren, das zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt wird. Zunächst wurde die Kalibrierung durch Standardproteine vorgenommen. Hierbei wurde eine bereits ermittelte Konzentrationsreihe als Standardreihe genutzt, um so die Konzentration der nicht ermittelten Proteinproben zu messen. Es wurde hierbei in eine 96-Wellplatte (Mikrotiterplatte) in Triplikaten jeweils 10  $\mu\text{l}$  der Standardreihe (BSA, 0,02 mg/ml bis 0,3 mg/ml) pipettiert. Zusätzlich wurden gemäß dem gleichen Verfahren die mit Wasser verdünnten Proteinproben jeweils in weitere Tripletten gegeben. Anschließend wurde in

jedes der Wellplatten 200 µl Bradford-Lösung hinzugegeben, wodurch eine Farbveränderung eintrat. Gemessen wurde diese schließlich mit einem photometrischen Absorptionsmessgerät (Infinite® 200 PRO).

### 3.2.3 SDS-PAGE und Western Blot

Für eine SDS-PAGE (engl. „sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese“) wurden Polyacrylamidgele verwendet, die in einem elektrischen Feld dafür sorgen, dass die zu ermittelnden Proteine nach ihrer Größe verteilt werden. Dieses Standardverfahren zur Trennung von Proteinen wurde durch ein vierprozentiges Polyacrylamid-Sammelgel und einem 10-prozentigen Polyacrylamid-Laufgel durchgeführt. Nach der Herstellung der Gele mit den unterschiedlichen Reagenzien und den jeweiligen Konzentrationen, die der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen sind, wurden die Proben mit einem Loading-Puffer vermischt und anschließend bei 95°C für fünf Minuten in einem Heizblock erwärmt.

Tabelle 9: SDS-PAGE Trenngel

Trenngel 10%	
Reagenz	Konzentration
Tris pH 8,8	12,5 mM
SDS	0,1%
Acrylamid	10%
APS	0,5%
TEMED	0,1%

Tabelle 10: SDS-Page Sammelgel

Sammelgel 4%	
Reagenz	Konzentration
Tris pH 8,8	4,2 mM
SDS	0,1%
Acrylamid	4%
APS	0,5%
TEMED	0,1%

Nach der Vorbereitung wurden die Gelelektrophorese-Kammern aufgebaut und mit Lämmli-Puffer aufgefüllt. Um die Proteingrößen später auffindig zu machen, wurden jedem Gel zusätzlich 3 µl eines Protein-Größenmarkers (BioRad, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) zugefügt. Gemäß den zu detektierenden Proteinen wurden dann 10 µg aus den vorbereiteten Proben in den Geltaschen pipettiert und für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel unter stetiger Beobachtung aufgetrennt.

Hiernach erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine in dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot, der für 90 Minuten mit einer Stromstärke von 400 mA angesetzt war. Die Nitrocellulosemembran wurde hiernach in ein Gefäß gegeben und mit TBS-T gewaschen. Darauf folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch die Inkubation mit fettarmer Milch (5%) für 60 Minuten.

#### 3.2.4 Immundetektion

Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran nach der Blockierung mit der Milch über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Diese Primärantikörper sind in der Lage, epitopspezifisch an den Proteinen zu binden, womit sie anhand des Sekundärantikörpers zu erfassen sind, welcher am Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Die Membran wurde am Folgetag 3-mal mit TBS-T gewaschen und mit dem HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) gekoppelten-Sekundärantikörper für eine Stunde auf dem Wippschüttler inkubiert.

Hiernach wurde die Membran wieder mit TBS-T jeweils für 10 Minuten gewaschen und anschließend für die Bildherstellung getrocknet. Danach wurde sie mit einem ECL-Substrat für zwei Minuten benetzt, und das Substrat wurde abgetupft. In einer Frischhaltefolie verpackt, wurde die Membran dann in einer Röntgenkassette befestigt und mittels eines Röntgenfilms für ca. 7 Sekunden (je nach Signalstärke) in einer abgedunkelten Röntgenkammer belichtet. Anschließend wurde sie in der Entwicklermaschine entwickelt.

Um weitere Proteine zu detektieren, wurde die Membran gestrippt. Dies geschah durch das vorherige Waschen der Membran und anschließender Inkubation mit 0,1 M NaOH für 15 Minuten. Die Blockierung mit fettarmer Milch wurde hiernach angesetzt und eine anschließende Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4°C über Nacht durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

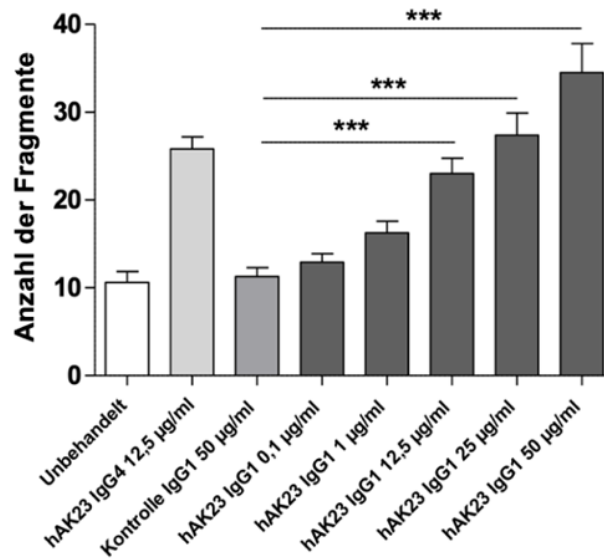
### 4.1 Wirkung von rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern (hAK23 IgG1) auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten

Der bereits durch Zakrzewicz et al. (2022) charakterisierte Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 vom IgG4 Subtyp wurde als Vergleichsprobe bzw. Positivkontrolle verwendet. Hergestellt wurde dieser Antikörper, da rein murine Antikörper wie das mAK23 Maus-IgG (Tsunoda et al. 2003) eine eingeschränkte Bindung zum humanen FcRn haben. Daher wurden in unserer AG rekombinante Antikörper entwickelt, die auf einer chimären Grundstruktur aufgebaut sind und somit eine höhere Affinität zum humanen FcRn haben (Zakrzewicz et al., 2022). Dies bedeutet, dass sie Antikörperfragmente von zwei verschiedenen Spezies enthalten, wobei das Fc-Fragment den humanen Anteil ausmacht und somit die natürliche Bindung zum hFcRn gegeben ist, während die Fab-Region zwei Fab-Anteile wiedergibt, die dem mAK23 identisch sind. Diese Erkenntnis nutzte ich in der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der Pathogenität der Anti-Dsg3-Antikörper und ihrer Interaktion mit FcRn. So wurde zuerst der rekombinante Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 der IgG1-Subklasse untersucht, um ihn anschließend mit dem bereits charakterisierten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 der IgG4-Subklasse zu vergleichen (Zakrzewicz et al., 2022).

Zur Ermittlung der Pathogenität dieser Antikörper auf die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten wurden Versuche zur Zelldissoziation durchgeführt (Ishii et al., 2005). Es wurden zunächst Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen Anti-Dsg3-Antikörper in unterschiedlichen Mengen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Zellen, die mit einem Isotyp-angepassten, nicht-Human-reaktiven Kontrollantikörper mit humaner Fc-Region (hIgG) und einer Konzentration von 50 µg/ml behandelt wurden, dienten in dem Versuch zum Vergleich als Negativkontrolle. Zellgruppen, die außerdem nicht mit einem Antikörper behandelt wurden, dienten dabei als weitere Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden die einzelnen Zellgruppen zur Trennung der Monolayer-Zellschicht vom Plattenboden für weitere 25 Minuten mit dem Enzym Dispase vorbehandelt und anschließend durch MTT für 15 Minuten angefärbt. Eine folgende mechanische Bearbeitung des Monolayers mittels des Auf- und Abpipettierens erfolgte für jedes der 24-Wellplatten konform. Die durch diese Belastung entstehende Fragmentierung des

Monolayers wurde quantifiziert. Sie verdeutlichte die interzelluläre Adhäsionsstärke der einzelnen Zellblätter (Ishii & Amagai, 2013). Zur Feststellung der effektiven Konzentration für die Zellbehandlung mit dem untersuchten Antikörper, hAK23 der IgG1-Subklasse, diente der bereits durch die AG Tikkanen gründlich charakterisierte Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 der IgG4-Subklasse als Referenz (Zakrzewicz et al., 2022).

A



B

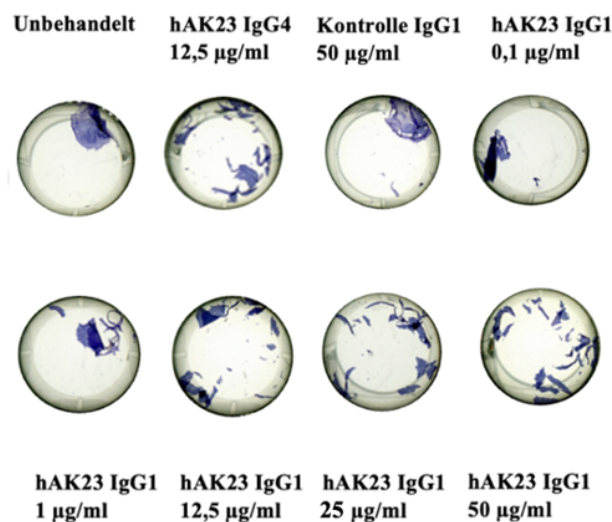


Abbildung 8: Wirkung von rekombinanten Anti-Desmoglein-3-Antikörpern (hAK23 IgG1) auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten

hTert-Zellen wurden in 24-Wellplatten unter 37°C in iKGM2 gezüchtet. Es wurden pro Well 30.000 hTert-Zellen bis zur hundertprozentigen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer CaCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mM für 24 Stunden inkubiert. Dieser Vorgang diente der Vergewisserung der ausreichenden Expression von desmosomalen Cadherinen. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit dem zu untersuchenden rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 (IgG1), dem bereits charakterisierten hAK23 des IgG4 Subtyps (Positivkontrolle) und dem hIgG1 (Negativkontrolle) inkubiert. Zudem wurden weitere Zellgruppen mit einer steigenden Konzentration an hAK23 (IgG1) versehen, um einen möglichen dosisabhängigen Effekt herbeizuführen. Hiernach wurden die Zellen für 25 Minuten mit Dispase inkubiert, sodass sich der Zell-Monolayer vom Plattenboden ablösen konnte. Die Zell-Monolayer wurden schließlich mit MTT angefärbt und mechanisch belastet, sodass die Zellfragmente für die Zählung sichtbar wurden. (A) Anzahl der Fragmente in den Zelldissoziationsversuchen mit unterschiedlicher Dosis des rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpers, hAK23 (IgG1). 1 Anhand von „one-way ANOVA“ wurde danach die statistische Signifikanz ermittelt (n= 9; \*\*\* p<0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle). (B) Repräsentative Darstellung der Monolayerfragmentierung.

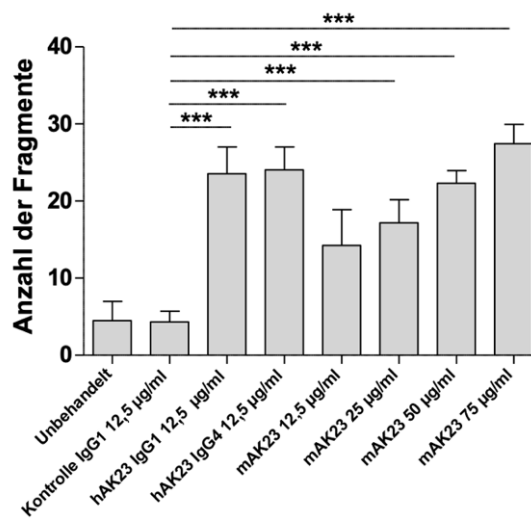
In dem Versuch zeigte sich ein ähnliches Verhalten der zwei rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 der IgG1- und IgG4-Subklasse. So bewirkte eine Dosis ab 12,5 µg/ml des Anti-Dsg3-Antikörpers (hAK23 IgG1) eine vergleichbare Anzahl der Monolayerfragmente wie der als pathogen bekannte hAK23 der IgG4-Subklasse (Abbildung 8A). Der zu untersuchende rekombinante Antikörper (hAK23 IgG1) sorgte somit für einen instabilen Zustand des Monolayers und der damit verbundenen interzellulären Adhäsion, der sich an der hohen Anzahl an Fragmenten erkennen ließ. Die Anzahl der Fragmente stieg entsprechend der Erhöhung der Dosis auf 25 µg/ml und 50 µg/ml an, was in einer konzentrationsabhängigen Fragmentierung des Monolayers resultierte. Ermittelt wurde eine Korrelation zwischen der Anti-Dsg3-Antikörperdosis und der Anzahl der Fragmente, wohingegen bei der Negativkontrolle (hIgG1) ein anderes Verhalten auf die Monolayerintegrität zu beobachten war. Diese zeigte, ähnlich wie die unbehandelte Zellgruppe, eine geringe Beeinträchtigung der Monolayerstabilität, sodass die Integrität des Monolayers trotz der mechanischen Belastung kaum beeinflusst wurde (Abbildung 8A & 8B).

## **4.2 Vergleich der Auswirkung vom rekombinanten Maus-Anti-Dsg3-Antikörper (mAK23) und humanen-Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23) auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten**

Die Annahme, dass die unterschiedlichen monoklonalen Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23 IgG4 und mAK23 IgG1) nicht nur unterschiedlicher Spezies angehören, sondern auch verschiedenen IgG-Subtypen angehören, wodurch somit der pathogene Effekt unterschiedlich einzuordnen ist (Zakrzewicz et al., 2022), galt es im vorliegenden Versuch zu untersuchen. Dadurch sollte ein Vergleich zwischen hAK23 der IgG1-Subklasse mit dem der mIgG1-Subklasse angehörigen mAK23 gezogen werden. Hinzu kommt, dass der mAK23 im Vergleich zu den chimären IgGs ein murines Fc-Fragment enthält, womit es einen komplett murinen Antikörper darstellt. Interessant ist somit auch die Wechselwirkung bzw. die Kompatibilität zwischen einem murinen Fc-Abschnitt und dem humanen FcRn. So wurden weitere Monolayer-Dissoziationsversuche durchgeführt. Hierfür wurde der murin-rekombinante Antikörper mAK23 der IgG1 Subklasse verwendet. Die optimal wirksame Konzentration von hAK23 (IgG1) wurde im vorherigen Versuch (Abbildung 8A) ermittelt und beträgt 12,5 µg/ml. Diese wurde nun mit dem murinen Anti-Dsg3-Antikörper der gleichen Subklasse (mAK23) verglichen.

Es wurden Zellen auf eine ausreichende Konfluenz kultiviert, um sicherzustellen, dass die Zellschicht dicht war. Hiernach wurden sie mit dem mAK23 für 24 Stunden mit verschiedener Dosierung (12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 75 µg/ml) behandelt. Zur Vergleichszwecken wurden die Zellen mit dem bereits bekannten rekombinanten Antikörper hAK23 (IgG1 und IgG4) in einer Referenzdosis von 12,5 µg/ml aufbereitet. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die zuvor mit einem Kontrollantikörper passenden Isotyps (IgG1) bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml behandelt wurden. Für zusätzliche Kontrollexperimente wurden Zellgruppen verwendet, die nicht vorher mit Antikörper inkubiert wurden. Die im Dissoziationsversuch, welcher bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, verursachte Fragmentierung des Zell-Monolayers wurde für die einzelnen Versuche quantifiziert.

A



B

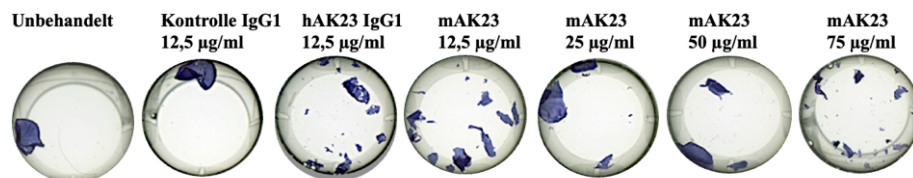


Abbildung 9: Wirkung der murinen Anti-Desmoglein-3-Antikörper (mAK23) auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten

Das Vorgehen wurde bereits unter Abbildung 8 erläutert. (A) Anzahl der Fragmente in den Dispase-vermittelten Zelldissoziationsversuchen mit unterschiedlicher Dosis an rekombinante Anti-Dsg3-Antikörper, mAK23 (mIgG1) und hAK23 (IgG1 und IgG4), in hTert-Zellen. Die Inkubation des Antikörpers mit einer Konzentration ab 25 µg/ml führte zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Fragmentzahl. Eine Konzentration von 75 µg/ml ergab ähnliche Fragmentzahlen wie 12,5 µg/ml der rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 (IgG1 und IgG4). (B) Repräsentative Darstellung: Die Grafik stellt die Monolayerfragmentierung dar, die durch die Zelldissoziationsversuche entstand. Mithilfe einer Varianzanalyse durch „one-way ANOVA“ wurde die statistische Signifikanz ermittelt. Die Adjustierung wurde zusätzlich durch die Bonferroni-Korrektur vorgenommen (n=5; \*\*\* p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe).

Im Versuch zeigte sich eine effektive Konzentration von 75 µg/ml für den Anti-Dsg3-Antikörper mAK23 der mIgG1-Subklasse. Diese Menge wurde mit der Referenzdosis von 12,5 µg/ml für die Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 der IgG1- und IgG4-Subklassen gleichgesetzt. Hierbei wurde die Anzahl der Zell-Monolayerfragmente als Leitfaden verwendet, da eine ähnliche Anzahl von Fragmenten bei einer Dosis von 75 µg/ml mAK23 zu einer etwa gleichen Menge von Fragmenten bei 12,5 µg/ml hAK23 IgG1 führte (Abbildung 9A). Verschiedene Konzentrationen des Anti-Dsg3-Antikörpers

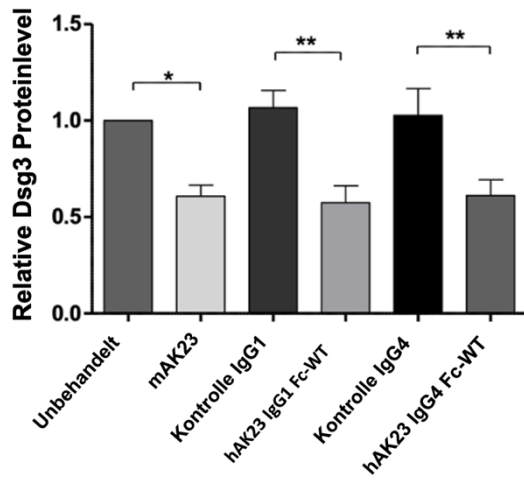
mAK23 wiesen ebenfalls eine dosisabhängige Anzahl der Fragmente auf und führten somit zu einer Instabilisierung der interzellulären Adhäsion, welche ebenfalls mit der Erhöhung der Antikörperdosis einherging.

### **4.3 Wirkung der rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23/mAK23) auf den relativen Dsg3-Proteinlevel in hTert-Zellen**

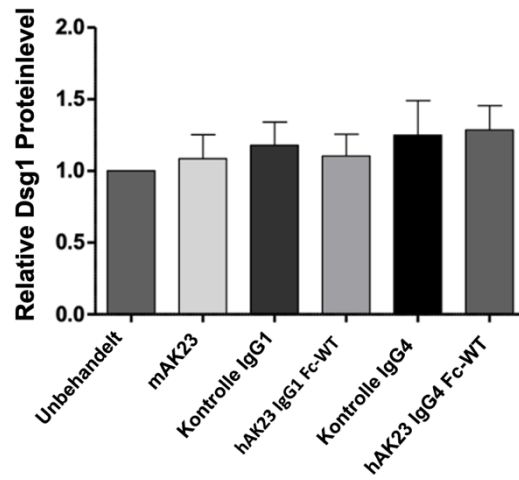
Als nächstes wurde der Einfluss der IgG1- und IgG4-Subklassen der rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper, hAK23 und mAK23, auf den relativen Dsg3-Proteinlevel charakterisiert. Es ist bereits bekannt, dass nicht alle Anti-Dsg3-Antikörper die gleiche Pathogenität aufweisen und somit nicht dieselbe Störung hinsichtlich der interzellulären Adhäsion verursachen (Schmitt et al., 2023). Es bedarf an zusätzlichen Studien zur Ermittlung des genauen Mechanismus hinsichtlich der Pathogenität eines Antikörpers in Bezug auf die Zelladhäsionsstörung.

Im vorliegenden Versuch wurde die relative Dsg3-Proteinmenge unter Einfluss der Anti-Dsg3-Antikörper geprüft, um eine mögliche Korrelation zwischen der Pathogenität eines Antikörpers und dem relativen Dsg3-Proteinlevel zu ermitteln. Hierzu wurden für 24 Stunden konfluente hTert-Zellen mit einer Dosis von 12,5 µg/ml hAK23 (IgG1 und IgG4) und mAK23 (IgG1) behandelt. Zudem wurden weiteren Zellgruppen dieselbe Dosis mit hIgG1 und hIgG4 beigemischt, die als Negativkontrollen fungierten. Die unbehandelte Zellgruppe gilt hierbei als Kontrollgruppe. Die benötigte Lysatmenge wurde anhand der zu bestimmenden Proteine ermittelt, sodass eine Menge von 10 µg Lysat sowohl für den Dsg3- als auch für den Dsg1-Proteinnachweis verwendet wurde. Die Dsg-Expression in der Kontrollgruppe wurde als Referenz gesetzt (Abbildung 10A/B). Auch die Negativkontrolle ergab keine Veränderung der Dsg3- und Dsg1-Expression. Hingegen reduzierte sich im Vergleich zur Negativkontrolle und der unbehandelten Zellgruppe die Dsg3-Expression bei den Zellen, die mit den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern der hAK23- (IgG1 und IgG4) und mAK23-Variante behandelt wurden (Abbildung 10A/B). Unverändert blieb auch der Dsg1-Proteinlevel durch die Anti-Dsg3-Antikörper gegenüber der Kontrollgruppe. Neben der Ermittlung der gleichmäßigen und korrekten Proteinladung diente das GAPDH auch zur Sicherstellung, dass ein gleichmäßiger Transfer vom Gel zur Membran stattgefunden hat (Abbildung 10C).

A



B



C

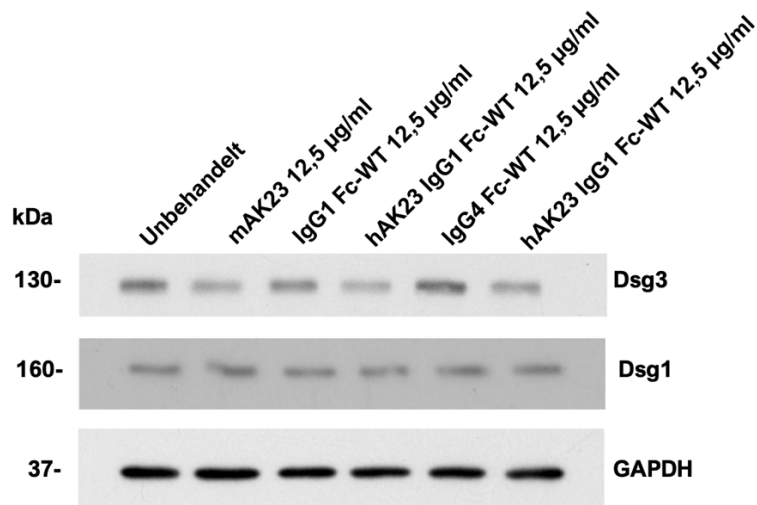


Abbildung 10: Wirkung der rekombinanten Anti-Desmoglein-3-Antikörper (hAK23 und mAK23) auf den relativen Dsg3-Proteinlevel in hTert-Zellen

Das Vorgehen der Antikörperinkubation diente der Western Blot-Analyse. So wurden hTert-Zellen auf einer 24-Well-Platte kultiviert und mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern hAK23 des IgG-1 und -4 Subtyps, inkubiert. Die, mit 12,5 µg/ml IgG-1 und -4 Fc-WT, allein behandelten Zellgruppen bildeten dabei die Negativkontrolle. Es wurde eine Western Blot-Analyse zum Proteinmengenachweis von Dsg3 und Dsg1 durchgeführt. (A) Relative Dsg3-Proteinmenge der mit den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper

hAK23 (IgG-1 und -4) behandelten Zellen führten zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Dsg3-Proteinlevels (n= 13; \*\*\* p<0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle). Die Inkubation mit dem monoklonalen mAK23, mit der Dosis 12,5 µg/ml, resultierte ebenfalls in einer statistisch signifikanten Reduktion der Dsg3-Proteinmenge (n=13; \*\* p<0,01 im Vergleich zur Negativkontrolle). (B) Relative Dsg1-Proteinmenge: Bei den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern hAK23 (IgG-1 und -4) behandelten Zellen zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Dsg1-Proteinmenge. Die Inkubation mit dem monoklonalen mAK23 bewirkte ebenfalls keine statistisch signifikante Reduktion der Dsg1. (C) Repräsentative Western Blot Analysen: Das Dsg3 war in der Kontrollgruppe bei 137 kDa deutlich nachweisbar, während die Banden in den Untersuchungsgruppen mit den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern behandelten Zellen schwach nachweisbar waren. Die Dsg1-Signale wiesen zudem alle das gleiche Intensitätsmuster auf. Als Ladekontrolle diente das bei 37 kDa nachweisbare GAPDH, welches ebenfalls für jede Bande über ein identisches Intensitätsmuster verfügte.

## **4.4 Die Rolle von FcRn in der Pathogenese von Pemphigus**

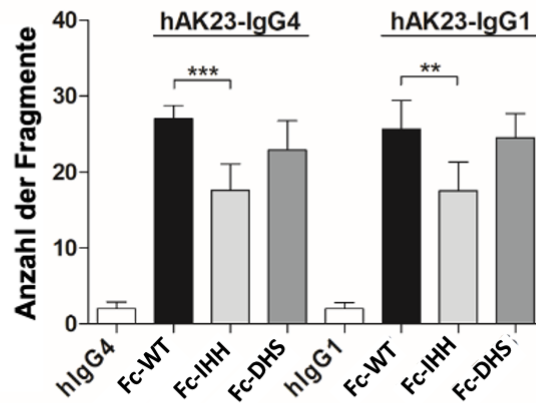
### *4.4.1 Wirkung verschiedener hAK23 Fc-Varianten auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten*

Zum besseren Verständnis, inwiefern das IgG-Fc-Fragment zur hFcRn-Affinität beiträgt, wurden weitere Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 mit unterschiedlichen Fc-Fragmentvarianten und verschiedenen Bindungsstärken zu hFcRn anhand weiterer Zelldissoziationsversuche untersucht. Diese AK23-Fc-Varianten wurden durch das Fc-Engineering hergestellt. Unter Fc-Engineering ist die Modifizierung des Fc-Bereichs der spezifischen Antikörper zu verstehen. Hierbei wird die Eigenschaft durch den Aminosäuren-Austausch verändert, wodurch die Affinität des Fc-Bereichs für FcRn reguliert werden kann. Durch die gezielten Veränderungen des Fc-Bereichs kann die Interaktion zu FcRn verbessert oder reduziert werden. So zeigen die verwendeten AK23-Fc-Varianten unterschiedliche Eigenschaften: Die Fc-IHH Variante geht keine Bindung mit FcRn ein. Dies liegt am Austausch von drei Aminosäuren (I253H/H310A/H435A) im Fc-Bereich, wodurch sowohl die Bindung an den humanen als auch an den murinen FcRn verhindert wird (Qiao et al., 2008). Anders verhält sich die AK23-Fc-DHS Variante, die eine längere Halbwertszeit im Blutkreislauf aufgrund einer günstigen pH-abhängigen Bindung an hFcRn ermöglicht. Die pH-abhängige Bindung wurde durch Substitutionen (L309D, Q311H und N434S) eingeführt, dem sogenannten „*pH-Toggle-Switch*“, welches die pharmakokinetische Eigenschaft im Vergleich zu nativem IgG1 verbessert. Dadurch wird dem Antikörper ermöglicht, in einem sauren Milieu der Endosomen an FcRn stärker

als Wildtyp-IgG zu binden, um sich somit vor der lysosomalen Degradation zu schützen. Diese Fc-Variante wurde bereits in konventionellen hFcRn-transgenen Mäusen und in Knock-in-Mausstämmen untersucht (Delidakis et al., 2019).

Bei den rekombinanten Anti-Dgs3-Antikörpern handelt es sich um den hAK23 mit Fc-WT der IgG1- oder IgG4-Subklasse, welche als Positivkontrolle dienen. Da eines der Ziele der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung der verschiedenen IgG-Subklassen (IgG-1 und -4) ist, wurden die durch Fc-Engineering hergestellten AK23-Fc-IHH und AK23-Fc-DHS Varianten der unterschiedlichen IgG-Isotypklassen (IgG-1 und -4) im folgenden Versuch gegenübergestellt und auf mögliche Pathogenitätsunterschiede untersucht. Des Weiteren wurde die effektive Konzentration dieser neu eingesetzten AK23-Fc-Varianten dem Referenzwert, der bereits charakterisierten rekombinanten Anti-Dgs3-Antikörper hAK23 (IgG1 und IgG4) gleichgesetzt; sie betrug für alle angewendeten Antikörper in diesem Versuch 12,5 µg/ml. Als Kontrollgruppe wurde der Fc-WT (hIgG1/4) eingesetzt.

A



B

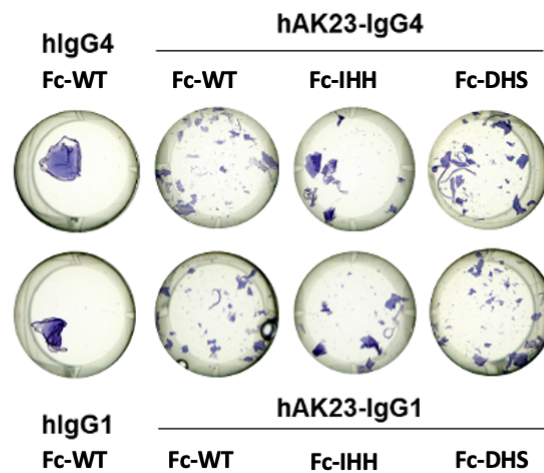


Abbildung 11: Wirkung der unterschiedlichen hAK23 Fc-Varianten auf die interzelluläre Adhäsion in humanen Keratinozyten

Das detaillierte Vorgehen des Versuches mit den unterschiedlichen AK23-Fc-Varianten wurde bereits in Abbildung 8 illustriert. (A) Anzahl der Fragmente in den Zelldissoziationsversuchen mit jeweils derselben Dosis von 12,5 µg/ml der rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper in den hTert-Zellen. Hierbei wurden die IgG4- und IgG1-Antikörper-Subklassen für die AK23-Fc-IHH und AK23-Fc-DHS Antikörper verglichen. Die Inkubation der hTert-Zellen mit der Wildtyp-Variante, hAK23 (IgG4 und IgG1), diente erneut als Positivkontrolle, wobei die Kontrollgruppe sich aus das hIgG-1 und -4 zusammensetzte. Die Inkubation der rekombinanten Antikörper mit einer Konzentration von 12,5 µg/ml hat zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Fragmentanzahl geführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels „one-way ANOVA“ und wurde mit der Bonferroni- Korrektur adjustiert. (n=5; \*\* p<0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle) (B)

Repräsentative Darstellung der Monolayerfragmentierung, die durch die Zelldissoziationsversuche vermittelt wurde.

Die Eigenschaft des AK23-Fc-IHH, keine Bindung mit dem FcRn einzugehen, ließ sich durch die reduzierte Anzahl der Fragmente im Vergleich zur Positivkontrolle ebenfalls belegen, weshalb die AK23-Fc-IHH Variante als weniger pathogen im Vergleich zur hAK23-Fc-WT-Variante eingestuft wurde (Abbildung 11A). Anders verhielt sich die AK23-Fc-DHS Variante im Zelldissoziationsversuch. Dort kam es, analog zur Positivkontrolle, zu einer erhöhten Anzahl der Monolayerfragmente, die deshalb als pathogen klassifiziert wurde. Zudem konnte im Vergleich zur hAK23-Fc-WT-Variante keine höhere Fragmentanzahl ermittelt werden (Abbildung 11A und 11B). Aufgrund der vorliegenden Daten lässt sich ein potenzieller Zusammenhang zwischen der Affinität der Fc-Region eines Antikörpers zu hFcRn und der Antikörperpathogenität vermuten.

#### *4.4.2 Wirkung von bivalentem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment auf die interzelluläre Zelladhäsion in Keratinozyten*

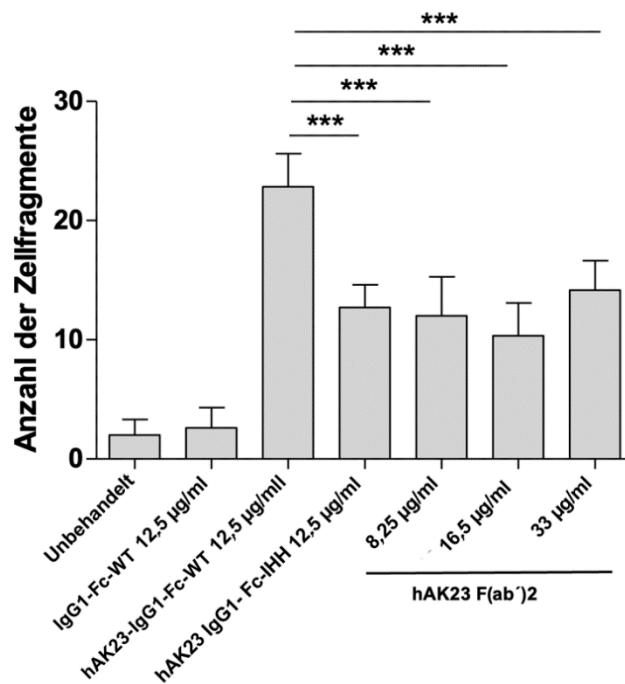
In den vorherigen Experimenten, welche mit dem murinen Antikörper mAK23 und den unterschiedlichen AK23-Fc-Varianten durchgeführt wurden, lag der Analysefokus auf der Fc-Region und ihrer Bindungskapazität zu FcRn und der damit in Verbindung gebrachten Pathogenität. Obwohl die Fc-Region modifiziert wurde, war sie immer in den bisher verwendeten Antikörpern vorhanden. In den Fokus rückte schließlich die Rolle der Fab-Fragmente, welche die antigenbindende Funktion der Antikörper repräsentieren, jedoch an FcRn nicht binden können. Es sollte daher die Rolle des Antikörpers hinsichtlich der Pathogenität untersucht werden, wenn die Fc-vermittelte Effektorfunktion und FcRn-Bindung nicht gegeben ist. Hierfür wurde das rekombinant hergestellte, bivalente F(ab')<sub>2</sub>-Fragment verwendet (Rosenstein et al., 2020).

Der Nachweis, ob die Anti-Dsg3-Fragmente pathogen sind, trotz der fehlenden Fc-Region eines Antikörpers, wurde anhand von Zelldissoziationsversuchen mit dem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment durchgeführt. Dabei war es nun interessant zu erfahren, wie pathogen das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment hinsichtlich der Monolayerfragmentierung ist. Dazu wurden hTert-Zellen mit unterschiedlicher Dosis des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments inkubiert, da diese aufgrund des kleineren Molekulargewichtes an die Referenzdosis von 12,5 µg/ml für den Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 angepasst werden mussten. Eine Dosis von 12,5 µg/ml hAK23 entsprach der Dosis von 8,3 µg/ml des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments. Bei diesem Experiment reduzierte sich die Anzahl der Fragmente bei den mit dem hAK23 F(ab')<sub>2</sub>-Fragment

inkubierten Zellgruppen im Vergleich zum hochpathogenen und vollständigen Anti-Dsg3-Antikörper (IgG1), der als Positivkontrolle diente.

Verglichen wurde der F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper mit der ebenfalls weniger pathogenen Fc-IHH Variante, welche ähnliche Eigenschaften aufzeigte. So konnte im Vergleich zur hAK23-Fc-WT-Variante eine signifikante Reduzierung der Fragmentanzahl in beiden Zellgruppen festgestellt werden (Abbildung 12A, B). Zudem wurde eine Dosisreihe getestet, die zeigt, dass F(ab')<sub>2</sub> keine dosisabhängige Fragmentierung herbeiführte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FcRn-Bindung für die volle Pathogenizität erforderlich ist.

A



B

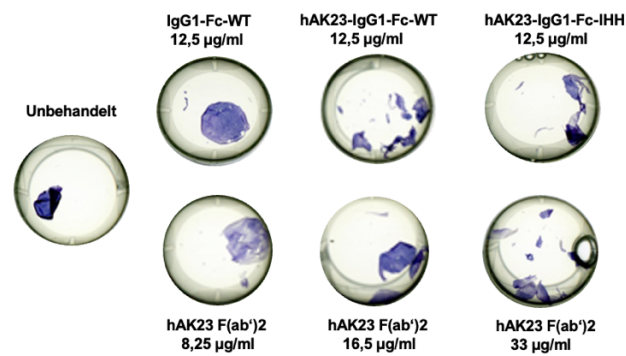


Abbildung 12: Wirkung des bivalentem hAK23 F(ab')<sub>2</sub>-Fragments auf die interzelluläre Zelladhäsion in Keratinozyten

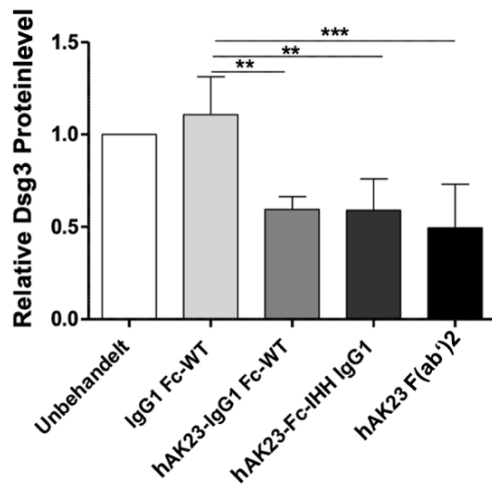
Die Versuchsdurchführung mit dem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment orientierte sich an der detailliert beschriebenen Vorgehensweise gemäß dem Dispase-vermittelten Zelldissoziationsprotokoll, wie es bereits in Abbildung 8 veranschaulicht wurde. (A) Anzahl der Fragmente in den Zelldissoziationsversuchen mit einer Konzentration von 12,5 µg/ml des hAK23-Fc-IHH- Variante und der steigenden Dosis (ab 8,25 µg/ml) des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments in hTert-Zellen. Hierbei diente der rekombinante Anti-Dsg3-Antikörper AK23 Fc-WT

als Positivkontrolle, wobei die Negativkontrolle das hIgG1 ausmachte. Die Inkubation der hTert-Zellen mit dem hAK23-Fc-WT mit einer Konzentration von 12,5 µg/ml hat eine statistisch signifikante Zunahme der Fragmentzahl hervorgerufen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die statistische Auswertung basiert auf one-way ANOVA und wurde mittels der Bonferroni-Korrektur adjustiert (n=6; \*\*\* p<0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle und der AK23-Fc-IHH Variante und des hAK23-F(ab')<sub>2</sub>-Fragments). Trotz steigender Konzentration des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments (8,25 µg/ml, 16,5 µg/ml und 33 µg/ml) im Vergleich zur Negativkontrolle, konnte kein dosisabhängiger Effekt festgestellt werden. So führten die unterschiedlichen Konzentrationen des F(ab')<sub>2</sub>-Fragments zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Fragmentzahl und somit zu keiner dosisabhängigen Fragmentierung im Vergleich zur Positivkontrolle in den hTert-Zellen. (B) Repräsentative Darstellung der in den Zelldissoziationsversuchen vermittelten Monolayerfragmentierung.

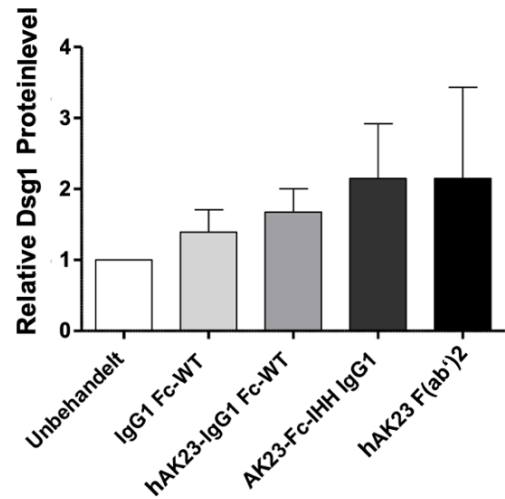
#### *4.4.3 Wirkung der AK23 Fc-Varianten und der F(ab')<sub>2</sub> auf den Dsg3-Proteinlevel in hTert-Zellen*

Anschließend wurde der Einfluss des rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpers hAK23 (IgG1) sowie die zuvor in den Zelldissoziationsversuchen bereits getesteten und durch Fc-Engineering hergestellten Anti-Dsg3-Antikörper AK23-Fc-IHH und das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment auf die Veränderung des Dsg3-Proteinlevels untersucht. Ziel war es, die Wechselwirkung zwischen der Pathogenität der Antikörper und der Dsg3-Expression zu ermitteln. Die Zellen wurden zudem mit dem Anti-Dsg3-Antikörper und der zuvor bestimmten Referenzdosis von 12,5 µg/ml behandelt. Die verwendeten Antikörper waren der pathogene hAK23 (IgG1) und die durch die Zelldissoziationsversuche als weniger pathogen erwiesenen hAK23-Fc-IHH und das hAK23 F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. Die Dsg3 Signalintensität für Untersuchungsgruppen mit dem rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23-IgG1 Fc-WT), der AK23-Fc-IHH Variante und dem F(ab')<sub>2</sub> Fragment war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (IgG1 Fc-WT) reduziert (Abb. 13A). Anders sah die Signalintensität für das Dsg1 aus. Hier konnten identische Signale für alle Gruppen bei 160 kDa ermittelt werden (Abb. 13B). Die Proteinladung, welche durch die GAPDH Proteinexpression kontrolliert wurde, wies für jede Probe bis auf die, für die Fc-IHH Variante, welche eine stärkere Signalintensität aufwies, dasselbe Signalmuster auf (Abb. 13C). Dementsprechend konnte im vorliegenden Versuch eine Wechselwirkung zwischen der Pathogenität der verwendeten Antikörper in den Monolayer-Dissoziationsversuchen und dem Dsg3-Proteinlevel nicht impliziert werden.

A



B



C

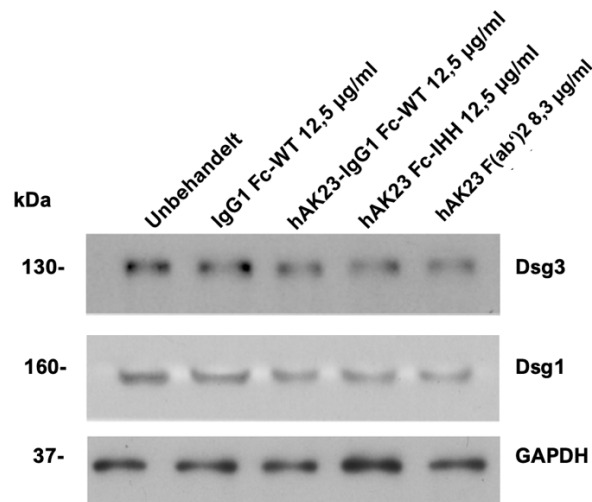


Abbildung 13: Wirkung der AK23 Fc-Varianten und der F(ab')<sub>2</sub> auf den Dsg3-Proteinlevel in hTert-Zellen

Es wurden hTert-Zellen auf einer 24-Well-Platte bis zur 100-prozentigen Konfluenz kultiviert und anschließend mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> versehenen KGM2 für 24 Stunden benetzt. Für weitere 24 Stunden wurden die Zellen daraufhin mit den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern hAK23 des IgG1 Subtyps, den AK23-Fc-IHH Varianten und den F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten, inkubiert. Unbehandelte Zellen, welche allein mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> benetzt wurden, sowie Zellgruppen, die mit hIgG1 allein behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle. Es wurde folgend eine Western Blot Analyse zum Proteinmengenachweis des desmosomalem Dsg3 und Dsg1 durchgeführt. (A) Ermittlung der Relativen Dsg3-Proteinmenge durch

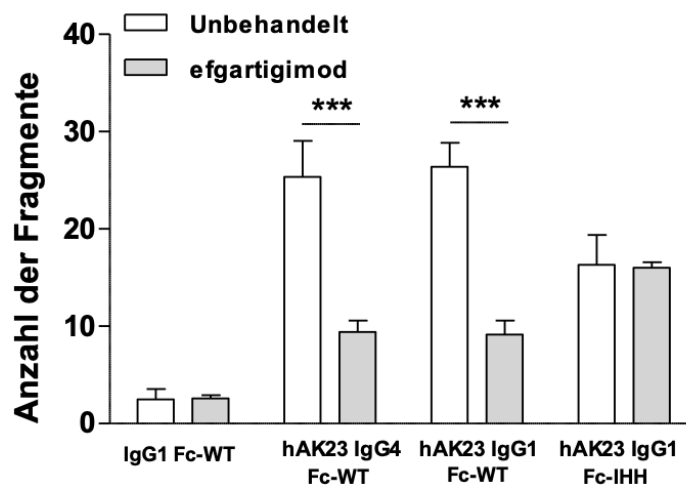
Zellen, die mit dem rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 Fc-WT (IgG1), AK23-Fc-IHH Variante und dem F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelt wurden (n≥4; \*\* p<0,001 im Vergleich zur Negativkontrolle). (B) Ermittlung der Relativen Dsg1-Proteinmenge: Zellgruppen wurden hierbei mit rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 Fc-WT (IgG1), AK23-Fc-IHH Variante und dem F(ab')<sub>2</sub> Fragment inkubiert. (C) Dsg3 Signalermittlung bei 137 kDa für Untersuchungsgruppen mit dem rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper, der AK23-Fc-IHH Variante und dem F(ab')<sub>2</sub> Fragment. Die Dsg1-Signale mit ähnlichen Intensitätsmuster wurden bei 160 kDa ermittelt. Als Ladekontrolle diente das bei 37 kDa nachweisbare GAPDH.

## **4.5 Wirkung von Efgartigimod auf die interzelluläre Zelladhäsion in humanen Keratinozyten**

Der FcRn-Antagonist Efgartigimod (Argx113) wurde durch die Modifizierung von fünf Aminosäureresten mithilfe der „*antibodies that enhance IgG degradation*“ (ABDEG)-Technologie hergestellt, wie bereits in 1.3.3 erläutert. Zur Untersuchung der durch die pathogenen Antikörper, wie dem hAK23 der IgG1-Subklasse, verursachten Zelladhäsionsstörungen unter Einfluss des FcRn-Antagonisten (Efgartigimod) und seinem stabilisierenden Effekt auf die Zellintegrität wurden weitere Zelldissoziationsversuche unternommen. Dabei wurde eine Konzentration zur Vorinkubation der hTert-Zellen von 25 µg/ml Efgartigimod als effektiv gewertet und für weitere Versuche integriert. Hierzu griff ich auf frühere Untersuchungen zurück, in denen die angegebene Dosis zu einer signifikanten Verbesserung der Zelladhäsionsstörungen führte, die durch die pathogenen Antikörper entstanden sind (Zakrzewicz et al., 2022). Die hTert-Zellen wurden zunächst für 30 Minuten mit Efgartigimod vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit dem Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 (IgG-1/-4, -Fc-WT oder Fc-IHH-Varianten) inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit den Anti-Dsg3-Antikörpern für 24 Stunden inkubiert wurden. So wies die Keratinozytenzelllinie mit Vorbehandlung durch Efgartigimod eine Reduktion der Fragmentenanzahl des Monolayers für die Anti-Dsg3-Antikörper hAK23 im Vergleich zur Positivkontrolle auf. Bei Keratinozyten, die mit Efgartigimod vorbehandelt wurden und anschließend mit hAK23 Fc-IHH behandelt wurden, konnte kein protektiver Effekt der Monolayerfragmentierung ermittelt werden. Die zugleich geringe Fragmentanzahl war auch, im Vergleich zu Fc-WT, ohne Efgartigimod ersichtlich (Abbildung 14A). Dadurch lässt sich ableiten, dass durch Efgartigimod kein stabilisierender Effekt auf die interzelluläre Adhäsion in dieser Zellgruppe eingetreten ist. Daraus lässt sich schließen,

dass der protektive Effekt von Efgartigimod nur wirkt, wenn die Antikörper in der Lage sind, an FcRn zu binden. Die hAK23 IgG1 und -4-induzierten interzellulären Zellhaftungsstörungen konnten demnach unter Einfluss von Efgartigimod hinsichtlich des stabilisierenden Effektes auf das Monolayer verbessert werden (Abbildung 14A).

A



B

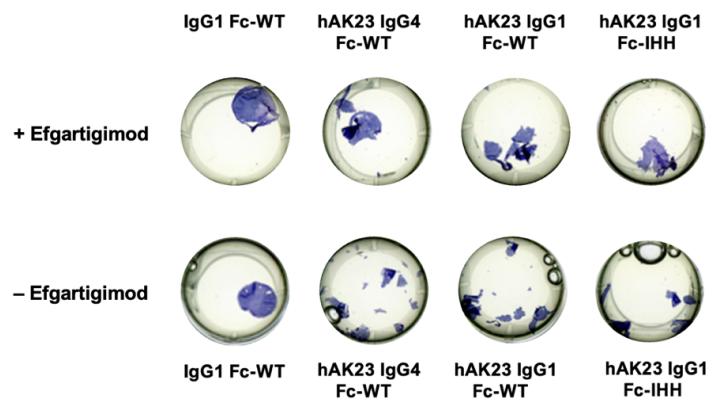


Abbildung 14: Wirkung von Efgartigimod auf die interzelluläre Zelladhäsion in humanen Keratinozyten

Die hTert-Zellen wurden gemäß des Zelldissoziationsversuchs mit den rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpern (hAK23 Fc-WT und AK23-Fc-IHH Variante) mit einer Konzentration von 12,5 µg/ml inkubiert. Die Zellen, die allein mit den erwähnten Antikörpern inkubiert wurden, dienten als

Kontrollzellen. Demgegenüber wurden hTert-Zellen zusätzlich für 30 min mit 25 µg/ml Efgartigimod vorbehandelt, bevor sie mit den gleichen Antikörpern wie die Positivkontrolle inkubiert wurden. Die Negativkontrolle erfolgte dabei in beiden Untersuchungsgruppen mit hIgG1. (A) Anzahl der Fragmente in den Zelldissoziationsversuchen mit der Vorinkubation der hTert-Zellen (grau) durch Efgartigimod mit einer Konzentration von 25 µg/ml. Die statistische Analyse wurde mit two-way ANOVA durchgeführt und mittels Bonferroni-Korrektur adjustiert. Die mit Efgartigimod vorbehandelten Zellen, welche mit hAK23 behandelt wurden, weisen eine statistisch signifikante Reduzierung der Fragmentzahlen auf ( $n \geq 4$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , verglichen mit der Kontrollgruppe =weiß). Die AK23-Fc-IHH Variante wies in beiden Gruppen eine im Vergleich zu AK23-Fc-WW reduzierte Fragmentanzahl auf, sodass sich kein schützender Effekt durch Efgartigimod ermitteln ließ. (B) Die Grafik stellt die Monolayerfragmentierung dar, die durch die Zelldissoziationsversuche ermittelt wurde.

## 5 Diskussion

### 5.1 Versuchsanordnung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung rekombinanter Anti-Dsg3-Antikörper in einer humanen Keratinozytenzelllinie. Hierfür wurden humane hTert-Keratinozyten analysiert. Diese von der menschlichen Epidermis stammende Zelllinie ist durch eine Zelltransformation immortalisiert, um sie über eine längere Zeit in Kultur nehmen zu können (Beckert et al., 2019).

Im Vergleich hierzu konnte auf HaCaT-Zellen zurückgegriffen werden. Diese aus menschlichen epidermalen Keratinozyten stammende und in der Forschung präferierte Zelllinie wurde den präläsionalen Hautregionen entnommen, die von mutierten Hautläsionen umgeben sind. Die Zelllinie ist zudem kostengünstig zu kultivieren und hat unsterbliche Eigenschaften. Die Nachteile dieser Zelllinie bestehen jedoch darin, dass das Tumorsuppressorprotein p53-Protein mutiert ist und die Zellen passagenabhängig Chromosomenaberrationen aufweisen (Singh et al., 2022).

Eine weitere mögliche Zelllinie für die Forschung sind primäre humane Keratinozyten, welche natürlichen Ursprungs sind. Diese Primärzellen haben jedoch den Nachteil, dass sie häufig und nur begrenzt kultiviert werden können, wodurch die Kultivierung dieser Zellen relativ teuer ausfällt. Auch die Reproduzierbarkeit der Primärzellen ist aufgrund der geringen Lebensdauer und des unterschiedlichen Herkunfts beeinträchtigt (Richter et al., 2021). Es ist somit besser, eine Zelllinie auszuwählen, welche unsterbliche Eigenschaften mit einer hohen Reproduzierbarkeit besitzt, ohne die zuvor erwähnten Nachteile aufzuweisen.

In dieser Arbeit wurden hTert/KER-CT als Modellsystem zur desmosomalen Adhäsion untersucht, denn diese Zellen bilden ähnlich den primären Keratinozyten unter Kultur ein stabiles Monolayer aus und weisen zugleich ein immortalisiertes Verhalten durch die Expression von menschlicher Telomerase und Maus- „*Cyclin Dependent Kinase 4*“ (Cdk4) auf. Auch bei dieser Zelllinie werden Chromosomenaberrationen festgestellt, jedoch ohne Beeinträchtigung der Differenzierung (Cerezo et al., 2003).

Die zuvor beschriebenen Probleme werden durch die unsterbliche und genetisch stabile Eigenschaft bei den hTert- Zellen umgangen. Diese Vorteile verschaffen dem Zellmodell

für die vorliegende Wissenschaftsarbeit Validität. Außerdem können so Versuche so oft wie nötig durchgeführt werden, da diese Zellen unbegrenzt vorrätig vorliegen.

Die Expression der Desmogleine in hTert-Zellen erfolgt unter Kalziueinfluss. Die Kultivierung der hTert-Zellen erfolgt in ihrem eigenen, für sie hergestellten Nährmedium. Die Zellen wurden hierfür in ihrem Nährmedium mit einem Kalziumspiegel von zunächst 0,05 mM und anschließend mit einer erhöhten Kalziumkonzentration von 2 mM kultiviert, denn für die Zelladhäsion bedarf es einer Expression stabiler desmosomaler Cadherine, wozu der erhöhte Kalziumspiegel erforderlich ist. Vorherige Studien bestätigten zudem, dass die Desmogleine bei einem reduzierten Kalziumspiegel von 0,05 mM zumeist perinukleär lokalisiert und geringfügig exprimiert waren, während eine Kultivierung für 24 Stunden mit 2 mM Kalzium eine erhöhte Expression der Desmogleine aufweist. Zudem wurden die Desmogleine an den Zell-Zellgrenzen ermittelt (Beckert et al., 2019). Somit wurden für meine Versuche mit einem Nährmedium, welches eine Kalziumkonzentration von 2 mM aufwies, die Zellen für 24 h inkubiert und eine ausreichende Reifung der Desmogleine in den hTert-Zellen induziert.

Es stellt sich zudem die Frage, inwiefern sich menschliche PV-Serumantikörper von monoklonalen Antikörpern unterscheiden (Spindler et al., 2018). In meiner Studie eignet sich die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, da sich diese zur Protokolletablierung und zur Vereinheitlichung von Experimenten besser eignen. Polyklonale PV-IgGs führen zudem zur unterschiedlichen Krankheitsausprägung, was eine Standardisierung erschwert (Fitzpatrick & Newcomer, 1980). Sie bestehen außerdem aus einem Gemisch von Antikörpern mit verschiedenen Antigenen, weshalb Nebeneffekte unausweichlich sind. Dieses natürliche Gemisch von PV-IgG ist in monoklonalen Antikörpern nicht vorhanden. Zudem sind polyklonale Antikörper aus PV-Patienten nicht in ausreichender Menge verfügbar, sodass sie schnell aufgebraucht sind und eine Reproduzierung erschwert wird (Russo et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass monoklonale Antikörper wie der Anti-Dsg3-Antikörper AK23 aus der Maus (mAK23) (Tsunoda et al., 2003) gut definiert sind, und unerwartete Effekte auf Grund von verschiedenen Antigenen somit ausbleiben. Jedoch binden Maus-Antikörper nicht an hFcRn (Ober et al., 2000), sodass chimär rekombinante Anti-Dsg3-Antikörper in meiner Arbeit eingesetzt wurden, da sie eine stärkere Bindung mit dem hFcRn eingehen sollen. Dies liegt am humanen Fc-Anteil, und einem murinen Fab-Teil, welcher identisch mit mAK23 ist (Tsunoda et al., 2003). Außerdem können

rekombinante Antikörper weiter durch Fc-Engineering umstrukturiert werden, wie bei der bereits in 1.3.3 vorgestellten Fc-IHH Variante. Durch die Änderung von Aminosäuren in den konstanten Domänen des Fc-Fragments der Antikörper lässt sich so an der Eigenschaft der Antikörperbindung experimentieren (Qiao et al., 2008).

## **5.2 Der IgG-Subtyp hat keinen signifikanten Effekt auf die Pathogenität von Anti-Dsg3-Antikörpern**

Das zentrale Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Anti-Dsg3- Antikörper hAK23 im IgG1-Isotyp zu charakterisieren und daraufhin einen Vergleich zwischen diesem und dem hAK23 im IgG4-Isotyp zu ziehen. Wie bereits erwähnt, tritt bei PV-Patienten während des aktiven Stadiums häufig ein Anti-Dsg3-IgG4-Antikörper im Blutserum auf, während in der Remissionsphase vermehrt ein Anti-Dsg3-IgG1-Antikörper beobachtet wird. Dies führte zu der Annahme, dass die IgG4-Subklasse eine pathogene Rolle hinsichtlich der Erkrankung einnimmt, während die IgG1-Subklasse eher weniger pathogen ist. (Bhol et al., 1994; David et al., 1989; Futei et al., 2001; Kricheli et al., 2000). Vorherige *In-vitro*-Studien diesbezüglich ermitteln keine Unterschiede in der Pathogenität zwischen der IgG1- und IgG4-Subklasse und weisen trotz der Strukturunterschiede durch die konstante Region keinen funktionellen Unterschied auf die Blasenentstehung auf (Lo et al., 2016). Da es scheint, dass die Pathogenität der beiden Subklassen keinen Unterschied aufweist, muss die Ursache für das häufige Auftreten von IgG4 in der aktiven Erkrankungsphase ermittelt werden. So tritt IgG4 zumeist bei allergischen Reaktionen mit langanhaltender Antigenstimulation auf und erfährt zudem einen komplexen Klassenwechsel (Aalberse & Schuurman, 2002; Stavnezer et al., 2008). Dieser Klassentausch wird durch Zytokine, wie dem IL-4, ausgelöst. Das IL-4 induziert Enzyme, die für die DNA-Rekombination notwendig sind. Im Vergleich hierzu ist IgG1 aufgrund der vorteilhaften Lage innerhalb des genetischen Abschnitts der konstanten Region die am häufigsten vorkommende IgG-Subklasse. Ein Klassenwechsel tritt hier nur nach erneuter Antigenbegegnung auf. So führt das IL-4 zusammen mit dem IL-13 zunächst zu einem Wechsel von IgG1 zu IgG4. Hierauf folgen weitere Interleukin-Wechselwirkungen, wodurch ein Wechsel von IgG4 zu IgE induziert wird (Tantilipikorn et al., 2022). Bei Pemphigus-Patienten wurden jene Th2-Zytokine (wie u.a. der IL-4) in hohen Maßen festgestellt, die den Klassentausch von IgG1 zu IgG4 stimulieren (Takahashi et al., 2007). Diese Beobachtung stimmt mit dem

Antikörperprofil der Patienten mit aktiver Erkrankung überein, welche ein höheres Verhältnis von IgG4 zu IgG1 aufweisen. Lo et al. (2016) äußern in ihrer Studie die Vermutung, dass die pathogenen Eigenschaften der variablen Regionen bei PV nicht durch die IgG- Subklassen beeinflusst werden, sodass die Bedeutsamkeit der variablen Antikörperregionen bei der Bestimmung der Pathogenität in den Vordergrund rückte (Lo et al., 2016).

Frühere Forschungsergebnisse konnten hierzu nachweisen, dass nicht alle Anti-Dsg3-Antikörper die gleiche Pathogenität aufweisen. Eine geringere pathogene Wirkung zeigen beispielsweise jene Antikörper, die an die Membran-proximalen Abschnitte der extrazellulären EC5- Domäne binden, im Vergleich zu denjenigen, die an die N-terminale adhäsive Kontaktfläche (EC1) von Dsg3 binden (Tsunoda et al., 2003). Zudem wurde festgestellt, dass es zur Akantholyse aufgrund der Bindung von Autoantikörpern an die extrazellulären Domänen 1+2 (EC1 + EC2) und somit an den Amino-Terminus von Dsg3 im Mausmodell kam. Dieser Effekt wurde jedoch nicht bei Autoantikörpern beobachtet, die gegen EC3-EC5, weiter carboxylterminal lokalisiert, gerichtet sind (Amagai et al., 1992). Sekiguchi et al. (2001) identifizierten ebenfalls die N-terminale adhäsive Kontaktfläche von Dsg3 als entscheidendes Epitop für die Autoimmunität bei PV. Ein weiterer monoklonaler Antikörper unter dem Namen 2G4, welcher aus einer B-Zell-Hybridom-Zelllinie stammt (nach Immunisierung eines HLA-transgenen Mausmodells mit der extrazellulären Domäne von menschlichem Dsg3), wurde überprüft (Eming et al., 2014). Das Resultat legt nahe, dass 2G4 die interzelluläre Keratinozytenadhäsion stört und die intrazelluläre Umverteilung von Dsg3 durch Aktivierung des p38MAPK-Signalwegs auslöst. Zudem konnten die Untersuchungen nachweisen, dass 2G4 auf die membranständige Region EC5 von Dsg3 abzielt und Akantholyse induziert (Hudemann et al., 2023). Diese Ergebnisse widersprechen der Vorstellung, dass nur IgG-Autoantikörper, die auf den NH2-Terminus der Dsg3-Ektodomänen abzielen als pathogen anzusehen sind.

Unterschiede bei den rekombinanten Antikörpern lassen sich u.a. auf die Tatsache zurückführen, dass sich die Antikörper gegen verschiedene Dsg3-Epitope richten, womit sie einen wesentlichen Einfluss auf die aktivierten Signalwege und damit auf die Pathogenität haben (Tsunoda et al., 2003). Diese epitopspezifische Signalgebung der

Anti-Dsg3/1-Antikörper leistet einen wichtigen Beitrag zur Erklärung der Entstehung von Pemphigus, denn diese Antikörper tragen maßgeblich zur Blasenbildung in der menschlichen Epidermis bei (Spindler et al., 2018). Daher ist die Stabilität der desmosomalen Adhäsion von Keratinozyten durch die Hemmung der Signalübertragung ein innovativer und gleichzeitig auch ergänzender Behandlungsansatz für die Erkrankung, welcher bei der Therapie gebührende Beachtung finden sollte (Spindler et al., 2013). Es bedarf jedoch weiterer Studien, um die Pathogenität der Anti-Dsg3/1-Antikörper durch den Auslösungsvorgang der epitopspezifischen Signalübertragung zu begründen.

Meine Ergebnisse zur Ermittlung der Pathogenität der rekombinanten hAK23-Antikörpervarianten (IgG1/IgG4) auf die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten durch die Zelldissoziationsversuche zeigen ein vergleichbares pathogenes Verhalten der beiden Antikörper-Isotypen. Hierbei ist anzumerken, dass sich beide Antikörper gegen dasselbe Dsg3-Epitop richten. Außerdem weisen sie eine sehr ähnliche FcRn-Affinität auf, weil sie innerhalb der CH2-CH3-Region nur geringfügige Variationen haben, sodass die Beeinträchtigung der FcRn-Bindung minimal ist (Vidarsson et al., 2014). So löste eine Dosis von bereits 12,5 µg/ml des Anti-Dsg3-Antikörpers (hAK23 IgG1) dieselbe Monolayerfragmentzahl aus wie der als pathogen deklarierte hAK23 der IgG4-Subklasse. Die Anzahl der Monolayerfragmente stieg dabei mit der Dosiserhöhung auf 25 µg/ml und 50 µg/ml und führte zu einer konzentrationsabhängigen Fragmentierung des Monolayers. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es einen geringen strukturellen Unterschied in der Bindungsstelle für FcRn zwischen den Antikörper-Unterklassen gibt. Darüber hinaus deuten sie darauf hin, dass diese Unterschiede auch die spezifische Bindung an Epitope und die damit verbundene Signalübertragung beeinflussen können.

### **5.3 Der murin-rekombinante mAK23-Antikörper ist weniger pathogen als die entsprechende Variante mit der humanen Fc-Region**

Ein weiteres Ziel dieser Studie besteht darin, die pathogene Wirkung des murin-rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörpers (mAK23) im Vergleich zum chimär-rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper der IgG1-Unterklasse (hAK23) zu untersuchen. So stellte sich u.a. heraus, dass der rekombinante Antikörper mAK23, ähnlich wie hAK23,

eine dosisabhängige Fragmentierung des Monolayers in hTert-Zellen verursachte. Allerdings erforderte mAK23 eine höhere Konzentration, um eine vergleichbare Anzahl an Fragmenten zu bewirken, obwohl sowohl der murine (mAK23) als auch der chimäre (hAK23) Anti-Dsg3-Antikörper dasselbe Dsg3-Epitop besetzen und strukturell identische variable Domänen aufweisen. Die Vermutung, dass das Ergebnis auf die unterschiedlichen Subklassen zurückzuführen ist (Zakrzewicz et al., 2022), konnte somit widerlegt werden, da beide hier verwendeten Antikörper zur IgG1-Unterklasse gehören. Zudem wurde der Anti-Dsg3-Antikörper mAK23 durch Umformatierung modifiziert, sodass die Maus-DNA-Sequenzen der variablen Fragmente der schweren und leichten Ketten in menschliche IgG- bzw. menschliche Kappa-Leichtketten-Rückgrate eingefügt wurden. Das resultierende chimäre hAK23-Antikörperkonstrukt enthält menschliche CL, CH1- und Scharnierregionen, sowie einen menschlichen Fc-Teil, der die Bindung an hFcRn ermöglicht. Die Ergebnisse der Zelldissoziationsversuche legen erneut nahe, dass der Unterschied in den wirksamen Konzentrationen der beiden rekombinanten Antikörper hAK23 und mAK23 aus ihrer Bindung zu FcRn resultiert. Somit weist hAK23 bereits bei geringerer Dosis (12,5µl/ml) im Vergleich zu mAK23 (50µl/ml), trotz derselben Dsg3-Epitopbindung, ein destruktives Verhalten auf die Desmosomenadhäsion auf (siehe Abschnitt 4.2). Diese Erkenntnis lässt auf die kompatible Bindungsspezifität des menschlichen Fc-Teils mit menschlichem FcRn schließen (Ober et al., 2001; Zakrzewicz et al., 2022).

Wie bereits in 1.3.2 erwähnt, erfordert die IgG-Homöostase eine FcRn-Fc-Bindung, sodass manche Mutationen an der vielseitigen CH2-CH3- Bindungsstelle von IgG-Antikörpern diese Bindungsfähigkeit beeinträchtigen (Roopenian & Akilesh, 2007). Anders als gewöhnliche Fc-Rezeptoren für IgG (FcγRs) ist die FcRn-Fc-Bindung pH-abhängig und bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 eingeschränkt. Im Vergleich hierzu ist bei saurem pH-Wert in den Endosomen (6-6,5) die Bindungsaffinität zu FcRn erhöht. Möglich ist diese durch die Titration von Histidinresten in der CH2-CH3-Bindungsstelle von IgG und der anschließenden Interaktion mit sauren Resten auf der FcRn-Oberfläche. Bereits die Anzahl der titrierbaren Reste in der Fc-Scharnierregion kann je nach Antikörper-Subtyp und Spezies (Mensch vs. Maus) variieren, sodass bereits Unterschiede in den Aminosäureresten an bestimmten Positionen im menschlichen IgG1 im Vergleich zum Maus-IgG1 eine erhebliche Rolle spielen (J.-K. Kim et al., 1994; Raghavan et al., 1995; Shields et al., 2001; Vaughn et al., 1997). Mehrere Studien weisen

auf die hydrophobe FcRn-Fc-Interaktion hin, welche durch Salzbrückenbildungen unter sauren Verhältnissen entsteht (Roopenian & Akilesh, 2007). Hier rücken erneut die Charakterisierungen der Fc-FcRn-Interaktion in den Vordergrund mittels AK-Modulationsmechanismen. Umstrukturierungen an bestimmten Positionen in den CH2-CH3-Bereichen (wie L251, M252Y, I253, L309, H310, L314, Q311 und N434) sowie die Bildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung durch H310 spielen eine erhebliche Rolle bei der pH-abhängigen Bindung (Oganesyan et al., 2014; X. Wang et al., 2018).

## **5.4 Die Affinität der Anti-Dsg3-Antikörper zum FcRn beeinflusst die Pathogenität**

Die Modulation der Antikörper durch das sogenannte Fc-Engineering ist eine Methode zur Veränderung der Antikörper-Affinität zu hFcRn. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die durch die Fc-Modulation hergestellten und verwendeten Antikörper charakterisiert. Hierbei sollte die Rolle des Fc-Abschnitts näher betrachtet werden. Sogenannte YTE-Modelle (M252Y/S254T/T256E), welche aus den Fc-Phagenbibliotheken ausgewählt wurden, sollen eine gesteigerte Bindung an hFcRn bei einem pH-Wert von 6 aufweisen. Dies liegt an der Ausdehnung von Salzbrücken zwischen Fc- und der  $\beta$ 2m-Untereinheit von FcRn (Dall'Acqua et al., 2006). Eine YTE-Mutation stellt das Motavizumab-YTE dar, welcher ein humanisierter Antikörper gegen das Respiratorische Synzytialvirus ist.

Untersuchungen mit dem Motavizumab-YTE zeigten eine dosisabhängige Halbwertszeitverlängerung im Vergleich zu Motavizumab IgG1 (Robbie et al., 2013). Diese Untersuchung erlaubt die Schlussfolgerung, dass Modifikationen, die eine stärkere Bindung an FcRn im sauren pH- Milieu bewirken, eine Halbwertszeitverlängerung induzieren. Auch Zalesky et al. (2010) beschäftigten sich mit Varianten (M428L/N434S), die mittels zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen die Bindungsstärke für menschlichen FcRn bei pH 6,0 erhöhten (X. Wang et al., 2018; Zalevsky et al., 2010). Weitere Versuche mit den AK23-Fc-IHH und -DHS Varianten unterstreichen diese sensible FcRn-Fc-Bindungseigenschaft. Der AK23-Fc-IHH Antikörper soll keine Bindung mit FcRn eingehen auf Grund des Austausches von drei Aminosäuren (I253H/H310A/H435A) im Fc-Bereich, wodurch die Bindung an den humanen und den murinen FcRn eingeschränkt ist (Qiao et al., 2008; Spiekermann et al., 2002). So zeigte

die AK23-Fc-IHH Variante, wie bereits erwartet, eine reduzierte Anzahl der Fragmente im Vergleich zur Positivkontrolle in den Zelldissoziationsversuchen. Die reduzierte Anzahl der Monolayerfragmente verdeutlicht die schwache pathogene Wirkung im Vergleich zur hAK23-Fc-WT Variante. Anders zeigte sich hierbei die AK23-Fc-DHS Variante. Der AK23-Fc-DHS-Antikörper soll eine verbesserte pH-abhängige Bindung an hFcRn aufweisen. Die pH-abhängige Bindung wurde durch Substitutionen L309D, Q311H und N434S eingeführt (Lee et al., 2019). Der Antikörper wies, ähnlich der Positivkontrolle, eine erhöhte Fragmentanzahl des Monolayers und somit eine pathogene Wirkung auf. Auch A. Zakrzewicz konnte die Pathogenität bei bereits niedrigen Konzentrationen der Fc-DHS Variante nachweisen und den Antikörper somit als pathogener im Vergleich zur hAK23-Fc-WT Variante einstufen (A. Zakrzewicz, unveröffentlicht). Die verfügbaren Daten zu den hier verwendeten Anti-Dsg3-Antikörpern deuten auf eine mögliche Korrelation zwischen der Bindungsaffinität der Fc-Region an hFcRn und der Antikörper-Pathogenese hin. Diese Erkenntnis liefert zudem weitere Grundlagen zur Effektivität als auch zur Dosierung der Antikörper hinsichtlich der Optimierung des therapeutischen Nutzens.

Zudem wurde nicht nur die Effektorfunktion anhand unterschiedlicher hAK23-Fc-Varianten untersucht, sondern es wurden auch Zelldissoziationsversuche mit dem hAK23 F(ab')<sub>2</sub>-Fragment durchgeführt, in denen der Fc-Abschnitt fehlte, und die Wechselwirkung zwischen FcRn und dem Fab-Fragment untersucht wurde. In den Zelldissoziationsversuchen zeigte sich im Vergleich zum Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23 IgG1) eine reduzierte Fragmentanzahl in der Zellgruppe, welche mit dem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment inkubiert wurde. Das Ergebnis spiegelt die bedeutende Rolle des Fc-Fragments der Anti-Dsg3-Antikörper für die Interaktion mit hFcRn wider. In Kontrast zum vorliegenden Ergebnis konnten jedoch auch vorherige Studien nachweisen, dass die typischen PV-Symptome durch sogenannte bivalente F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente in vitro ausgelöst wurden (Sajda & Sinha, 2018). Dieser Mechanismus war also ohne die Fc-Region des Antikörpers möglich. Eine Erklärung hierfür könnte an der präzisen Untersuchung der Zelladhäsion durch Dispase-assoziierte Zellteilungsversuche liegen. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen können quantitative Daten über die Adhäsionseigenschaften der Zellen liefern und sind somit gut geeignet. Zu betonen ist daher, dass die hier verwendeten Methoden deutlich voneinander abweichen.

## **5.5 Die Pathogenität von Anti-Dsg3-Antikörpern korreliert nicht mit dem relativen Dsg3-Proteinspiegel**

Weitere Studien erwähnten die PV-IgG vermittelte Degradation der desmosomalen Cadherine mittels unterschiedlicher Signalwege in Keratinozyten und den damit verbundenen Verlust der Adhäsionskraft (Delva et al., 2008; Schmitt et al., 2023). So konnte schließlich nachgewiesen werden, dass der alleinige Verlust der desmosomalen Cadherine nicht genügt, um die Akantholyse auszulösen und die damit verbundene Zelladhäsion zu stören (Sajda & Sinha, 2018).

Die vorliegenden Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass die Dsg3-Proteinmenge nicht zwingend mit der Pathogenität eines Antikörpers korrelieren muss. Mittels Western Blot Analyse war eine Verringerung der Dsg3-Proteinlevel auch bei AK23-Fc-IHH und dem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment zu beobachten, die zuvor in den Zelldissoziationsversuchen als gering pathogen eingestuft wurden. Außerdem verursachte mAK23 bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml eine geringere Akantholyse im Vergleich zu hAK23 aber eine vergleichbare Reduktion des Dsg3-Proteinlevels. Diese Ergebnisse waren unerwartet und unterstreichen die These, dass der Dsg3-Verlust nicht ausreicht, um die Akantholyse der Keratinozyten auszulösen. Spindler et al. (2011) konnten bei der Verwendung von HaCaT-Zellen keine Dsg-Degradation feststellen, wenn die Zellen über eine längere Zeit (5 bis 8 Tage) mit hohem CaCl<sub>2</sub> kultiviert wurden. Selbst nach der Entfernung von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> wurde die desmosomale Adhäsion und die Membranlokalisierung von Desmoglein nicht weiter beeinträchtigt. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass trotz der fehlenden Dsg-Depletion typische Effekte von PV-IgG (Umstrukturierung von Dsg, Beeinträchtigung der interzellulären Adhäsionsmechanismen) eindeutig nachweisbar waren. Zudem heben Neuere Studien aus der Arbeitsgruppe Vielmuth (2024) die desmosomale Hyperadhäsion als wichtigen Regulationsmechanismus der desmosomalen Hyperadhäsion hervor (Steinert et al., 2024). Die Hyperadhäsion beschreibt den Übergang von einem calciumabhängigen zu einem calciumunabhängigen Zustand, wobei letzterer zu einer verstärkten Adhäsion führt und zugleich die desmosomale Dynamik beeinträchtigt (Bartle et al., 2017; Fuchs et al., 2020). Dieser physiologische Wechsel von calciumabhängigen zu calciumunabhängigen Desmosomen ist eine wichtige Voraussetzung für die Keratinozytenmigration und der damit verbundenen Wundheilung (D. R. Garrod et al., 2005). Steinert et al. konnten nachweisen, dass sich die verschiedenen Isoformen der desmosomalen Cadherine hinsichtlich der

Hyperadhäsion unterscheiden. So ist vor Allem Dsg3 entscheidend für die desmosomale Hyperadhäsion in Keratinozyten, während Dsg1 nicht zwangsläufig einen hyperadhäsiven Zustand aufweist (Steinert et al., 2024).

Zusätzlich lassen sich Signalereignisse wie die Aktivierung von p38MAPK als Antwort auf PV-IgG beobachten. Dies legt nahe, dass eine Degradation von Dsg3 nicht unbedingt ausschlaggebend für den interzellulären Adhäsionsverlust ist, jedoch unter speziellen Umständen zur PV-Pathogenese beitragen kann (Spindler et al., 2011). Eine andere mögliche Ursache für den komplexen Dsg3-Verlust sind die Bindungseigenschaften der PV-Antikörper an desmosomale Cadherine und die damit verbundene Signalweginduktion, welche letztendlich die Desmoglein-Degradation induziert (van der Wier et al., 2023). So gehen Studien davon aus, dass für einen akanttholytischen Zustand die Aktivierung einer Kinase nicht genügt und stattdessen ein Zusammenspiel zwischen mehreren Kinasen benötigt wird. Dabei bewirken nicht alle Kinasen ausschließlich die Dsg3-Regulierung, sondern durch ihre Aktivität werden auch bestimmte Mediatorproteine, wie das Plakophilin, beeinflusst (Kaur et al., 2022; Kugelmann et al., 2019).

Die Inaktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden verbesserte die Zelladhäsionsmechanismen und trug damit einen bedeutenden Schritt zum Verständnis der Pathogenese von PV bei, worauf bereits die Studie von Kaur et al. (2022) hinweist. Jedoch ist die Signalweghemmung derzeit noch Gegenstand aktueller Forschung. In früheren Studien, bei denen Arzneimittel wie der Phosphodiesteraseinhibitor-4, Apremilast, eingesetzt wurde, war hingegen keine Wirkung auf den Dsg-Abbau feststellbar. Dies lässt erneut darauf schließen, dass unterschiedliche nachgeschaltete Ziele in Form von Signalkaskaden oder eine spezifische Kompartimentierung von cAMP eine wichtige Rolle spielen. Die Erhöhung von cAMP beeinflusst die Cadherin-vermittelte Adhäsion in verschiedenen Geweben auf unterschiedliche Weise (Sigmund et al., 2023). Weiter konnte auch das Efgartigimod den Verlust von Dsg3 nicht kompensieren, sodass sich weiter bestätigt hat, dass die Verbesserung der Keratinozytenadhäsion nicht von der Menge des Dsg3-Spiegels direkt abhängt (Zakrzewicz et al., 2022).

## 5.6 Efgartigimod hat eine stabilisierende Wirkung auf die interzelluläre Adhäsionskraft von hTert-Zellen

Den therapeutischen Ansatz dieser Arbeit liefert die Zusammenarbeit mit dem Pharmaunternehmen argenx (Gent, BEL). Das hierfür verwendete Fc-Derivat, Efgartigimod, sollte dahingehend untersucht werden, ob es die Wirkung der anti-Dsg3-Antikörper inhibieren kann und inwieweit dies von FcRn abhängt. Efgartigimod ist ein monoklonales IgG1-Fc-Fragment, welches anhand der sogenannten ABDEG-Mutationen modifiziert wurde, um eine bevorzugte Bindung mit FcRn einzugehen. Diese Bindungsaffinität wurde mithilfe von 5 Modifizierungen (M252Y, S254T, T256E, H433K und N434F) ermöglicht (Vaccaro et al., 2005). Es kommt so zur Konkurrenz zwischen endogenen IgGs mit Efgartigimod um die FcRn-Bindungsstelle. Die endogenen IgGs werden dabei durch die erhöhte Bindungsstärke des modifizierten Fc-Fragments und das Blockieren der Bindungsstelle von hFcRn lysosomal abgebaut (Howard et al., 2021; Sockolosky & Szoka, 2015). Bereits vorherige Studien diesbezüglich belegten den therapeutischen Erfolg durch die Verhinderung der IgG-FcRn Interaktion und der daraus resultierenden Verminderung der freien IgGs im Blutserum, welche entscheidend für die Krankheitsmorphologie von verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, Myasthenia gravis, Pemphigus vulgaris, primäre Immunthrombozytopenie und systemischer Lupus erythematodes, sind. Weiter konnte eine randomisierte *In-vivo*-Studie mit 62 gesunden freiwilligen Probanden den IgG-Spiegel um etwa 75 % durch die Verabreichung eines FcRn-Antagonisten (Efgartigimod) reduzieren (Ulrichs et al., 2018).

Die hier präsentierten Daten sprechen für den therapeutischen Ansatz durch Efgartigimod. So konnte Efgartigimod die pathogene Wirkung der rekombinanten Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23 IgG1/IgG4) bereits in den Zelldissoziationsversuchen reduzieren und erzeugte einen stabilisierenden Effekt auf die Monolayerintegrität. Die Vergleichsgruppen, welche mit Efgartigimod vorbehandelt wurden, zeigten eine geringere Anzahl der Monolayerfragmente im Vergleich zu denen, welche alleinig mit den Anti-Dsg3-Antikörpern inkubiert wurden. Vergleichend hierzu konnte Efgartigimod in der Versuchsgruppe mit der hAK23 Fc-IHH Antikörpervariante, wie erwartet, keinen Effekt erzielen. Dies liegt daran, dass dieser Antikörper so gestaltet ist, dass er nicht an FcRn bindet, was jedoch für die Wirksamkeit von Efgartigimod entscheidend ist.

Zudem hatten Zakrzewicz et al. (2022) keine Verringerung der pathogenen IgGs im Kulturmedium durch Efgartigimod festgestellt, wodurch der Verdacht besteht, dass die Abschwächung der Monolayerfragmentierung nicht allein auf die IgG-Homöostase, sondern auf weitere Mechanismen zurückzuführen ist (Zakrzewicz et al., 2022).

Dieser Gedankengang vom Transport der Anti-Dsg3-Antikörper zu den Keratinozyten durch die Transzytose, welches durch FcRn ermöglicht wird, lässt sich weiterverfolgen (Qi & Cao, 2021). An dieser Stelle ist ebenfalls wichtig anzumerken, dass sich das klinische Bild bei 14 von 22 Probanden mit leichten bis mittelschweren PV oder PF durch Efgartigimod und einer zusätzlichen adjuvanten Therapie mit einem Kortikosteroid innerhalb kurzer Zeit verbesserte (Abulikemu et al., 2023). Die Behandlung mit Efgartigimod trägt zwar zur Remission der Krankheit bei, welcher jedoch über die Hemmung des IgG-Recyclings hinausgeht (Goebeler et al., 2022; Maho-Vaillant et al., 2022). Zudem muss laut Maho-Vaillant et al. die Anti-Dsg3-Antikörpermenge nicht mit der Krankheitsaktivität korrelieren, während ein Anti-Dsg1-Antikörperspiegel spezifisch in enger Verbindung mit Hautrezidiven gebracht wird (Maho-Vaillant et al., 2022). Diese Annahme könnte künftig in weiteren Studien adressiert werden. Zudem sollte der Fokus verstärkt auf den Signalwegen liegen, die bisher noch nicht ausreichend erforscht sind. Mit dieser Studie wurde das Verständnis der desmosomalen Keratinozytenadhäsion erweitert, sodass auf diesen Erkenntnissen weitere Forschung zur Vielschichtigkeit des Krankheitsbildes aufbauen kann.

## 6 Zusammenfassung

Die Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris führt bei den Betroffenen zu Blasenbildungen auf der Haut und den Schleimhäuten. Die Ursache für diese Erkrankung liegt in den Antikörpern, die auf die Desmogleine abzielen. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Zellverbindung in den Hautzellen und werden durch die Autoantikörper beeinträchtigt. Wichtig ist neben den Angriffszielen der Autoantikörper zwischen zwei Phasen zu unterscheiden: einer aktiven Phase, in der hauptsächlich IgG4-Autoantikörper im Serum vorhanden sind, und einer Remissionsphase, in der häufiger IgG1-Autoantikörper nachgewiesen werden. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, diese IgG-Subklassen gegenüberzustellen. Hierzu wurden chimär rekombinante Anti-Dsg3-Antikörper (hAK23) der IgG1- und IgG4-Unterklasse verwendet. Diese zeigten in den Untersuchungen keinen Unterschied in ihrer Pathogenität, da für beide Antikörper eine ähnliche Anzahl an Zell-Monolayerfragmenten in den mit hTert-Zellen vorgenommenen Dissoziationsversuchen festgestellt werden konnte. Somit weist der IgG-Subtyp keinen signifikanten Effekt auf die Anti-Dsg3-Antikörper-Pathogenität auf. Zusätzlich wurde auch der Vergleich zwischen verschiedenartigen Antikörpern und deren Verhalten in Bezug auf hFcRn untersucht. Es konnte u.a. ermittelt werden, dass der murin-rekombinante Antikörper mAK23 eine dosisabhängige Fragmentierung der Monolayer in hTert-Zellen verursacht. Der Maus-Antikörper mAK23 benötigte jedoch eine höhere Konzentration, um eine vergleichbare Anzahl an Fragmenten zu induzieren, was darauf hindeutet, dass er weniger pathogen ist als die entsprechende Variante mit humanem Fc-Teil. In weiteren Versuchen, bei denen verschiedene Varianten der Anti-Dsg3-Antikörper Fc-Region untersucht wurden, zeigte sich, dass die Bindungsstärke des Fc-Teils der Anti-Dsg3-Antikörper an FcRn die Pathogenität beeinflusst.

Frühere Untersuchungen zu diesem Thema konnten bereits die Wirksamkeit der Therapie an lebenden Organismen verdeutlichen, indem die Hemmung der Interaktion zwischen IgG und FcRn die Menge an freiem IgG im Blutserum reduzierte. In den vorliegenden Experimenten führte Efgartigimod, ein FcRn-Antagonist, zu einem stabilisierenden Zustand der hTert-Zellen. Zudem zeigte sich in Versuchen zum Proteinmengennachweis von Dsg3, dass die Pathogenität der Anti-Dsg3-Antikörper nicht ausschließlich mit dem relativen Dsg3-Proteinspiegel korreliert und weitere Mechanismen beteiligt sind, die nicht nur auf den Verlust der desmosomalen Cadherine zurückzuführen sind.

## 7 Summary

The autoimmune disease Pemphigus vulgaris leads to blistering of the skin and mucous membranes of affected patients. The cause of this condition lies in the presence of antibodies targeting desmogleins. These proteins play a crucial role in cell adhesion in keratinocytes and are functionally affected by the autoantibodies. It is important to distinguish between two disease phases: an active phase, in which mainly IgG4 autoantibodies are present in the serum, and a remission phase, where IgG1 autoantibodies are more commonly detected. The main aim of the present study was to compare the pathogenicity of different IgG subclasses. Chimeric recombinant anti-Dsg3 antibodies (hAK23) of the IgG1 and IgG4 subclasses were used for this purpose. These studies found no difference in the pathogenicity between the two antibodies, as a similar number of cell monolayer fragments were observed in dissociation experiments conducted with hTert cells. Thus, the IgG subtype does not significantly affect the pathogenicity of anti-Dsg3 antibodies.

Additionally, the comparison between different antibodies and their behavior regarding hFcRn was investigated. It was found that the murine recombinant antibody mAK23 caused a dose-dependent fragmentation of the monolayer of hTert cells. However, mAK23 required a higher concentration than hAK23 to induce a comparable number of fragments, indicating that it is less pathogenic than the corresponding variant with a human Fc region. In further experiments assessing various variants of the Fc region of anti-Dsg3 antibodies, I showed that the binding strength of the Fc portion of anti-Dsg3 antibodies to FcRn influences their pathogenicity. In the present experiments, Efgartigimod, an FcRn antagonist that reduces IgG levels, resulted in a stabilizing state of the hTert cells. Previous studies on this topic have already demonstrated the effectiveness of the therapy in living organisms by blocking the interaction between IgG and FcRn, thereby reducing the amount of free IgG in the blood serum. In the present experiments, Efgartigimod led to a stabilization of hTert cell monolayers. Furthermore, in experiments on Dsg3 protein quantification, it was observed that the pathogenicity of anti-Dsg3 antibodies does not solely correlate with the relative Dsg3 protein levels, indicating involvement of additional mechanisms not attributable to the loss of desmosomal cadherins.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

**ABDEG:** Antibodys that enhance IgG degradation

**AG:** Arbeitsgruppe

**APS:** Ammoniumpersulfa

**Argx113:** Efgartigimod

**BSA:** Bovine Serum Albumine

**Ca<sup>2+</sup>:** Kalziumion

**CaCl<sub>2</sub>:** Kalziumchlorid

**CO<sub>2</sub>:** Kohlenstoffdioxid

**DHS:** durch Fc-engineering entwickelter Fc-Teil von Immunglobulinen, die die Substitutionen L309D/Q311H/N434S enthält

**Dsc:** Desmocollin

**Dsg:** Desmoglein

**DTD:** Desmoglein terminal domain

**EC:** Extrazelluläre Cadherindomäne

**ECD:** extracellular core domain

**EDTA:** Ethylendiamintetraessigsäure

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor

**et al.:** et alteri

**Fab:** Antigene-binding fragment

**Fc:** fragment crystallizable

**FcRn:** Neonataler Fc-Rezeptor

**FCS: Fötale Kälberserum**

**GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid**

**h4B3: Rekombinanter Anti-Dsg3 Antikörper**

**HaCaT: Spontan immortalisierte humane Keratinozyten**

**hAK23: Humanisierter Anti-Dsg3 Antikörper**

**HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution**

**HCl: Salzsäure**

**HRP: Horseradish peroxidase**

**hTert: Immortalisierte humane Keratinozyten**

**IA: Intrazellulärer Anker**

**ICS: Intrazelluläre cadherin-like Sequenz**

**IF: Immunfluoreszenz**

**Ig: Immunglobulin**

**IHH: durch Fc-engineering entwickelter Fc-Teil von Immunglobulinen Inositol-1,4,5- trisphosphat**

**IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trisphosphat**

**IPL: Prolinreiche linker Region**

**kDa: Kilodalton**

**KGM2: Keratinocyte Growth Medium 2**

**M: Mol**

**mAK23: Monoklonaler Anti Dsg3 Antikörper aus der Maus**

**MHC: Major histocompatibility complex**

**MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetazolium Bromid**

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Natriumcarbonat**

**NaCl: Natriumchlorid**

**p38MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen**

**PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese**

**PBS: Phosphate buffered saline**

**PCR: Polymerase Kettenreaktion PF Pemphigus foliaceus**

**pH: potential Hydrogenii**

**PI: Proteinase Inhibitor Cocktail**

**PKC: Proteinkinase C**

**PV: Pemphigus vulgaris**

**Rpm: Rounds per minute**

**RUD: Repeat unit domains**

**Scr: Tyrosinkinase Scr**

**SDS: Natriumdodecylsulfat**

**TBST: Tris-buffered saline Tween 20**

**TE: Tris-EDTA**

**TEMED: Tetramethylthylendiamin, '1,2-bis(dimethylamino)-ethan Tris**

**Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan**

**U: Einheiten**

**WB: Western Blot**

**WT: Wildtyp**

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b> STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE UNTERSCHIEDE DER IGG-SUBKLASSEN HINSICHTLICH DER EIGENSCHAFTEN KOMPLEMENTAKTIVIERUNG UND FC <sub>RN</sub> - BINDUNG (MODIFIZIERT NACH VIDARSSON ET AL., 2014) .....	8
<b>TABELLE 2:</b> TECHNISCHE INSTRUMENTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN MIT DEM JEWEILIGEN HERSTELLER .....	22
<b>TABELLE 3:</b> CHEMIKALIEN .....	26
<b>TABELLE 4:</b> PUFFER .....	29
<b>TABELLE 5:</b> ENZYME .....	30
<b>TABELLE 6:</b> PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER .....	31
<b>TABELLE 7:</b> PATHOGENE ANTI-DSG3 ANTIKÖRPER MIT UNTERSCHIEDLICHEN FC- VARIANTEN UND KONTROLLANTIKÖRPER .....	32
<b>TABELLE 8:</b> AK-FRAGMENT .....	34
<b>TABELLE 9:</b> SDS-PAGE TRENNGEL	
<b>TABELLE 10:</b> SDS-PAGE SAMMELGEL .....	39

## 8.3 Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> DESMOSOMALER AUFBAU (MODIFIZIERT NACH DELVA ET AL., 2009).....	2
<b>ABBILDUNG 2:</b> DESMOSOMALE DOMÄNENSTRUKTUR (MODIFIZIERT NACH DELVA ET AL., 2009).....	3
<b>ABBILDUNG 3:</b> EXPRESSIONSMUSTER DESMOSOMALER CADHERINE (MODIFIZIERT NACH WASCHKE, 2008) .....	4
<b>ABBILDUNG 4:</b> STRUKTUR VON IMMUNGLOBULIN G (MODIFIZIERT NACH HUSSAIN ET AL., 2021).....	7
<b>ABBILDUNG 5:</b> DARSTELLUNG DES NEONATALEN Fc-REZEPTORS (MODIFIZIERT NACH PATEL & BUSSEL, 2020) .....	13
<b>ABBILDUNG 6:</b> FcRN BEDINGTE IGG-HOMÖOSTASE (MODIFIZIERT NACH SOCKOLOSKY & SZOKA, 2015).....	15
<b>ABBILDUNG 7:</b> BLOCKIERUNG DER FcRN BEDINGTEN IGG-HOMÖOSTASE DURCH EFGARTIGIMOD (MODIFIZIERT NACH ARGEX, 2021) .....	17
<b>ABBILDUNG 8:</b> WIRKUNG VON REKOMBINANTEN ANTI-DESMOGLEIN-3-ANTIKÖRPERN (HAK23 IGG1) AUF DIE INTERZELLULÄRE ADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN .....	42
<b>ABBILDUNG 9:</b> WIRKUNG DER MURINEN ANTI-DESMOGLEIN-3-ANTIKÖRPER (MAK23) AUF DIE INTERZELLULÄRE ADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN .....	45
<b>ABBILDUNG 10:</b> WIRKUNG DER REKOMBINANTEN ANTI-DESMOGLEIN-3-ANTIKÖRPER (HAK23 UND MAK23) AUF DEN RELATIVEN DGS3-PROTEINLEVEL IN hTERT-ZELLEN .....	47
<b>ABBILDUNG 11:</b> WIRKUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN HAK23 Fc-VARIANTEN AUF DIE INTERZELLULÄRE ADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN .....	50
<b>ABBILDUNG 12:</b> WIRKUNG DES BIVALENTEM HAK23 F(AB') <sub>2</sub> -FRAGMENTS AUF DIE INTERZELLULÄRE ZELLADHÄSION IN KERATINOZYTEN.....	53
<b>ABBILDUNG 13:</b> WIRKUNG DER AK23 Fc-VARIANTEN UND DER F(AB') <sub>2</sub> AUF DEN DGS3-PROTEINLEVEL IN hTERT-ZELLEN.....	55
<b>ABBILDUNG 14:</b> WIRKUNG VON EFGARTIGIMOD AUF DIE INTERZELLULÄRE ZELLADHÄSION IN HUMANEN KERATINOZYTEN .....	57

## 8.4 Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C., & Schuurman, J. (2002). IgG4 breaking the rules. *Immunology*, *105*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1046/J.0019-2805.2001.01341.X>
- Abdeldaim, D. T., & Schindowski, K. (2023). Fc-Engineered Therapeutic Antibodies: Recent Advances and Future Directions. *Pharmaceutics*, *15*(10), 2402. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15102402/S1>
- Abulikemu, K., Hu, F., Liang, J., & Kang, X. (2023). Targeting therapy in pemphigus: Where are we now and where are we going? *Heliyon*, *9*(6). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E16679>
- Acqua, W. F. D., Woods, R. M., Ward, E. S., Palaszynski, S. R., Patel, N. K., Brewah, Y. A., Wu, H., Kiener, P. A., & Langermann, S. (2002). Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*(9), 5171–5180. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.9.5171>
- Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., & Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *40*(2 Pt 1), 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(99\)70183-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(99)70183-0)
- Bartle, E. I., Urner, T. M., Raju, S. S., & Mattheyses, A. L. (2017). Desmoglein 3 Order and Dynamics in Desmosomes Determined by Fluorescence Polarization Microscopy. *Biophysical Journal*, *113*(11), 2519–2529. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2017.09.028>
- Beckert, B., Panico, F., Pollmann, R., Eming, R., Banning, A., & Tikkanen, R. (o. J.). *Immortalized Human hTert/KER-CT Keratinocytes a Model System for Research on Desmosomal Adhesion and Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris*. <https://doi.org/10.3390/ijms20133113>
- Bhol, K., Mohimen, A., & Ahmed, A. R. (1994). Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, *189 Suppl 1*(SUPPL. 1), 85–89. <https://doi.org/10.1159/000246938>

- Bloom, J. W., Madanat, M. S., Marriott, D., Wong, T., & Chan, S. Y. (1997). Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Science*, 6(2), 407–415. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560060217>
- Booth, B. J., Ramakrishnan, B., Narayan, K., Wollacott, A. M., Babcock, G. J., Shriver, Z., & Viswanathan, K. (2018). Extending human IgG half-life using structure-guided design. *mAbs*, 10(7), 1098. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1490119>
- Broome, C. (2023). Efgartigimod alfa for the treatment of primary immune thrombocytopenia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 14. <https://doi.org/10.1177/20406207231172831>
- Burmeister, W. P., Huber, A. H., & Bjorkman, P. J. (1994). Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*, 372(6504), 379–383. <https://doi.org/10.1038/372379A0>
- Cerezo, A., Stark, H. J., Moshir, S., & Boukamp, P. (2003). Constitutive Overexpression of Human Telomerase Reverse Transcriptase but Not c-myc Blocks Terminal Differentiation In Human HaCaT Skin Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(1), 110–119. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2003.12304.X>
- Chivers, P. T., Prehoda, K. E., & Raines, R. T. (1997). The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry*, 36(14), 4061–4066. <https://doi.org/10.1021/BI9628580>
- Cianga, C., Cianga, P., Plamadeala, P., & Amalinei, C. (2011). Nonclassical major histocompatibility complex I-like Fc neonatal receptor (FcRn) expression in neonatal human tissues. *Human Immunology*, 72(12), 1176–1187. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2011.08.020>
- Dall’Acqua, W. F., Kiener, P. A., & Wu, H. (2006). Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *The Journal of biological chemistry*, 281(33), 23514–23524. <https://doi.org/10.1074/JBC.M604292200>
- David, M., Katzenelson, V., Hazaz, B., Ben Chetrit, A., & Sandbank, M. (1989). Determination of IgG subclasses in patients with pemphigus with active disease and in remission. *Archives of dermatology*, 125(6), 787–790. <https://doi.org/10.1001/archderm.1989.01670180059006>

- de Taeye, S. W., Rispens, T., & Vidarsson, G. (2019). The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies 2019, Vol. 8, Page 30, 8(2)*, 30.  
<https://doi.org/10.3390/ANTIB8020030>
- Delva, E., Jennings, J. M., Calkins, C. C., Kottke, M. D., Faundez, V., & Kowalczyk, A. P. (2008). Pemphigus Vulgaris IgG-induced Desmoglein-3 Endocytosis and Desmosomal Disassembly Are Mediated by a Clathrin- and Dynamin-independent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry, 283(26)*, 18303.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M710046200>
- Delva, E., Tucker, D. K., & Kowalczyk, A. P. (o. J.). *The Desmosome*.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>
- Dos Santos, J. B. R., Gomes, R. M., & da Silva, M. R. R. (2022). Abdeg technology for the treatment of myasthenia gravis: efgartigimod drug experience. *Expert review of clinical immunology, 18(9)*, 879–888.  
<https://doi.org/10.1080/1744666X.2022.2106972>
- Dusek, R. L., Godsel, L. M., & Green, K. J. (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins: Beyond desmosomal adhesion. *Journal of Dermatological Science, 45(1)*, 7–21. <https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2006.10.006>
- Eming, R., & Hertl, M. (2009). Immunoabsorption in pemphigus. <http://dx.doi.org/10.1080/08916930600972040>, 39(7), 609–616.  
<https://doi.org/10.1080/08916930600972040>
- Fitzpatrick, R. E., & Newcomer, V. D. (1980). The Correlation of Disease Activity and Antibody Titers in Pemphigus. *Archives of Dermatology, 116(3)*, 285–290.  
<https://doi.org/10.1001/ARCHDERM.1980.01640270045011>
- Fuchs, M., Sigmund, A. M., Waschke, J., & Vielmuth, F. (2020). Desmosomal Hyperadhesion Is Accompanied with Enhanced Binding Strength of Desmoglein 3 Molecules. *Biophysical Journal, 119(8)*, 1489–1500.  
<https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2020.09.008>
- Futei, Y., Amagai, M., Ishii, K., Kuroda-Kinoshita, K., Ohya, K., & Nishikawa, T. (2001). Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *Journal of Dermatological Science, 26(1)*, 55–61.  
[https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00158-4)
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et biophysica acta, 1778(3)*, 572–587.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2007.07.014>

- Garrod, D. R., Berika, M. Y., Bardsley, W. F., Holmes, D., & Taberner, L. (2005). Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *Journal of Cell Science*, *118*(24), 5743–5754. <https://doi.org/10.1242/JCS.02700>
- Goebeler, M., Bata-Csörgő, Z., De Simone, C., Didona, B., Remenyik, E., Reznichenko, N., Stoevesandt, J., Ward, E. S., Parys, W., de Haard, H., Dupuy, P., Verheesen, P., Schmidt, E., & Joly, P. (2022). Treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus with efgartigimod, a neonatal Fc receptor inhibitor: a phase II multicentre, open-label feasibility trial. *The British journal of dermatology*, *186*(3), 429–439. <https://doi.org/10.1111/BJD.20782>
- Hamilton, R. G., Wilson, R. W., Spillman, T., & Roebber, M. (o. J.). *Monoclonal Antibody-Based Immunoenzymetric Assays for Quantification of Human IgG and its Four Subclasses MONOCLONAL ANTIBODY-BASED IMMUNOENZYMETRIC ASSAYS FOR QUANTIFICATION OF HUMAN IgG AND ITS FOUR SUBCLASSES (KEY WORDS: Human IgG subclasses, immunoassay, quantification, monoclonal antibodies, quality control)*. <https://doi.org/10.1080/01971528808053217>
- Hanakawa, Y., Matsuyoshi, N., & Stanley, J. R. (2002). Expression of Desmoglein 1 Compensates for Genetic Loss of Desmoglein 3 in Keratinocyte Adhesion. *Journal of Investigative Dermatology*, *119*(1), 27–31. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2002.01780.X>
- Harrison, O. J., Brasch, J., Lasso, G., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Honig, B., & Shapiro, L. (2016). Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(26), 7160–7165. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1606272113/SUPPL\\_FILE/PNAS.1606272113.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1606272113/SUPPL_FILE/PNAS.1606272113.SAPP.PDF)
- Hatzfeld, M. (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et biophysica acta*, *1773*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.04.009>
- Howard, J. F., Bril, V., Vu, T., Karam, C., Peric, S., Margania, T., Murai, H., Bilinska, M., Shakarishvili, R., Smilowski, M., Guglietta, A., Ulrichs, P., Vangeneugden, T., Utsugisawa, K., Verschuuren, J., Mantegazza, R., De Bleeker, J., De Koning, K., De Mey, K., ... Frishberg, B. (2021). Safety, efficacy, and tolerability of

- efgartigimod in patients with generalised myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, 20(7), 526–536. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00159-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00159-9)
- Hudemann, C., Exner, Y., Pollmann, R., Schneider, K., Zakrzewicz, A., Feldhoff, S., Schmidt, T., Spindler, V., Rafei-Shamsabadi, D., Völlner, F., Waschke, J., Tikkanen, R., Hertl, M., & Eming, R. (2023). IgG against the Membrane-Proximal Portion of the Desmoglein 3 Ectodomain Induces Loss of Keratinocyte Adhesion, a Hallmark in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 143(2), 254-263.e3. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2022.07.030>
- Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., & Amagai, M. (2005). In Vitro Keratinocyte Dissociation Assay for Evaluation of the Pathogenicity of Anti-Desmoglein 3 IgG Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(5), 939–946. <https://doi.org/10.1111/J.0022-202X.2005.23714.X>
- Jennings, J. M., Tucker, D. K., Kottke, M. D., Saito, M., Delva, E., Hanakawa, Y., Amagai, M., & Kowalczyk, A. P. (2011). Desmosome Disassembly in Response to Pemphigus Vulgaris IgG Occurs in Distinct Phases and Can Be Reversed by Expression of Exogenous Dsg3. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(3), 706–718. <https://doi.org/10.1038/JID.2010.389>
- Joly, P., & Litrowski, N. (2011). Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clinics in Dermatology*, 29(4), 432–436. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2011.01.013>
- Junghans, R. P. (1997). Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunologic research*, 16(1), 29–57. <https://doi.org/10.1007/BF02786322>
- Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S., & Amagai, M. (2017). Pemphigus. *Nature Reviews Disease Primers* 2017 3:1, 3(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.26>
- Kaur, B., Kerbrat, J., Kho, J., Kaler, M., Kanatsios, S., & Cirillo, N. (2022). Mechanism-based therapeutic targets of pemphigus vulgaris: A scoping review of pathogenic molecular pathways. *Experimental Dermatology*, 31(2), 154–171. <https://doi.org/10.1111/EXD.14453>
- Kim, J. -K, Tsen, M. -F, Ghetie, V., & Ward, E. S. (1994). Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc

- receptor. *European journal of immunology*, 24(10), 2429–2434.  
<https://doi.org/10.1002/EJI.1830241025>
- Kim, J.-K., Firan, M., Radu, C. G., Kim, C.-H., Ghetie, V., & Ward, E. S. (o. J.).  
*Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199909\)29:09](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09)
- Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, Function and Regulation of Desmosomes. *Progress in molecular biology and translational science*, 116, 95.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4>
- Kricheli, D., David, M., Frusic-Zlotkin, M., Goldsmith, D., Rabinov, M., Sulkes, J., & Milner, Y. (2000). The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *The British journal of dermatology*, 143(2), 337–342.  
<https://doi.org/10.1046/J.1365-2133.2000.03659.X>
- Kridin, K., & Schmidt, E. (2021). Epidemiology of Pemphigus. *JID Innovations*, 1(1), 100004. <https://doi.org/10.1016/J.XJIDI.2021.100004>
- Kugelmann, D., Rötzer, V., Walter, E., Egu, D. T., Fuchs, M. T., Vielmuth, F., Vargas-Robles, H., Schnoor, M., Hertl, M., Eming, R., Rottner, K., Schmidt, A., Spindler, V., & Waschke, J. (2019). Role of Src and cortactin in pemphigus skin blistering. *Frontiers in Immunology*, 10(APR), 626.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00626/FULL>
- Kuo, T. T., Baker, K., Yoshida, M., Qiao, S. W., Aveson, V. G., Lencer, W. I., & Blumberg, R. S. (2010a). Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics. *Journal of Clinical Immunology*, 30(6), 777. <https://doi.org/10.1007/S10875-010-9468-4>
- Lee, C. H., Kang, T. H., Godon, O., Watanabe, M., Delidakis, G., Gillis, C. M., Sterlin, D., Hardy, D., Cogné, M., Macdonald, L. E., Murphy, A. J., Tu, N., Lee, J., McDaniel, J. R., Makowski, E., Tessier, P. M., Meyer, A. S., Bruhns, P., & Georgiou, G. (2019). An engineered human Fc domain that behaves like a pH-toggle switch for ultra-long circulation persistence. *Nature Communications*, 10(1).  
<https://doi.org/10.1038/S41467-019-13108-2>
- Liang, J., Zeng, X., Halifu, Y., Chen, W., Hu, F., Wang, P., Zhang, H., & Kang, X. (2017). Blocking RhoA/ROCK inhibits the pathogenesis of pemphigus vulgaris by suppressing oxidative stress and apoptosis through TAK1/NOD2-mediated NF-κB

- pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 436(1–2), 151–158.  
<https://doi.org/10.1007/S11010-017-3086-X/FIGURES/4>
- Liu, L. (2018). Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein & Cell*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.1007/S13238-017-0408-4>
- Lo, A. S., Mao, X., Mukherjee, E. M., Ellebrecht, C. T., Yu, X., Posner, M. R., Payne, A. S., & Cavacini, L. A. (2016). Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *PLoS ONE*, 11(6).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0156800>
- Maho-Vaillant, M., Sips, M., Golinski, M. L., Vidarsson, G., Goebeler, M., Stoevesandt, J., Bata-Csörgő, Z., Balbino, B., Verheesen, P., Joly, P., Hertl, M., & Calbo, S. (2022). FcRn Antagonism Leads to a Decrease of Desmoglein-Specific B Cells: Secondary Analysis of a Phase 2 Study of Efgartigimod in Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus. *Frontiers in immunology*, 13.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.863095>
- Monnet, C., Jorieux, S., Urbain, R., Fournier, N., Bouayadi, K., De Romeuf, C., Behrens, C. K., Fontayne, A., & Mondon, P. (2015). Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutagenesis: Impact on Effector Functions. *Frontiers in immunology*, 6, 39.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00039>
- Montoyo, H. P., Vaccaro, C., Hafner, M., Ober, R. J., Mueller, W., & Ward, E. S. (2009). Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2788–2793.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.0810796106/SUPPL\\_FILE/0810796106SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0810796106/SUPPL_FILE/0810796106SI.PDF)
- Mould, D. R., & Green, B. (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: Concepts and lessons for drug development. *BioDrugs*, 24(1), 23–39. <https://doi.org/10.2165/11530560-000000000-00000/FIGURES/6>
- Murrell, D. F., Dick, S., Ahmed, A. R., Amagai, M., Barnadas, M. A., Borradori, L., Bystryń, J. C., Cianchini, G., Diaz, L., Fivenson, D., Hall, R., Harman, K. E., Hashimoto, T., Hertl, M., Hunzelmann, N., Iranzo, P., Joly, P., Jonkman, M. F., Kitajima, Y., ... Werth, V. P. (2008). Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *Journal of the*

- American Academy of Dermatology*, 58(6), 1043–1046.  
<https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2008.01.012>
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R., & Grando, S. A. (2000). Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *The Journal of clinical investigation*, 106(12), 1467–1479. <https://doi.org/10.1172/JCI10305>
- Ober, R. J., Radu, C. G., Ghetie, V., & Ward, E. S. (2001). Differences in promiscuity for antibody–FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *International Immunology*, 13(12), 1551–1559.  
<https://doi.org/10.1093/INTIMM/13.12.1551>
- Oganesyan, V., Damschroder, M. M., Cook, K. E., Li, Q., Gao, C., Wu, H., & Dall’Acqua, W. F. (2014). Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 289(11), 7812–7824.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M113.537563>
- Papadea, C., & Check, I. J. (2008). Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Human Immunoglobulin G and Immunoglobulin G Subclasses: Biochemical, Genetic, and Clinical Aspects. *Clinical Laboratory Sciences*, 27(1), 27–58.  
<https://doi.org/10.3109/10408368909106589>
- Payne, A. S., Hanakawa, Y., Amagai, M., & Stanley, J. R. (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(5), 536–543. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2004.07.006>
- Payne, A. S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J. R., & Siegel, D. L. (2005). Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *The Journal of clinical investigation*, 115(4), 888–899.  
<https://doi.org/10.1172/JCI24185>
- Porro, A. M., Seque, C. A., Ferreira, M. C. C., & E Silva Enokihara, M. M. S. (2019). Pemphigus vulgaris. *Anais brasileiros de dermatologia*, 94(3), 264–278.  
<https://doi.org/10.1590/ABD1806-4841.20199011>
- Pyzik, M., Sand, K. M. K., Hubbard, J. J., Andersen, J. T., Sandlie, I., & Blumberg, R. S. (2019). The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1540. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01540>

- Qi, T., & Cao, Y. (2021). In Translation: FcRn across the Therapeutic Spectrum. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3048, 22(6), 3048. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063048>
- Qiao, S. W., Kobayashi, K., Johansen, F. E., Sollid, L. M., Andersen, J. T., Milford, E., Roopenian, D. C., Lencer, W. I., & Blumberg, R. S. (2008). Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), 9337–9342. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0801717105/SUPPL\\_FILE/0801717105SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0801717105/SUPPL_FILE/0801717105SI.PDF)
- Raghavan, M., Bonagura, V. R., Morrison, S. L., & Bjorkman, P. J. (1995). Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry*, 34(45), 14649–14657. <https://doi.org/10.1021/BI00045A005>
- Raghavan, M., Gastinel, L. N., & Bjorkman, P. J. (1993). The class I major histocompatibility complex related Fc receptor shows pH-dependent stability differences correlating with immunoglobulin binding and release. *Biochemistry*, 32(33), 8654–8660. <https://doi.org/10.1021/BI00084A037>
- Richter, M., Piwocka, O., Musielak, M., Piotrowski, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2021). From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.711381>
- Robbie, G. J., Criste, R., Dall'acqua, W. F., Jensen, K., Patel, N. K., Losonsky, G. A., & Griffin, M. P. (2013). A Novel Investigational Fc-Modified Humanized Monoclonal Antibody, Motavizumab-YTE, Has an Extended Half-Life in Healthy Adults. <https://doi.org/10.1128/AAC.01285-13>
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology* 2007 7:9, 7(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>
- Rosenstein, S., Vaisman-Mentesh, A., Levy, L., Kigel, A., Dror, Y., & Wine, Y. (2020). Production of F(ab')<sub>2</sub> from Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 131(1), e119. <https://doi.org/10.1002/CPMB.119>
- Russo, G., Theisen, U., Fahr, W., Helmsing, S., Hust, M., Köster, R. W., & Dübel, S. (2018). Sequence defined antibodies improve the detection of cadherin 2 (N-cadherin) during zebrafish development. *New Biotechnology*, 45, 98–112. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2017.12.008>

- Sajda, T., & Sinha, A. A. (2018). Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00692>
- Schmitt, T., Hudemann, C., Moztarzadeh, S., Hertl, M., Tikkanen, R., & Waschke, J. (2023). Dsg3 epitope-specific signalling in pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1163066/FULL>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., & Presta, L. G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *The Journal of biological chemistry*, 276(9), 6591–6604. <https://doi.org/10.1074/JBC.M009483200>
- Sigmund, A. M., Winkler, M., Engelmayer, S., Kugelmann, D., Egu, D. T., Steinert, L. S., Fuchs, M., Hiermair, M., Radeva, M. Y., Bayerbach, F. C., Butz, E., Kotschi, S., Hudemann, C., Hertl, M., Yeruva, S., Schmidt, E., Yazdi, A. S., Ghoreschi, K., Vielmuth, F., & Waschke, J. (2023). Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35741-0>
- Singh, R. D., Patel, K. A., Patel, J. B., & Patel, P. S. (2022). Alterations in p53 Influence hTERT, VEGF and MMPs Expression in Oral Cancer Patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 23(9), 3141–3149. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.9.3141>
- Sinha, A. A., & Sajda, T. (2018). The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the „Super Compensation Hypothesis“. *Frontiers in medicine*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMED.2018.00218>
- Sitaru, C., & Zillikens, D. (2005). Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Experimental Dermatology*, 14(12), 861–875. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0625.2005.00367.X>

- Sockolosky, J. T., & Szoka, F. C. (2015). The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *91*, 109–124. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.02.005>
- Spiekermann, G. M., Finn, P. W., Sally Ward, E., Dumont, J., Dickinson, B. L., Blumberg, R. S., & Lencer, W. I. (2002). Receptor-mediated Immunoglobulin G Transport Across Mucosal Barriers in Adult Life: Functional Expression of FcRn in the Mammalian Lung. *The Journal of Experimental Medicine*, *196*(3), 303. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020400>
- Spindler, V., Eming, R., Schmidt, E., Amagai, M., Grando, S., Jonkman, M. F., Kowalczyk, A. P., Müller, E. J., Payne, A. S., Pincelli, C., Sinha, A. A., Sprecher, E., Zillikens, D., Hertl, M., & Waschke, J. (2018). Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*, *138*(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2017.06.022>
- Spindler, V., Endlich, A., Hartlieb, E., Vielmuth, F., Schmidt, E., & Waschke, J. (2011). The Extent of Desmoglein 3 Depletion in Pemphigus Vulgaris Is Dependent on Ca<sup>2+</sup>-Induced Differentiation: A Role in Suprabasal Epidermal Skin Splitting? *The American Journal of Pathology*, *179*(4), 1905. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.06.043>
- Spindler, V., Rötzer, V., Dehner, C., Kempf, B., Gliem, M., Radeva, M., Hartlieb, E., Harms, G. S., Schmidt, E., & Waschke, J. (2013). Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *The Journal of clinical investigation*, *123*(2), 800–811. <https://doi.org/10.1172/JCI60139>
- Stanley, J. R., Yaar, M., Hawley-Nelson, P., & Katz, S. I. (o. J.). *Pemphigus Antibodies Identify a Cell Surface Glycoprotein Synthesized by Human and Mouse Keratinocytes*.
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*, *26*, 261–292. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.26.021607.090248>
- Steinert, L., Fuchs, M., Sigmund, A. M., Didona, D., Hudemann, C., Möbs, C., Hertl, M., Hashimoto, T., Waschke, J., & Vielmuth, F. (2024). Desmosomal Hyperadhesion Affects Direct Inhibition of Desmoglein Interactions in Pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2024.03.042>

- Takahashi, H., Amagai, M., Tanikawa, A., Suzuki, S., Ikeda, Y., Nishikawa, T., Kawakami, Y., & Kuwana, M. (2007). T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*, *127*(2), 324–330. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700527>
- Tantilipikorn, P., Seys, S. F., Leuven, K. U., Jönsson, F., Montalvo, A. S., Gohy, S., Rombaux, P., Pilette, C., & Hox, V. (2022). The Role of IgA in Chronic Upper Airway Disease: Friend or Foe? *Frontiers in Allergy* | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org), *1*, 852546. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.852546>
- Teicher, B. A., & Chari, R. V. J. (2011). Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(20), 6389–6397. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1417>
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., & Amagai, M. (2003). Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *The Journal of Immunology*, *170*(4), 2170–2178. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.4.2170>
- Ulrichs, P., Guglietta, A., Dreier, T., Van Bragt, T., Hanssens, V., Hofman, E., Vankerckhoven, B., Verheesen, P., Ongenae, N., Lykhopiy, V., Javier Enriquez, F., Cho, J. H., Ober, R. J., Sally Ward, E., De Haard, H., & Leupin, N. (2018). Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. *The Journal of clinical investigation*, *128*(10), 4372–4386. <https://doi.org/10.1172/JCI97911>
- Vaccaro, C., Zhou, J., Ober, R. J., & Ward, E. S. (2005). Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nature Biotechnology* *2005 23:10*, *23*(10), 1283–1288. <https://doi.org/10.1038/nbt1143>
- van der Wier, G., Jonkman, M. F., & Horváth, B. (2023). Pemphigus Vulgaris. *Autoimmune Bullous Diseases: Text and Review*, 65–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-91557-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-91557-5_8)
- Vaughn, D. E., & Bjorkman, P. J. (1998). Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure (London, England : 1993)*, *6*(1), 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00008-2)
- Vaughn, D. E., Milburn, C. M., Penny, D. M., Martin, W. L., Johnson, J. L., & Bjorkman, P. J. (1997). Identification of critical IgG binding epitopes on the

- neonatal Fc receptor. *Journal of molecular biology*, 274(4), 597–607.  
<https://doi.org/10.1006/JMBI.1997.1388>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014a). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT).  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00520>
- Wang, W., Wang, E. Q., & Balthasar, J. P. (2008). Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 84(5), 548–558. <https://doi.org/10.1038/CLPT.2008.170>
- Wang, X., Mathieu, M., & Brezski, R. J. (2018a). IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein & Cell*, 9(1), 63–73.  
<https://doi.org/10.1007/S13238-017-0473-8>
- Ward, E. S., & Ober, R. J. (2009). Chapter 4 Multitasking by Exploitation of Intracellular Transport Functions: The Many Faces of FcRn. *Advances in Immunology*, 103, 77–115. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(09\)03004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(09)03004-1)
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and cell biology*, 130(1), 21–54. <https://doi.org/10.1007/S00418-008-0420-0>
- Zakrzewicz, A., Würth, C., Beckert, B., Feldhoff, S., Vanderheyden, K., Foss, S., Andersen, J. T., de Haard, H., Verheesen, P., Bobkov, V., & Tikkanen, R. (2022). Stabilization of Keratinocyte Monolayer Integrity in the Presence of Anti-Desmoglein-3 Antibodies through FcRn Blockade with Efgartigimod: Novel Treatment Paradigm for Pemphigus? *Cells*, 11(6).  
<https://doi.org/10.3390/CELLS111060942>
- Zalevsky, J., Chamberlain, A. K., Horton, H. M., Karki, S., Leung, I. W. L., Sproule, T. J., Lazar, G. A., Roopenian, D. C., & Desjarlais, J. R. (2010). Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nature biotechnology*, 28(2), 157–159.  
<https://doi.org/10.1038/NBT.1601>
- Zhou, Y., & Jiang, S. (2023). Roles of FcRn in Antigen-Presenting Cells during Autoimmunity and a Clinical Evaluation of Efgartigimod as an FcRn Blocker. *Pathogens*, 12(6), 817. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12060817>

## **9 Anhang**

### **9.1 Nutzungsgenehmigung von Abbildungen**

Die Nutzungsgenehmigung von Abbildungen aus fremden Quellen wurde von den Autoren eingeholt.

## **10 Publikationsverzeichnis**

### **Binding to the Neonatal Fc receptor enhances the pathogenicity of anti-desmoglein-3 autoantibodies**

**Anna Zakrzewicz, Yad Galaly, Simon Feldhoff, Katrien Vanderheyden, Magdalena Sips, Maximilian Brinkhaus, Ritva Tikkanen (2024)**

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Unterschrift

---

Ort, Datum

## 12 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner geschätzten Doktormutter, Prof. Dr. Ritva Tikkanen. Ohne ihre wertvolle Unterstützung hätte ich diese kostbare Gelegenheit nie erhalten und diese Doktorarbeit wäre nicht möglich gewesen. Von Herzen bedanke ich mich auch bei meiner Betreuerin, Dr. Anna Zakrzewicz, für die exzellente Betreuung, die all meine Erwartungen übertroffen hat.

Mein Dank gilt weiter der gesamten Arbeitsgruppe Tikkanen; Ralf Füllkrug, Simone Kegel, Benedikt Beckert, Dr. Antje Banning, Dr. Miroslava Didiasova und Simon Feldhoff. Danke dafür, dass die Zeit im Labor zu einer unvergesslichen Erfahrung wurde mit vielen schönen Momenten und genussvollen Backerlebnissen.

Meinen tiefsten Dank möchte ich ebenso meiner Familie aussprechen. Danke, Mama und Dastan, für eure große Unterstützung und euren Glauben an mich – durch euch ist mir kein Ziel unerreichbar.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, deren bedeutendes Vertrauen und die unterhaltsamen Spaziergänge mir stets neue Motivation gegeben haben.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinem Verlobten, für seine unendliche Liebe und den größten Support. Danke, dass du mich jeden Tag aufs Neue inspirierst. Amor gignit amorem.