

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut an der
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. Jan-Henning Klusmann

**Entwicklung eines ELISAs zur spezifischen Detektion
von S100A12 Hexamer**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jonas Fabian Weber

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	PD Dr. Dr. Christoph Königs
Korreferent/in:	Prof. Dr. Burkhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	18.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung (Deutsch (Seite 6 bis 7) und Englisch (Seite 8)).....	6
2. Einleitung	9
2.1. Autoimmun-/Autoinflammatorische und weitere Erkrankungen.....	9
2.1.1. Juvenile idiopathische Arthritis	10
2.1.2. Familiäres Mittelmeerfieber	11
2.1.3. Rheumatoide Arthritis	13
2.2. Diagnostik und Monitoring bei der JIA, dem FMF und der RA	14
2.3. S100 Proteine	15
2.3.1. S100A12 Protein.....	15
2.4. Zielsetzung.....	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Materialien.....	19
3.2. Methoden	36
3.2.1. Affinitätsselektion von Peptid- und scFv-Phagen	36
3.2.2. Vereinzelung von Phagenklonen	39
3.2.3. Amplifikation der vereinzelter Peptid- und scFv- präsentierender Phagenklone	40
3.2.4. Capture-ELISA	42
3.2.5. Bestätigungs-ELISA.....	43
3.2.6. Sequenzierung	43
3.2.7. Kompetitions-ELISA.....	43
3.2.8. Bindung von synthetischen Peptiden und Kontrollpeptiden an S100A12.....	45
3.2.9. Konzentrationsabhängige Bindung der Peptide an das Hexamer	45
3.2.10. Peptid ELISA mit Tetramerüberschuss	46
3.2.11. scFv-Fc-Konstrukt Produktion.....	47
3.2.12. Bindung der scFv-Fc-Konstrukte an S100A12 Hexamer ...	54
3.2.13. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42	55
3.2.14. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss	55

3.2.15.	Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in gespiktem Plasma	56
3.2.16.	Peptid 4 mit crosslinked Hexamer versus „Wildtyp“ Hexamer	56
4.	Ergebnisse	58
4.1.1.	Capture-ELISA.....	58
4.1.2.	Bestätigungs-ELISA.....	59
4.1.3.	Sequenzierung.....	60
4.1.4.	Kompetitions-ELISA.....	63
4.1.5.	Bindung von synthetischen Peptiden und Kontrollpeptiden an S100A12.....	66
4.1.6.	Konzentrationsabhängige Bindung der Peptide an das Hexamer	67
4.1.7.	Peptid-ELISA mit Tetramerüberschuss	68
4.1.8.	scFv-Fc-Konstrukt Produktion.....	67
4.1.9.	Bindung der scFv-Fc-Konstrukte an S100A12 Hexamer ...	69
4.1.10.	Sandwich-ELISA mit Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42	70
4.1.11.	Bindung von Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukt 41 und 42 mit Tetramerüberschuss	71
4.1.12.	Bindung von Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit S100A12 Hexamer, Tetramer und Dimer versetztem Plasma	72
4.1.13.	Peptid 4 mit crosslinked Hexamer versus „Wildtyp“ Hexamer	73
5.	Diskussion	75
5.1.	Aktueller Stand der Diagnostik und Monitoring von JIA, FMF und RA.....	75
5.2.	S100A12 Hexamer als potenter Inflammationsmarker.....	76
5.3.	Entwicklung eines Hexamer spezifischen Tests	78
5.4.	Interpretation der gewonnen Ergebnisse	83

5.5. Fazit	88
6. Literaturverzeichnis	90
7. Anhang	103
7.1. Klassifikation der JIA	103
7.2. Klassifikation für die RA	104
7.3. S100A Proteine	106
7.4. Konformationsänderung von S100A12	116
7.5. Biotin-Struktur der Peptide	116
7.6. Linker-Struktur der Peptide.....	117
7.7. Plasmidkarte pCMX2.5-mlgG2c-Fc-XP	117
7.8. Chromatogramm aus Gelfiltration von S100A12 Hexamere, Tetramere und Dimere	118
7.9. Abkürzungen.....	118
7.10. Buchstabencode der Aminosäuren.....	121
7.11. Abbildungsverzeichnis.....	122
8. Schriftliche Erklärung.....	124

1. Zusammenfassung

S100A12 ist ein Entzündungsmarker, der inflammatorische Prozesse präzise anzeigt. Entzündungsprozesse mit erhöhten S100A12 Konzentrationen spielen vor allem bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatischen Arthritis (RA), autoinflammatorischen Erkrankungen wie der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) oder weiteren Erkrankungen wie dem familiären Mittelmeerfieber (FMF) eine wichtige Rolle. Das S100A12 Protein besitzt drei verschiedene Konformationen: das Dimer, das Tetramer und das Hexamer. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Hexamer an proinflammatorische Rezeptoren wie dem Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) und dem „receptor for the advanced glycation end products“ (RAGE) bindet und so die Produktion von weiteren Entzündungsmediatoren stimuliert. Daher besitzt die S100A12 Hexamerkonformation eine entscheidende Rolle in Entzündungsprozessen. Das Ziel bestand somit in der Selektion von Peptiden oder „single chain variable fragment“ (scFv)-Konstrukten, die exklusiv an die hexamere Konformation von S100A12 binden.

Mittels Biopanning von Peptid- und scFv-Phagen Bibliotheken konnten Peptide und scFvs selektiert werden. Die selektierten Peptide und die selektierten scFvs wurden in ELISAs weiter auf ihre Bindungseigenschaften charakterisiert. Durch Umklonierung in einen Fc-Konstrukt Vektor konnten die scFvs als vollständige scFv-Fc-Konstrukte exprimiert werden. Die Bindung der selektierten Peptide bestätigte sich als Biotin-Fusion im anschließenden ELISA. Es zeigte sich eine sehr hohe Bindungsspezifität der Peptide und der produzierten scFv-Fc-Konstrukte an das S100A12 Hexamer.

Mit den selektierten Liganden ist es gelungen einen Test zu entwickeln: an Streptavidin immobilisierte Peptide binden spezifisch das S100A12 Hexamer aus dem Testmedium und mittels selektiertem scFv-Fc-Konstrukten lassen sich die gebundenen S100A12 Proteine detektieren. Ein Detektionsantikörper ermöglichte die Visualisierung der gebundenen scFv-Fc-Konstrukte mittels Farbreaktion. Das S100A12 Hexamer konnte durch den Testaufbau auch im Plasma spezifisch detektiert werden.

Dieser Test könnte es ermöglichen, die exakte Diagnose und vor allem die Überwachung von Patienten mit steigenden Entzündungsmarkern, wie im

Rahmen der autoinflammatorischen Erkrankung JIA oder einer Erkrankung wie dem FMF, zu verbessern. Mit einem verbessertem Krankheitsmonitoring könnte ebenfalls die Therapie im frühen Stadium optimiert werden.

Zusätzlich könnte ein mögliches therapeutische Potential der S100A12 Hexamer Liganden getestet werden. Sollten die hexamerspezifischen Liganden die Interaktion von S100A12 mit ihren Rezeptoren wie TLR-4 oder RAGE blockieren, ist eine therapeutische Verwendung in der Behandlung von Autoimmun- und autoinflammatorischen Erkrankungen möglich.

Summary

S100A12 is an inflammatory marker that indicates inflammatory processes precisely. Inflammatory processes with increasing S100A12 titers play an important role in autoimmune diseases like rheumatoid arthritis (RA), autoinflammatory diseases like juvenile idiopathic arthritis (JIA) or diseases like familial mediterranean fever (FMF). S100A12 can be present in the conformation of a dimer, tetramer or hexamer. As in several studies shown, the hexamer binds to inflammatory receptors like TLR-4 and RAGE and stimulates the production of further inflammatory mediators. S100A12 hexamer plays a crucial role in inflammatory processes. Therefore, it was the goal to isolate peptides and antibody fragments that bind only S100A12 hexamer.

By affinity selections of phage libraries expressing random peptide sequences of 7 to 12 amino acids or single chains Fv fragments, one peptide and two scFv fragments were isolated. In ELISA the binding characteristics of the selected peptide und scFv fragments were further analysed. The scFv fragments were cloned in an IgG-antibody vector and produced as a complete scFv-Fc-construct in human embryonic kidney cells. The peptide was connected with a linker and biotin. The ELISAs showed a specific binding characteristic for S100A12 hexamer of the produced scFv-Fc-constructs and peptide.

Due to the selected candidates we were able to develop a diagnostic test to measure S100A12 hexamer titers in plasma: the selected peptide were immobilized with streptavidin. S100A12 hexamers were bound on immobilized peptide and bound S100A12 proteins were detected with selected scFv fragments. In the final step, detection antibodies visualized bound scFv fragments by color reaction.

This test could allow to improve the exact diagnosis and the monitoring of patients with increased inflammatory markers like in autoimmune diseases as JIA or diseases as FMF. An improved monitoring also could allow to guide therapeutic strategies. Furthermore, the therapeutical potential of our S100A12 hexamer specific peptide and scFv-Fc-constructs could be tested in the future. If our hexamer specific constructs block the interaction of S100A12 with their receptor like TLR-4 or RAGE a therapeutical use in the treatment of autoimmune diseases could be possible.

2. Einleitung

2.1. Autoimmunerkrankungen

Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Autoimmunerkrankungen mit unterschiedlichsten Organbeteiligungen: von Erkrankungen der Schilddrüse beim Morbus Basedow oder Beteiligungen des Pankreas beim Diabetes mellitus Typ 1 bis hin zu Autoimmunerkrankungen der Gelenke wie beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis. Auslöser von Autoimmunerkrankungen ist eine Fehlfunktion des Immunsystems. Das Verständnis für die zugrunde liegende Ätiologie der Autoimmunerkrankungen hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Doch noch immer ist die genaue Pathophysiologie nicht vollständig verstanden.

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnte Paul Ehrlich zeigen, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden kann. Ehrlich injizierte Versuchstieren Blut von artfremden Tieren und konnte anschließend hämolytische Antikörper nachweisen. Bei der Injektion von Blut eines artgleichen Tieres zeigte sich stattdessen keine Ausbildung von Antikörpern. Paul Ehrlich schloss darauf, dass das Immunsystem im Stande ist zwischen eigen und fremd zu unterscheiden und sich so vor Autoaggression schützen kann. Er prägte den Begriff des „Horror autotoxicus“, welcher beschreibt, dass zum Schutze vor Selbstzerstörung Immunreaktionen nicht auftreten (1, 123).

1956 setzte Sir Macfarlane Burnet die Forschung der komplexen Immunprozesse fort und entwickelte die klonale Selektions-Theorie. Diese beschreibt die Ausreifung von antikörper-produzierenden Vorläuferzellen durch spezifische Antigen-Antikörper Stimulation. Burnet's Theorie besagt, dass aufgrund einer fehlerhaften Selektion von Antikörper-produzierenden Vorläuferzellen Autoantikörper produziert werden können, welche an körpereigene Antigene binden und autoimmune Reaktionen auslösen (2).

Paul Ehrlich und Macfarlane Burnet legte mit ihren Theorien schon früh wichtige Meilensteine, welche für die moderne Immunologie von großer Bedeutung sind. Als Ursache für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fasste 2015 Lifeng Wang (3) den aktuellen Forschungsstand als ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren zusammen. So konnten

Soumya Raychaudhuri und Chikashi Terao zeigen, dass Autoimmunerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis häufig mit Variationen der Haupthistokompatibilitätskomplex-Gene (MHC-Gene) verknüpft sind (4, 109). Bei dem familiären Mittelmeerfieber konnte bereits 1997 das Marenostin/Pyrin (MEFV) Gen als genetischer Auslöser für die Überaktivität der Granulozyten identifizieren werden (5). Bei der juvenilen idiopathischen Arthritis hingegeben wird vermutet, dass der Trigger für die Autoimmunreaktion in viralen oder bakteriellen Infektionen liegt (6). Aslan beschrieb 2009, dass bakterielle Infekte eine Zytokinausschüttung verursachen, welche bei der JIA als Trigger fungieren und den klinischen Verlauf verschlechtern könne (7). Sener und Afsar kamen 2012 ebenfalls zu der Erkenntnis, dass Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Parasiten einen wichtigen Part in der Entstehung von immunvermittelten rheumatischen Erkrankungen darstellen.

Die klinische Präsentation von Autoimmunerkrankungen ist aufgrund der verschiedenen Organbeteiligungen sehr unterschiedlich und kann beispielsweise bei der Hashimoto Thyreoditis die Schilddrüse (107), beim Diabetes mellitus Typ 1 den Pankreas (108) und bei rheumatologischen Erkrankung vor allem die Gelenke (110) betreffen. Auch das Erkrankungsalter ist sehr variabel und bei der juvenilen idiopathischen Arthritis, dem familiären Mittelmeerfieber oder der rheumatoiden Arthritis typischerweise im Kindesalter. Häufig kommt es zu schwerwiegenden Symptomen und Langzeitfolgen im Krankheitsverlauf. So besteht bei Patienten, welche bereits in jungen Jahren an einer rheumatoiden Arthritis erkrankt sind, das erhöhte Risiko für Kardiomegalien, Retinopathien und progredienter Gelenkverschleiß (111). Bei dem familiären Mittelmeerfieber können sich nach langjähriger Erkrankung Amyloidosen entwickeln (112), welche durch Anreicherung und Ablagerungen von Proteinen für Kardiomyopathie, Nierenfunktionsstörungen und Neuropathien verantwortlich sind (113).

2.1.1. Juvenile idiopathische Arthritis

Die juvenile idiopathischen Arthritis ist eine heterogene Gruppe von Gelenkerkrankungen unklaren Ursprungs. Die ILAR (International League of Associations for Rheumatology) fasst unter dem Begriff der JIA 7 Untergruppen zusammen: oligoartikuläre JIA, seropositive polyartikuläre JIA, seronegative

polyartikuläre JIA, systemische-onset JIA, enthesitis-assoziierte Arthritis, juvenile psoriasis Arthritis und die undifferenzierte JIA (8).

Allen Untergruppen gemeinsam ist die klinische Manifestation der Symptomen bereits vor dem 16. Lebensjahr und das Persistieren der Arthritiden für mehr als sechs Wochen (9).

Diagnostisch basiert die JIA auf klinischen Parametern. Hierzu zählen vor allem Fieber, Hautausschlag und Arthritiden (siehe Anhang: 7.1. Klassifikation der ILAR) (9). Abgesehen von klinischen Symptomen fehlen bis heute spezifische Diagnoseparameter zur Sicherung der Diagnose. So kommt es häufig zur deutlichen Verzögerung bis die Diagnose der JIA gestellt wird (9). Ein vielversprechender Marker zur Verbesserung der initialen Diagnose, sowie dem Therapiemonitoring, stellt das S100 Protein S100A12 dar (10).

Therapeutisch liegt das Ziel vor allem in der Unterdrückung der Inflammationsreaktion, in der Aufrechterhaltung der Funktionalität durch Schmerztherapie und Stärkung der Muskelfunktion sowie der Prävention von Komplikationen wie Wachstumsstörungen und Uveitis (11, 114).

Hauptbestandteil der JIA Therapie sind vor allem Non-Steroidale Anti-Inflammatorische Drugs (NSAIDs), Cortocosteroide sowie Methotrexate. In den letzten 15 Jahren haben sich durch die Weiterentwicklung von Biologika wie Etanercept oder Infliximab neue therapeutische Ansätze aufgetan. Etanercept beispielsweise schwächt durch die Bindung an löslichem TNF-alpha die TNF-Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung ab. Dadurch werden vor allem in Patienten mit polyartikulärer Arthritis gute, antiinflammatorische Ergebnisse erzielt (12). Eine rechtzeitige Therapieanpassung stellt einen wichtigen Baustein da, um den Leidensdruck der Patienten zu minimieren. Die Kriterien für eine medikamentöse Eskalation oder Deeskalation werden heutzutage vor allem an der Klinik festgemacht, da auch im Krankheitsmonitoring spezifische Biomarker fehlen.

2.1.2. Familiäres Mittelmeerfieber

Das familiäre Mittelmeerfieber (FMF) ist ein hereditäres Fiebersyndrom, welches vor allem im östlichen Mittelmeerraum vorkommt. Ursächlich für das FMF ist eine Mutation im MEFV-Gen, welches für das Protein „Pyrin“ codiert und eine regulatorische Funktion im angeborenen Immunsystem besitzt (13).

Pyrin sorgt mittels Interaktion mit dem Zytoskelett für eine Modulation der Inflammation, wobei der genaue Wirkmechanismus noch Bestandteil aktueller Forschung ist (115).

Klinisch präsentiert sich die FMF vor allem durch inflammatorische Attacken mit Fieber, welche in der Regel nach 1-3 Tagen selbstlimitierend sind und in einem Intervall von Wochen bis Monate sich wiederholen können. Zusätzlich können Peritonitis (90%), Pleuritis (<50%), Perikarditis (1-2%), Arthritis (>50%) und Erysipel-ähnliche Exantheme auftreten. Nicht selten zeigen die Patienten bei Diagnosestellung multiple abdominelle Narben, da die Patienten aufgrund der Peritonitis klinisch ein typisches Bild eines Ileus präsentieren (13).

Die Diagnose der FMF beruht vor allem auf der Anamnese und der Klinik sowie auf inflammatorischen Markern und der Genetik. Eine genetische Testung wird vor allem in nicht-endemischen Ländern empfohlen, um eine valide Information über die Schwere der Erkrankung und das Risiko für Komplikationen abzuschätzen (14). Da diese molekularen Tests für die MEFV-Mutation eine erhöhte Fehleranfälligkeit besitzen und müssen die Ergebnisse immer im klinischen Zusammenhang gewertet werden. Laborchemische Parameter wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), das C-reaktive Protein (CRP), das Serumamyloid A (SAA) und Fibrinogen können durch ihren Anstieg während einer Fieberepisoden ebenfalls als Marker für die Schwere einer Attacke verwendet werden. Allerdings ist die Beurteilung von Akut-Phase-Proteinen wie BSG oder CRP nur eingeschränkt möglich aufgrund der Unspezifität für FMF. Aus diesem Grund steigt zunehmend die Bedeutung von spezifischen Inflammationsmarkern wie S100 Proteine (15).

Falls die Diagnostik keine eindeutige Bestätigung des FMFs liefert, kann ein Therapieversuch mit Colchicin für 3-6 Monate erfolgen mit anschließender Evaluation des Therapieansprechens (13). Die Therapie der FMF basiert auf dem Mitosehemmer Colchicin (13). Für Colchicin gibt es gute Datenlagen und langjährige Erfahrungswerte unter anderem durch die Verwendung in der Gicht-Therapie (116). Allerdings besitzt Colchicin auch relevante Risiken. So besteht bei Überdosierung (>10 ng/ml) die Gefahr einer Toxizität mit Multiorganversagen bis zum Tod (13). Weiterhin tritt bei 20 % der Patienten im Verlauf eine Intoleranz gegenüber Colchicin auf und durch die Nebenwirkungen wie Diarrhoe (10 %), Leukopenie (1 %), Niereninsuffizienz (1,3 %) und

Myopathien (0,5 %) kann eine therapeutische Umstellung nötig sein (13). Als Alternative zur Colchicin-Therapie liegen vielversprechende Daten für die Therapie mit den Interleukin (IL)-1 Antagonisten Anakinra, Canakinumab and Rilonacept vor. Erste Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der Anzahl von Fieberattacken und eine Verbesserung der Lebensqualität (16, 17). Allerdings ist die Studienlage bisher noch gering und Daten über die langfristige Effizienz und Sicherheit der Biologika fehlen.

Auch beim FMF spielt das Therapiemonitoring eine entscheidende Rolle, um den Leidensdruck für die Patienten zu minimieren. Da als Laborparameter allerdings lediglich unspezifische Akut-Phase-Proteine wie BSG und CRP vorliegen, gestaltet sich eine frühzeitige Therapieanpassung häufig schwierig.

2.1.3. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Multisystemerkrankung (117). Klinisch präsentieren sich die Patienten vor allem durch geschwollene Gelenke und morgendliche Gelenksteifigkeit (18). Neben den typischen Gelenkbeteiligungen können auch extraartikuläre Manifestationen wie ein pulmonaler Befall oder Vaskulitiden (19) auftreten. Vor allem durch eine insuffiziente Behandlung können im Verlauf zunehmende extraartikuläre Manifestationen auftreten. So kann es durch das chronisch-inflammatorische Stadium der rheumatoiden Arthritis zur Entstehung von sekundären Amyloidosen, Lymphomen (20) und kardiovaskulären Risiken (21) und einer daraus folgenden erhöhten Mortalität (22) kommen.

Die regelmäßige Evaluation der Krankheitsschwere spielt bei RA-Patienten eine entscheidende Rolle, um eine adäquate Therapieanpassung zu gewährleisten und langfristig Komplikationen zu verhindern (23). Zur Evaluation der Krankheitsschwere bei der RA wurden verschiedene Scores entwickelt: der „disease activity score 28“ (DAS28) verrechnet 28 Gelenke mit weiteren Komponenten zu einer komplexen Rechnung (24) wohingegen der „simplified disease activity index“ (SDAI) und der „clinical disease activity index“ (CDAI) eine kontinuierliche Skala aus der Krankheitsaktivität liefern (25, 26) (siehe Anhang: 7.2. Klassifikationskriterien für die RA). Um den Progress von Gelenkerosionen zu detektieren, können Ultraschall-Untersuchungen (27)

sowie Magnetresonanztomographie (MRT) Untersuchungen (28) verwendet werden.

Therapeutisch basiert die Behandlung vor allem auf Methotrexat (MTX) und niedrig dosierten Glukokortikoiden (29). Supportiv können „non-steroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs) verwendet werden, um eine Reduktion der Schmerzen und Gelenksteifigkeit herbeizuführen. Neben der Therapie mit MTX und Glukokortikoiden werden zunehmend auch Biologika verwendet. Die Biologika sind TNF Inhibitoren (Adalimumab, Etanercept, Infliximab), Interleukin-6-Rezeptor Inhibitoren (Tocilizumab), T-Zell Co-Stimulationsblocker (Abatacept) und B-Zell Depletoren (Rituximab). In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Biologika im Vergleich zu einer Monotherapie mit MTX überlegen ist und der Progress von strukturellen Destruktionen effektiver gehemmt werden kann (30). Darüber hinaus zeigten weitere Untersuchungen, dass eine Kombination von Biologika mit MTX noch bessere klinische und funktionelle Ergebnisse erzielen als eine Biologika-Monotherapie (30, 31, 32, 33).

Ähnlich wie bei der JIA und dem FMF basiert die initiale Diagnostik und das Therapiemonitoring vor allem auf den klinischen Symptomen und dem Leidensdruck der Patienten, welche in Scores zusammengefasst werden. Unterstützend können laborchemische Faktoren wie der Rheumafaktor (RF) und der anti-citrullinierte-Protein-Antikörper (ACPA) zur Diagnostik verwendet werden. Allerdings zeigten bei der initialen Diagnostik lediglich 44 % der Patienten erhöhte Rheumafaktoren und 39 % erhöhte anti-citrullinierte-Protein-Antikörper im Serum. Das CRP war lediglich in 39 % der erhobenen Fälle erhöht (118). Spezifische Laborparameter für eine frühzeitige Therapieanpassung und eine valide initiale Diagnostik, welche im Idealfall noch vor Symptombeginn signifikant erhöht sind, sind nicht vorhanden.

2.2. Diagnostik und Monitoring bei der JIA, dem FMF und der RA

Entscheidend ist für die Patienten, die an einer Autoimmunerkrankung leiden, ein frühzeitiger und adäquater Therapiebeginn. Wichtig sind hierfür vor allem eine frühe und solide initiale Diagnose. Laura Aoust (34) konnte 2017 in Frankreich für die autoinflammatorische Erkrankung der JIA zeigen, dass es im Durchschnitt 3 Monate dauert bis die richtige Diagnose gestellt wurde.

Zusätzlich wurden in 99 % der untersuchten Fälle zunächst unnötige Diagnostiken durchgeführt und falsche Diagnosen ausgestellt.

Auch eine exakte Krankheitsüberwachung mit regelmäßigen diagnostischen Untersuchungen trägt maßgeblich zu einem günstigen Krankheitsverlauf bei. Durch ein genaues Monitoring kann die Therapie frühzeitig eskaliert oder deeskaliert werden - im Idealfall noch vor Symptomausbruch, um den Leidensdruck der Patienten auf ein Minimum zu reduzieren. Die Bedeutung der Krankheitsüberwachung konnte 2020 auch von Lisa Buckley (35) im Zusammenhang mit der JIA gezeigt werden.

Neben dem klinischen Monitoring spielen bei autoimmun- und autoinflammatorischen Erkrankungen auch Inflammationsmarker eine große Rolle. Ein Inflammationsmarker der bereits 2009 von Olga V. Moroz (36) entdeckt wurde und sich im Verlauf als sehr sensibel für die JIA, das FMF und die RA erwies, ist das S100A12 Protein.

2.3. S100-Proteine

S100-Proteine wurden 1965 von B.W. Moore (37) zum ersten Mal beschrieben. Die 10-12 kDa großen Proteine kommen in Wirbeltieren vor und haben aufgrund ihrer Löslichkeit in 100 %iger Ammoniumsulfat-Lösung ihren Namen erhalten.

Bis heute sind 25 Gruppen von S100-Proteinen bekannt (siehe Anhang: 7.3. S100 Proteine). Einige davon werden bereits heute genutzt; so konnte sich beispielsweise S100A8/A9 (Calprotectin) als Biomarker für chronisch entzündliche Darmerkrankungen etablieren (38). Auch das S100 Protein S100B hat sich in der Klinik etabliert, da es einen validen Biomarker für das Ausmaß der zerebralen Schädigung im Rahmen eines Schädelhirntraumas darstellt und als langfrister Prognosefaktor in der Klinik Verwendung findet (119). Eine weitere Eigenschaft von S100 Proteinen ist die Bindung an Calcium. Die Calciumbindung ist wichtig für die Struktur der Proteine, da diese für die Entstehung von neuen, funktionellen Bindungsstellen verantwortlich ist und dadurch eine Interaktion mit weiteren Zielproteinen und Rezeptoren ermöglicht (39). Die Calciumbindung ist vor allem bei dem S100-Protein A12 für eine entscheidende Konformationsänderung verantwortlich.

2.3.1. S100A12 Protein

Das S100A12 Protein gehört zur Familie der S100-Proteine. Das S100A12 Protein spielt vor allem bei der Autoimmunerkrankungen der RA (41), der autoinflammatorischen Erkrankung der JIA (40) und dem FMF (42) eine große Rolle in der Inflammationskaskade. Chang-Bum Bae (43) konnte 2014 zeigen, dass das S100A12 Protein sehr genau mit der Inflammationsstärke im Still-Syndrom (systemische juvenile idiopathische Arthritis von Kindern und Jugendlichen) korreliert.

Die Expression des S100A12 Proteins wird über die Entzündungsrezeptoren „receptor for the advanced glycation end products“ (RAGE) (44) und „toll-like receptor 4“ (TLR-4) (45) in den Granulozyten aktiviert. Nach der Expression und Sekretion aktiviert S100A12 das Endothel für die Diapedese von Entzündungszellen, stimuliert Granulozyten und aktiviert Mastzellen (45). Die Aktivierung und Stimulierung von inflammatorischen Zellen findet ebenfalls über die Rezeptoren TLR-4 und RAGE statt, sodass im Sinne einer positiven Rückkopplung zusätzlich eine weitere Expression von S100A12 Proteinen verursacht wird (45). Das S100A12 Protein besitzt demnach eine starke proinflammatorische Wirkung.

Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Proteinen der S100-Familie stellen die verschiedenen Strukturen dar. S100A12 Proteine können als Monomer, Dimer, Tetramer oder Hexamer vorliegen. Die kleinste Einheit eines S100A12 Proteins stellt ein S100A12 Monomer dar (molekulares Gewicht eines S100A12 Monomers: 10 kDa (47)). Die Aminosäureketten von zwei S100A12 Monomeren lagern sich zu einem S100A12 Dimer zusammen. Für die Polymerisation zu einem S100A12 Tetramer sind Zink Ionen entscheidend. Moroz beschrieb 2009 (36), dass Zink Ionen für eine Konformationsänderung zweier S100A12 Dimere verantwortlich sind und die Anlagerung zu einem S100A12 Tetramer ermöglichen. Ein S100A12 Dimer und ein S100A12 Tetramer können anschließend zu einem S100A12 Hexamer polymerisieren. Die Anlagerung zu einem S100A12 Hexamer wird durch eine Konformationsänderung initiiert, bedingt durch eine ausreichend hohe Konzentration an Calcium Ionen (mehr als 2 mM Calcium Ionen) (36) (siehe Anhang: 7.4. Konformationsänderung von S100A12).

In Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem das S100A12 Hexamer für die Bindung an die proinflammatorischen Rezeptoren wie RAGE (49) oder TLR-4 (50) verantwortlich ist. Das S100A12 Hexamer stellt somit nicht nur ein Indikator für Inflammationsprozesse dar, sondern spielt zusätzlich als Stimulator von Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle.

Im Vergleich zu anderen Entzündungsmarkern wie dem Akute-Phase-Protein CRP zeigt sich das S100A12 Protein als Indikator für Inflammationsprozesse bei der JIA und dem FMF überlegen. So konnte Kallinich 2010 bei Patienten mit FMF zeigen, dass das S100A12 Protein bei subklinischen Entzündungsprozessen signifikant erhöht ist und somit bereits bei symptomlosen Patienten beginnende Inflammationsprozesse anzeigt (42). Eine frühzeitige und adäquate Therapieanpassung könne so schon sehr früh erfolgen. Eine S100A12 Überexpression von rund dem 290-fachen über dem Normwert zeigt auch eine signifikant höhere Expression als andere Inflammationsmarker wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit, das CRP oder das Serumamyloid A (42).

2018 konnte von Orcyk und Smoleska gezeigt werden, dass S100A12 aufgrund von einer sehr hoher Spezifität von 100 Prozent (bei einem Grenzwert Level von 10,73 ng/ml eines 3 Monats-Beobachtungsintervall) und einer Sensitivität von 100 % als Indikator für eine Exazerbation (bei einem Grenzwert Level von 5.48 ng/ml während eines 3 Monats-Beobachtungsintervall) großes Potential besitzt ein wichtiger Faktor bei Therapieentscheidungen für die JIA zu werden (51).

2.4. Zielsetzung der Arbeit

In Studien konnte gezeigt werden, dass das S100A12 Protein ein sehr potenter Biomarker in der Autoimmunerkrankungen RA, in der autoinflammatorischen Erkrankung JIA und in dem FMF darstellt. Wie Moroz 2002 und Kessel 2018 zeigen konnten, stellt das S100A12 die entscheidene Konformation für die Bindung an proinflammatorische Rezeptoren wie RAGE und TLR-4 dar (49, 50). Das S100A12 Hexamer ist also die entscheidende Struktur des S100A12 Proteins, welche eine entzündungsfördernde Wirkung in den Erkrankungen der JIA, RA und FMF besitzt.

Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit, Liganden zu finden, die nur das S100A12 Hexamer aber nicht das Tetramer oder Dimer binden. Mit hexamerspezifischen Bindern wäre es möglich einen Test aufzubauen, welcher die Diagnostik von Erkrankungen wie der JIA, der RA oder dem FMF verbessern könnte. Neben der initialen Diagnostik könnte vor allem auch das Monitoring von Erkrankungen optimiert werden und eine patientengerechte Therapieanpassung gewährleistet werden. So könnte eine medikamentöse Eskalation oder Deeskalation noch vor Symptombeginn ermöglicht werden.

Zusätzlich könnte das therapeutische Potential der selektierten Hexamer spezifischen Liganden getestet werden. Wenn die hexamerspezifischen Binder die Interaktion des S100A12 Hexamers mit den proinflammatorischen Rezeptoren blockieren, wäre eine therapeutische Anwendung denkbar. Die Bindung des Hexamers an seine Rezeptoren könnte dann bei Patienten gezielt unterdrückt werden und die proinflammatorische Signalkaskade unterbrochen werden.

Zur Selektion von hexamerspezifischen Bindern wurde methodisch eine Affinitätsselektion durchgeführt. Es wurden verschiedene Bibliotheken von Peptid- und scFv-Phagen verwendet, welche in mehreren Runden aus Positiv- und Negativselektion aufgereinigt wurden. Durch die identischen Monomer-Untereinheiten des S100A12 Hexamers, Tetramers und Dimers waren die Anforderungen der Affinitätsselektion sehr hoch und eine Selektion eines spezifischen Liganden an das S100A12 Hexamers gestaltete sich sehr herausfordernd. Zur anschließenden Evaluation der hexamerspezifischen Bindungseigenschaften wurden die selektierten Liganden in ELISAs getestet. Die hexamerspezifischen Liganden wurden schließlich in einem ELISA zu einem hexamerspezifischen Testaufbau zusammengefasst. Die Etablierung des Tests stellte ebenfalls eine komplexe Aufgabe dar, um eine optimale Detektion des S100A12 Hexamers im Vergleich zum Tetramer oder Dimer in verschiedenen Medien zu erreichen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien:

Laborgeräte und Einwegartikel

Geräte, Materialien, Chemikalien	Hersteller/ Vertrieb
96 Loch-Kulturplatte (flat bottom)	Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-/Agarplatten (10cm, 25cm)	Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht, Deutschland
AKTAprime plus	GE Healthcare, 60313 Frankfurt am Main, Deutschland
Sterilisator VX-55	Systec GmbH, 90475 Nürnberg, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Biofuge primo R	Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Biosphere Pipettenspitzen, gestopft, 0,5-20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht, Deutschland
CO8000 Densitometer	Biochrom GmbH, 23617 Stockelsdorf, Deutschland
Tecan Sunrise™ Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
96 Loch-Mikrotiterplatte, Greiner Bio-One MICROLON™600	Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland
ELISA-Plate-Washer Elx405 Select	BioTek Instruments GmbH, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland
Galaxy Mini Tischzentrifuge	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland

Inkubator Function Line	Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Lab-860 pH-Meter	SI Analytics, 82362 Weilheim, Deutschland
MACSmix Rotationsmischer	Miltenyi Biotec, 51429 Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrowelle	Siemens AG, 80333 München, Deutschland
Millex-GS, 0,22µm, Zellulosemischester	Merck Millipore von Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Kreisschüttler MSI	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, 79219 Staufen, Deutschland
Multichannel Pipette Research® 30-300µl	Eppendorf SE, 22339 Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Multifuge 1 S-R	Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Multipette® E3/E3x	Eppendorf SE, 22339 Hamburg, Deutschland
Multiply® Reaktionsgefäße, 0,2ml	Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht, Deutschland
NanoDrop® 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, 58239 Schwerte, Deutschland
Nunc Kryoröhrchen 1.8ml	Thermo Scientific Nalgene von Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland
DNA engine Dyad® peltier thermal cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, 85622 Feldkirchen, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, 7205 Zizers, Schweiz

Pipette Research® 0,2-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf SE, 22339 Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200µl, 1000µl	Greiner Bio-One International GmbH, 4550 Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab GmbH, 22143 Hamburg, Deutschland
Reglo Digital, Peristaltik-Pumpe	Ismatec von Cole-Parmer GmbH, 97877 Wertheim, Deutschland
Rotilabo 5ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal® Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht, Deutschland
Sartorius Universal U4800P Waage	Sartorius AG, 37079 Göttingen, Deutschland
SealPlate® Verschlussfolien für Mikrotiterplatten	Excel Scientific, 18350 George Blvd. Victorville, CA 92394 USA
Serologischen Einweg-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, NY 14831, USA
Inkubationsschüttler SM-30 + TH 30	Edmund Bühler GmbH, 72411 Bodelshausen, Deutschland
UV-Küvetten semi-micro	Brand GmbH & Co. KG, 97877 Wertheim, Deutschland
Vortex Genius 2	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland
Wasserbad WB-10	P-D Industriegesellschaft mbH, 01159 Dresden, Deutschland
Erlenmeyerkolben 50ml, 400ml	SI Analytics, 82362 Weilheim, Deutschland

NALGENE™ wiederbenutzbare Flaschenaufsatzfilter	Thermo Scientific Nalgene von Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland
Brutschrank Typ BB 16 CU	Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
biologische Sicherheitswerkbänke, HeraSafe™	Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
ChemiDoc XRS ⁺ Bildgebungssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, 85622 Feldkirchen, Deutschland
Mini Trans-Blot® Zelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, 85622 Feldkirchen, Deutschland
Mini-PROTEAN® 4 Zellen Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, 85622 Feldkirchen, Deutschland
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Europe b.v., Hoeksteen 11, 4815 PR Breda, Niederlande
Falcon® 14ml Polypropylene Round- Bottom Tubes	Becton Dickinson, Trankling Lakes, NJ, USA
Falcon® Blue Max 15ml, 50ml Polypropylene Conical Tube	Becton Dickinson, Trankling Lakes, NJ, USA
HiTrap Protein A HP Säule, 1ml	GE Healthcare, 60313 Frankfurt am Main, Deutschland

Chemikalien, Puffer- und Medienbestandteile

Medium	Zusammensetzung
1x PBS	1:10 10x PBS ^(A) (phosphate buffered saline) in H ₂ O
2x YT Agar	16 g Trypton ^(B) , 10 g Hefeextrakt ^(A) , 5 g NaCl ^(B) , 15 g Agar ^(A) aufgefüllt auf 1 l dH ₂ O, pH 7.0
2x YT Agar _{Amp/Glu}	16 g Trypton ^(B) , 10 g Hefeextrakt ^(A) , 5 g NaCl ^(B) , 15 g Agar ^(A) , 5% Glukose 2M ^(B) , Ampicillin ^(C) in Lösung (100 mg/ml), aufgefüllt auf 1 l dH ₂ O, pH 7.0
2x YT Medium	16 g Trypton ^(B) , 10 g Hefeextrakt ^(A) , 5 g NaCl ^(A) auf 1 l dH ₂ O, pH 7.0
2x TY _{amp/Glu} Medium	2x YT-Medium ^(C) , 5 % Glukose-Lösung ^(B) (2 M), Ampicillin ^(C) (1:1000 Verdünnung der Ampicillin Lösung)
2x YT _{amp/Kan} Medium	2x YT-Medium ^(C) , Ampicillin ^(C) Lösung (100 mg/ml), Kanamycin ^(B) (1:1000 Verdünnung der Kanamycin Lösung)
Ampicillin Lösung	100 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz ^(C) (kristallines Pulver) in H ₂ O
Glucose Lösung, 2 M	396 g Glukose ^(C) , aufgefüllt auf 1 l H ₂ O
Glycerol/PBS	50 % Glycerol ^(C) (Kristallines Pulver), 50 % 1x PBS
Kanamycin Lösung	50 mg/ml Kanamycinsulfat ^(A) in H ₂ O
NaCl Lösung, 5 M	73.05 g NaCl ^(B) , aufgefüllt mit 250 ml H ₂ O
NaN ₃ -Stock, 2 %	1 g Natriumazid ^(B) , aufgefüllt mit 50 ml PBS

PBS/NaN ₃ -Stock, 2 %	5 ml 10x PBS ^(A) , 0.5 ml NaN ₃ ^(B) -Stock, ad 50 ml H ₂ O
PEG-Stock, 50 %	125 g Polyethylenglycol (PEG) 6000 ^(B) , ad 250 ml H ₂ O
PEG/ NaCl	1:1 Gemisch der NaCl ^(B) - and PEG ^(B) -Stocklösung
Top-Agar	250 mg MgCl ₂ ^(B) x 6 H ₂ O, 1.75 g Agar ^(A) , auf 250 ml YTmedium
Trypsin Lösung, 10 mg/ml	50 mg Trypsin ^(D) aufgefüllt mit 5 ml Tris-HCl Puffer ^(A) (50 mM)
LB Medium	20 g LB Medium ^(C) , aufgefüllt mit 1 l H ₂ O
LB _{amp} Agar	1 l LB Medium ^(C) + 15 g Agar ^(A) , Ampicillin ^(C) (100 ng/ml Lösung)
LB _{amp} Medium	20 g LB Medium ^(C) , aufgefüllt mit 1 l H ₂ O Ampicillin ^(C) (100 ng/ml Lösung)

Herstellerangaben:

[A] – VWR Chemicals von VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland

[B] – Merck Millipore von Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

[C] – Thermo Scientific Nalgene von Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland

[D] - Biowest, 49340 Nuaillé, Frankreich

Verwendete Lösungen des Pannings	
Glycin-HCl	Carl Roth GmbH und Co., 76185 Karlsruhe, Deutschland
IPTG	Carl Roth GmbH und Co., 76185 Karlsruhe, Deutschland

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (kurz: XGal)	Carl Roth GmbH und Co., 76185 Karlsruhe, Deutschland
Verwendetes Material der Antikörper-Aufreinigung	
NaH ₂ PO ₄ Lösung, 200 mM	15.6 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, (Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland), aufgefüllt mit 500 ml H ₂ O
Protein A Bindepuffer 20x (pH 7.0), 200 mM Natriumphosphat-Puffer	305 ml Na ₂ HPO ₄ -Solution (200 mM), 195 ml NaH ₂ PO ₄ -Solution (200 mM)
Protein A Bindepuffer 2x (pH 7.0), 20 mM Natriumphosphat-Puffer	305 ml Na ₂ HPO ₄ -Solution (200 mM), 19,5 ml NaH ₂ PO ₄ -Solution (200 mM), aufgefüllt mit 500 ml H ₂ O
Protein A Elutionspuffer (pH 3.0) 0.1 M Zitronensäure	6.23 ml Zitronensäure (8.03 mol/l), mit 500 ml H ₂ O aufgefüllt
Protein A Neutralisationspuffer (pH 9.0) 1 M TRIS	12.11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (121.14 g/mol), mit 100 ml H ₂ O aufgefüllt
Protein G Elutionspuffer (pH 2.7), 0.1 M Glycine	1.88 g Glycine (75.07 g/mol), mit 250 ml H ₂ O aufgefüllt
Vivaspin 20 Konzentrator, 30 kDa	Sartorius AG, 37079 Göttingen, Deutschland
1x Coupling Puffer (Affi-Gel® Kit) + 10 mM CaCl ₂	100 ml 10x Coupling Puffer (Affi-Gel® Kit, 1.1 g CaCl ₂ (110.99 g/mol), aufgefüllt mit 1 l H ₂ O; pH 5.5
BSA-Stock, 10 %, in Coupling Puffer (Affi-Gel® Kit)	500 mg bovinem Serumalbumin (BSA) mit 5 ml Coupling Puffer aufgefüllt, Aliquots werden gelagert bei -20°C
Buffer A (Äquilibration buffer)	10 mM MES, 5 mM CaCl ₂ , 2 mM NaCl; pH 6

Buffer B (Waschpuffer) von Affi-Gel® HZ	10 mM MES, 5 mM CaCl ₂ , 100 mM NaCl; pH 6
Buffer C (Elutionspuffer) von Affi-Gel® HZ	10 mM MES, 5 mM CaCl ₂ , 1 M NaCl, 50 % Ethylenglykol; pH 6
Buffer D (Regenerationpuffer) von Affi-Gel® HZ	10 mM MES, 5 mM CaCl ₂ , 1 M NaCl, 75 % Ethylenglykol; pH 6
Glycerol Stock, 50%, in Coupling Puffer (Affi-Gel® Kit)	2 ml Glycerine (92.09 g/mol; 1.26 g/cm ³) mit 4 ml Coupling Puffer; gefilterte Aliquots werden gelagert bei 4°C
NaCl Lösung, 5 M	292,2 g NaCl (58,44 g/ mol), mit 1 l H ₂ O
NaIO ₄ Lösung (Affi-Gel® Kit)	25 mg NaIO ₄ , mit 1.2 ml H ₂ O
Poly-Prep® Chromatographie Säule	Bio-Rad Laboratories GmbH, 85622 Feldkirchen, Deutschland
Tween20 10 %	5 ml Tween20 aufgefüllt auf 50 ml H ₂ O
Waschpuffer des Affi-Gel®	220 mM Tris, 0.01 % Tween, 10 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, 0.02 % NaN ₃ ; pH 7.4
Verwendetes Material der ELISA	
BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co., 76185 Karlsruhe, Deutschland
o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland
OPD Lösung	40 mg OPD gelöst in 100 ml 0,05 M Phosphate-Citrate Puffer, aktiviert mit 40 µl H ₂ O ₂

Phosphat-Citrat Puffer Tabletten	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland
Tween-20	Merck Millipore von Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
PBST	0.05 % Tween-20 in 1xPBS
MPBST 5 %	5 % Milchpulver in PBST
Streptavidin, 2 mg/ml Stocklösung	Jackson ImmunoResearch; Dianova [®] , BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Leipziger Straße 4, 85386 Eching, Deutschland
HEPES gepufferte Saline (HBS)	Medicago AB, Danmark Berga 13, SE-755 98 Uppsala, Schweden
sonstiges Materialien	
1 kb DNA High-Range Ladder	GeneRuler™, Fermentas (Thermo Scientific)
25-700 bp DNA Low-Range Ladder	GeneRuler™, Fermentas (Thermo Scientific)
6x Orange DNA Loading Farbstoff	6x DNA-Ladepuffer, orange - Thermo Scientific™
Agarose	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ Lösung (100 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O in H ₂ O)	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ / Glycerol	15 % Glycerol (v/v) (kristallines Pulver) in CaCl ₂ Lösung
CutSmart [®] Buffer	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland

dH ₂ O	Destilliertes Wasser
Ethanol (70%)	70 ml Ethanol, mit H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt
H ₂ SO ₄	TitriPur® Merck (0.5 mol/l (1 N))
Restriktionsenzyme Not1 + Nco1	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
Polymerase-Kettenreaktion (PCR-) Buffer	10x Standard Taq Reaction Buffer (New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland)
dNTPs	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix; New England Biolabs, 10mM
Taq-Polymerase (Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (5.000 U/ml))	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
TAE-Puffer (TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Puffer)	40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0
ROTI®GelStain	Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
GFP-M420	Merck Millipore von Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Verwendetes Material der Zellkultur	
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS), ohne Calcium, ohne Magnesium
DMEM – ITS	DMEM (Gibco): Glukose, 1 % 10x Insulin-Transferrin Selenium (ITS) (Gibco), 1 % Penicillin-Streptomycin (10.000 Einheiten Penicillin; 10 mg Streptomycin pro ml), 2 % L-Glutamine, 200 mM

Polyethylenimine (PEI)	MW 40.000 linear, Polysciences Europe GmbH, Badener Str. 13, 69493 Hirschberg an der Bergstrasse, Deutschland

Verwendete Kits

Kits	Hersteller/ Vertrieb
peqGOLD Gelextraktionskit	PEQLAB Biotechnologie GmbH von VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH von VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland
Q5 [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
Quick Ligation [™] Kit	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
Nucleobond Kit PC500 Plasmid DNA Preparation Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 52355 Düren, Deutschland
Affi-Gel [®] Hz Immunoaffinity Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, 85622 Feldkirchen, Deutschland

Phagen-Bibliotheken

Bibliothek	Hersteller/ Vertrieb
Ph.D.-7 Phage Display Peptide Library E8102L (52)	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
Ph.D.-C7C Phage Display Peptide	New England Biolabs GmbH, 65926

Library E8121L (52)	Frankfurt am Main, Deutschland
Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library E8111L (52)	New England Biolabs GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
Tomlinson J Phagen Library (52, 120)	BioScience, Nottingham, England; Human Single Fold scFv Libraries I + J (1.37×10^8 , NNK diversification)
Tomlinson I Phagen Library (52, 120)	BioScience, Nottingham, England; Human Single Fold scFv Libraries I + J (1.47×10^8 , DVT diversification)
HuScL-2 Phagen Library (52, 120)	Creative Biolabs Inc., 167-169 Great Portland Street, London, England (1×10^{13} PFU/ml, Lagerung bei -80°C (diversity: $1,42 \times 10^9$))
HuScL-3 Phagen Library (52, 120)	Creative Biolabs Inc., 167-169 Great Portland Street, London, England (1×10^{13} PFU /ml, Lagerung bei -80°C (diversity: $1,6 \times 10^9$))

S100A12 Proteine

S100A12 Proteine	Hersteller/ Vertrieb
S100A12 Dimer (crosslinked)	Produziert und aufgereinigt vom Labor für pädiatrische Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland (121)
S100A12 Tetramer (crosslinked)	Produziert und aufgereinigt vom Labor für pädiatrische Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland (121)

S100A12 Hexamer (crosslinked)	Produziert und aufgereinigt vom Labor für pädiatrische Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland (121)
S100A12 Hexamer (Wildtyp)	Aufgereinigt vom Labor für pädiatrische Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland (121)
<p>Überblick zur Produktion und Aufreinigung des S100A12 Hexamers, Tetramers & Dimers:</p> <p>Für die Produktion der S100A12 Proteine wurde eine humane S100A12 Sequence (NCBI Reference Sequence: NP_005612.1) in ein pET11b Vektor integriert und schließlich in ein E.coli BL21 (DE3) transformiert und kultiviert. Die Aufreinigung der S100A12 Proteine erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie und Calcium-abhängiger hydrophober Interaktionschromatographie. Zum Entfernen von Endotoxinen wurde eine 50 kDa Filtermembran verwendet, welche zu einem vollständigen Entfernen von Lipopolysacchariden führte. Um das endotoxin-freie S100A12 Protein in den jeweiligen Konformation als Hexamers, Tetramers und Dimers bei Raumluft zu stabilisieren, wurde Bis(sulfosuccinimidyl)suberat als chemischer Crosslinker verwendet (121). Zur Qualitätskontrolle wurde nach Produktion der S100A12 Hexamere, Tetramere und Dimere ein Chromatogramm aus Gelfiltration durchgeführt. Die Größe der aufgereinigten Konstrukte entsprach den erwarteten Größen der unterschiedlichen Multimere (siehe Abbildung 22, Daten Münster, PD Dr Kessel, S. Fühner)</p>	

Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller/ Vertrieb
HRP-konjugierten anti-M13-Antikörper (monoklonal, Wirtsart: Maus, primärer Antikörper, HRP-konjugiert)	GE Healthcare, 60313 Frankfurt am Main, Deutschland

anti-S100A12-antibody (monoclonal, Wirtsart: Ratte)	selektiert vom Labor für pädiatrische Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland (erstmal 2018 publiziert (122))
anti-Ratte-HRP-konjugierter Antikörper (Spezies: Rat, Wirtsart: Ziege, sekundärer Antikörper, polyklonal, HRP-konjugiert)	Thermo Fisher Scientific, 58239 Schwerte, Deutschland
anti-Maus-HRP-konjugierter Antikörper (Spezies: Ziege, Wirtsart: Maus, sekundärer Antikörper, polyklonal, HRP-konjugiert)	Dianova GmbH, 22087 Hamburg, Deutschland

Synthetisierte Peptide

Peptide	Sequenzen und Hersteller
Peptid 4 (N-Terminus: Biotin, C-Terminus: Amid-Sequenz, Linker: Trioxatridecan-succinamic acid (Ttds) Reinheit: >70%) (siehe Anhang: 7.5. Biotin-Struktur der Peptide und 7.6. Linker-Struktur der Peptide)	Sequenz: EGLSWQYMLDLW BioTides™; JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Deutschland
Kontroll-Peptid 4 (N-Terminus: Biotin, C-Terminus: Amid-Sequenz, Linker: Ttds)	Sequenz: WLWGESLLYQMD BioTides™; JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin,

<p>Reinheit: >70%) (siehe Anhang: 7.5. Biotin-Struktur der Peptide und 7.6. Linker-Struktur der Peptide)</p>	<p>Deutschland</p>
<p>Peptid 10 (N-Terminus: Biotin, C-Terminus: Amid-Sequenz, Linker: Ttds Reinheit: >70%) (siehe Anhang: 7.5. Biotin-Struktur der Peptide und 7.6. Linker-Struktur der Peptide)</p>	<p>Sequenz: EPMRWTD MVGLF</p>
	<p>BioTides™; JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Deutschland</p>
<p>Kontroll-Peptid 10 (N-Terminus: Biotin, C-Terminus: Amid-Sequenz, Linker: Ttds Reinheit: >70%) (siehe Anhang: 7.5. Biotin-Struktur der Peptide und 7.6. Linker-Struktur der Peptide)</p>	<p>Sequenz: MMFGERDPVTWL</p>
	<p>BioTides™; JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Deutschland</p>

Bakterien-, Phagen und Zelllinien

Bakterien- Phagen und Zelllinien	Hersteller/ Vertrieb
<p><i>E. coli</i> strain TG1</p>	<p>Komponente der HuSci-Library Kits (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA+B lacIq lacZ*M15)</p>

<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen, Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland (F- mcrA *(mrr-hsdRMS- mcrBC)+80lacZ*M15 *lacX74 recA1 araD139 *(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG)
HEK 293T	Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit SV40 T Antigen; Referenz # ATCC CRL-11268
KM13 Helferphage	Komponente des Tomlinson library Kits BioScience, Nottingham, England

Plasmide, Primer

Plasmide und Primer	Beschreibung/Hersteller
Primer 96 gIII Sequenzierungsprimer	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
pCMX2.5-mIgG2c-Fc-XP	eukaryotischer Expressionsvektor einer Fc Region von einem IgG2c aus der Maus (siehe Abbildung 21)

Primer mit Sequenzen

Primer	Rich- tung	Basen -länge	Tm (°C)	GC (%)	Sequenz
ScFv-Phage 41	for- ward	22	55	50	TGTTCGTACACAGTACGCAGAC
ScFv-Phage 41	rever- se	21	50	43	CCATCACGATGAATATCTGAG
ScFv-Phage 42	for- ward	23	59	57	CTCAACTATTCAGCCTCGGGGTC
ScFv-Phage 42	rever- se	18	55	67	ACCCACTCCAGCCCCTTC
OMHI 65	-	20	52	50	CCCTCATAGTTAGCGTAACG
OMHI 66	-	18	50	56	GGCTCGTATGTTGTGTGG
OMHI 427	-	22	55	50	TGTTCGTACACAGTACGCAGAC
OMHI 433	-	22	55	50	GTCTGCGTACTGTGTACGAACA
OMHI 429	-	23	59	57	CTCAACTATTCAGCCTCGGGGTC
OMHI 434	-	23	59	57	GACCCCGAGGCTGAATAGTTGAG

Legende:

Tm: Schmelzpunkt in Grad Celcius (°C)

GC(%): Anteil an Guanin (G) und Cytosin (C) an gesamten Nukleinbasen

Alle Primer wurden bestellt bei: Sigma-Aldrich von Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Affinitätsselektion von Peptid- und scFv-Phagen

Die Affinitätsselektion der Phagen mit Expression von Peptidstrukturen (Peptid-Selektion) wurde mit drei Peptid-Bibliotheken durchgeführt (Ph.D-12, -7 and C7C, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland). Es wurden drei Affinitätsselektionen mit jeweils einer negativen und einer positiven Selektion durchgeführt.

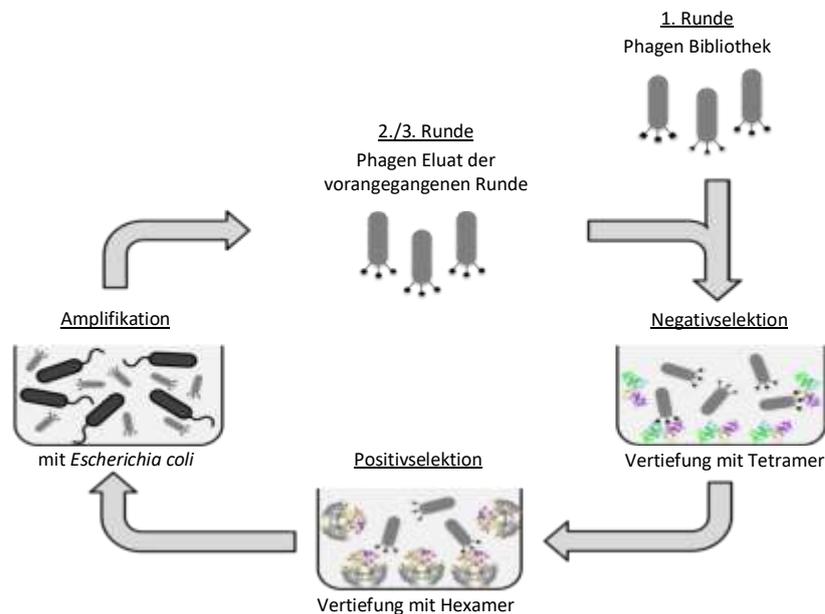


Abbildung 1: Schema der Affinitätsselektion

Für die Negativselektion wurden 1 µg pro Vertiefung S100A12 Tetramer in PBS auf Masterplatten beschichtet. Für die Positivselektion der Peptid-Affinitätsselektion wurde S100A12 Hexamer immobilisiert. Die Hexamerkonzentration wurde pro Runde jeweils reduziert: von 1 µg pro Vertiefung in der ersten Runde, zu 0,5 µg pro Vertiefung in der zweiten Runde zu schließlich 0,1 µg pro Vertiefung in Runde drei. Die Inkubation der immobilisierten Hexamer und Tetramer Vertiefungen wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen dreimal mit je 200 µl 0,1 % PBST gewaschen. Hierfür wurde ein Mikrotiterplatten-Washer verwendet. Anschließend wurden die ELISA-Vertiefungen für 2 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver (5 % MPBST) geblockt. Hiermit sollen unspezifische Bindungen der Phagen an die ELISA-Vertiefungen verhindert werden. Anschließend wurden 10 µl der Peptid-Phagen-Bibliothek in 140 µl MPBST verdünnt und zu

den Vertiefungen mit immobilisiertem Tetramer (Negativselektion) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Phagenlösung vorsichtig entnommen und die Vertiefungen mit immobilisiertem Hexamer hinzugegeben (Positivselektion). Dieser Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Versuchstag wurden die Vertiefungen zehnmal mit 0,1 % PBST gewaschen. Zur Elution der gebundenen Phagen wurde 200 µl Glycine-HCl hinzugegeben. Zu der entnommenen Phagenlösung wurde nun je 30 µl Neutralisationspuffer (Tris-HCl 1M, pH 9.1) hinzugegeben und so das saure Milieu des Elutionspuffer neutralisiert. Die *Escherichia coli* (*E. coli*) (ER2738) Übernachtkultur wurde anschließend mit der Phagenlösung infiziert und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 4,5 h bei 37 °C mit 225 rpm (Umdrehungen pro Minute) geschüttelt. Für die *E. coli* Übernachtkultur wurde am Vortag 25 ml LB-Medium mit 25 µl Tetrazyklin und einer *E. coli* Kultur vermischt. Diese wurde dann bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Der Phagen-Medium Ansatz wurde nach 4,5 h Inkubation im Schüttler in 50 ml Röhrchen gefüllt und für 15 min bei 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Durch das Abzentrifugieren der infizierten Bakterien bildete sich am Boden des Röhrchens ein Bakterienpellet. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert. Nach dem zweiten Zentrifugieren wurde abermals der Überstand entnommen und mit jeweils 8 ml PEG vermischt und die Phagen über Nacht bei 4 °C gefällt. Am vierten Versuchstag wurde das PEG-Phagen Gemisch bei 10.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Anschließend blieb nach Entnehmen des Überstandes ein weiß-graues Phagenpellet über. Dieses wurde mit 1,6 ml PBS resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Das resuspendierte Phagenpellet wurde erneut für 5 min bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäße überführt und erneut mit PEG gefällt. Hierzu wurden 400 µl PEG/NaCl hinzugegeben und nach mehrmaligen invertieren für 1 h auf Eis gelagert und erneut für 15 min bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut verworfen und das Phagenpellet wurde anschließend in 200 µl 1x PBS 0,02 % NaN₃ resuspendiert. Abschließend konnte die gewonnene Phagenkonzentration mittels Nanodrop gemessen

werden (Absorption 269 bis 320 nm). Der Ablauf wurde anschließend zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Runden aus Positivselektion und Negativselektion durchgeführt wurden. In der zweiten und dritten Runde der Affinitätsselektion wurde für die Negativselektion jeweils 1×10^{11} Phagen aus der jeweils vorhergehenden Runde pro Vertiefung hinzugegeben.

Die Affinitätsselektion der Phagen mit scFv-Fragmenten auf der Oberfläche wurde mit den Phagen-Bibliotheken Tomlinson I und Tomlinson J sowie mit den Phagen-Bibliotheken HuScI-2 und HuScI-3 durchgeführt. Die Durchführung der Affinitätsselektion erfolgte analog der Selektion mit den Peptid-Phagen-Bibliotheken. Für die Negativselektion wurde bei der Affinitätsselektion der scFv-präsentierenden Phagen jeweils 3×10^{11} Phagen zu immobilisierten Proteinen gegeben. Die Konzentration von S100A12 Tetramer pro Vertiefung war entsprechend der Affinitätsselektion mit Peptid-präsentierenden Phagen. Für die Positivselektion wurde die Elution der gebundenen scFv-präsentierenden Phagen vom S100A12 Hexamer mit 200 μ l Elutionspuffer pro Vertiefung durchgeführt und für 5 min inkubiert. Der Überstand wurde anschließend zu 30 μ l Neutralisationspuffer sowie 50 μ l Trypsinstock und 220 μ l PBS gegeben und für 10 min bei Raumluft belassen. Trypsin spaltet als Serin-Enzym Proteine an den Positionen der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Im Kontext der Phagen mit Expression von scFv- und Peptidfragmenten ermöglichte Trypsin durch die enzymatische Entfernung des Oberflächenproteins pIII die Elution der zuvor gebundenen Phagen. Im nächsten Schritt wurde 250 μ l Eluat mit 1,75 ml einer TG1-Kultur vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die TG1-*E. coli* Kultur wurde im linearen Wachstum ($OD_{492-620 \text{ nm}}$ von 0,3 bis 0,4) infiziert. Nach der Inkubation von TG1 und dem Eluat wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:10, 1:100 und 1:1000 in PBS angelegt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden schließlich 20 μ l auf kleinen 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Platten ausgestrichen und am nächsten Tag der Titer bestimmt. Das restliche Eluat wurde für 30 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden schließlich 20 μ l auf kleinen 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Platten ausgestrichen. Das restliche, resuspendierte Phagenpellet wurde auf einer großen 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Platte verteilt. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit jeweils 5- 7 ml 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Medium wurde der Bakterienrasen abgeschwemmt. Anschließend wurden 50 μ l entnommen in 50

ml 2x TY_{AMP/GLU}-Medium überführt und bei 37 °C und 60 rpm bis zu einer OD_{492-620 nm} von 0,3 bis 0,4 geschüttelt. Aus dieser Kultur wurden 10 ml entnommen und mit 5x10¹⁰ KM13 Helferphagen versetzt, für 30 min bei 37 °C infiziert und anschließend für 10 min bei 3000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 50ml 2x TY_{AMP/GLU}-Medium resuspendiert und zur Phagenproduktion bei 30 °C, 225 rpm über Nacht inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 10.000 xg für 30 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit 10ml PEG/NaCl vermischt und anschließend für 1 h auf Eis gefällt. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz für 30 min bei 10.000 xg zentrifugiert und der Überstand vollständig verworfen. Das Phagenpellet wurde in 1 ml PBS/NaN₃ resuspendiert. Um die letzten Bakterienreste zu entfernen, wurden anschließend die resuspendierten Phagen zentrifugiert (30 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde entnommen und die Phagenkonzentration im Nanodrop gemessen. Die Lagerung der Phagen erfolgte bei 4 °C. Insgesamt wurden drei negative und drei positive Selektionen durchgeführt.

3.2.2. Vereinzelung von Phagenklonen

Um die selektierten Phagen aus den Pannings weiter zu analysieren, müssen diese vereinzelt („titriert“) werden. Dazu wurden die Eluate der letzten positiven Selektion 10⁻⁶ bis 10⁻¹⁰ in PBS verdünnt. Parallel wurden Röhrchen mit je 4 ml Top-Agar befüllt und im Wasserbad flüssig gehalten. 20 µl Xgal und 20 µl IPTG wurden in Reaktionsgefäße vorgelegt. IPTG führt zu einer Induktion des lac-Promotors auf den Phagenplasmiden. Durch Aktivierung des lac-Promotors wird eine β-Galactosidase exprimiert. Die entstehende β-Galactosidase schneidet das Galactosid Xgal wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. IPTG und Xgal verursachen dadurch eine Blaufärbung der erfolgreich infizierten Bakterien. Zu Xgal und IPTG wurden noch 200 µl einer *E. coli* (ER2738) Übernachtskultur sowie 10 µl einer Phagenverdünnung hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch mit dem Top-Agar vermischt und auf LB-Agarplatten aufgetragen. Nach Abkühlung und Aushärten wurden die Platten invertiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Infizierte Bakterienhöfe erscheinen blau, so dass diese gezählt und als „plaque forming units“ (pfu) pro 10 µl bestimmt wurden.

Die Titrierung der scFv-Phagen wurde entsprechend der Titrierung der Peptid-Phagen durchgeführt. Jedoch wurden Kolonien statt pfus gezählt und Selektionsmedium anstatt Topagar verwendet. Außerdem wurde die Verdünnung der gewonnen Phagen in einem Bereich von 10^{-7} bis 10^{-11} angesetzt, um eine Phagenkonzentration von 10^1 bis 10^5 Phagen pro Milliliter zu erhalten. Die Phagenverdünnungen wurden anschließend mit einer TG1-*E. coli*-Kultur in 2x TY-Nährmedium vermischt. Die TG1-Bakterienkultur wurde zuvor in 2x TY-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur verdünnt und anschließend bis zu einer $OD_{492-620\text{ nm}}$ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Von der inkubierten Bakterienkultur wurde schließlich 900 μl mit je 100 μl der Phagenverdünnung vermischt und anschließend bei 37 °C für 30 min inkubiert. Von jedem Ansatz der infizierten Bakterien wurden jeweils 20 μl auf 2x $TY_{AMP/GLU}$ Agarplatten ausplattiert. Die Nährplatten wurden über Nacht bei 37 °C gelagert.

3.2.3. Amplifikation der vereinzelt Peptid- und scFv-präsentierenden Phagenklone

Die blauen Plaques beziehungsweise die Bakterienklone wurden von den Titrationsplatten mit sterilen Pipettierspitzen ausgestochen und in eine mit 200 μl LB-Medium beziehungsweise 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Medium gefüllte Vertiefung einer ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 30 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Der Ansatz mit Peptid-präsentierenden Phagen konnte am nächsten Tag für 10 min bei 3220 xg zentrifugiert werden und der gewonnen Phagenüberstand anschließend für den Capture-ELISA verwendet werden.

Für den Ansatz mit scFv-exprimierten Phagen wurde die jeweils 5 μl Übernachtskultur mit 200 μl pro Vertiefung 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Medium vermischt und für circa 2 h bei 37 °C vorsichtig im Schüttler geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden jeweils 25 μl 2x $TY_{AMP/GLU}$ -Medium und 1×10^9 KM13-Helferphage pro Vertiefung hinzugefügt. Für die Infektion mit Helferphagen wurden die ELISA-Platten 30 min bei 37 °C vorsichtig im Schüttler geschüttelt. Anschließend wurden die Platten bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und verworfen und schließlich die Vertiefungen jeweils mit 200 μl 2x $TY_{AMP/KAN}$ -Medium ersetzt. Entsprechend den Peptid-präsentierenden Phagen wurde die Phagenproduktion über Nacht bei 30 °C, 150 rpm

durchgeführt und die Platten für 10 min bei 3220 xg zentrifugiert und der Überstand mit den amplifizierten Phagen anschließend für den Capture-ELISA abgenommen werden.

Eine weitere Amplifikation zur Vorbereitung des Bestätigungs-ELISAs wurde analog der Amplifikation der vereinzelt Phagenklone vor Capture-ELISA durchgeführt mit der Ausnahme, dass für die Peptid-präsentierenden Phagen nicht ausgestochene Bakterien, sondern 50 µl infizierte Bakterienlösung aus der Kulturplatte entnommen und zu 3 ml LB_{TET}-Medium gegeben wurden. Nach fünf-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Amplifikation bei 30 °C und 225 rpm über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kulturen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 4 °C und 13.000 xg zentrifugiert. 1,6 ml des Überstandes werden anschließend in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 400 µl PEG/NaCl-Fällungspuffer versetzt. Die Phagenfällung wurde für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 xg, 4 °C für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Phagenpellet vorsichtig mit 200 µl PBS-NaN₃ resuspendiert.

Bei dem Ansatz mit scFv-präsentierenden Phagen wurden ebenfalls 50 µl infizierte Bakterienlösung aus der Kulturplatte entnommen und zu jeweils 2 ml 2x TY_{AMP/GLU}-Medium in Kulturröhrchen gegeben und bei 30 °C über Nacht mit 60 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde 4 ml 2x TY_{AMP/GLU}-Medium mit 40 µl Übernachtkultur in Kulturröhrchen gemischt (Verhältnis 1:100) und bei 30 °C bis eine OD_{492-620 nm} von 0,3 bis 0,4 geschüttelt. Pro Ansatz wurden anschließend 2x10¹⁰-Helferphagen hinzugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die Ansätze bei 3000 xg für 10 min zentrifugiert und 4 ml des Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit den restlichen 2 ml Medium resuspendiert und jeweils 1 ml mit je 5 ml 2x TY_{AMP/KAN}-Medium vermischt und zur Phagenproduktion über Nacht bei 30 °C bei 60 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurde die Übernachtkultur mit 4600 xg für 60 min zentrifugiert, um anschließend den Überstand zu entnehmen und mit 1,5 ml PEG/NaCl (1:1-Lösung) zu vermischen und 1 h auf Eis zu lagern. Nach der Fällung mit PEG/NaCl erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 10.000 xg. Der Überstand wurde vollständig entnommen und das gewonnen Phagenpellet in 250 µl PBS/ NaN₃ resuspendiert. Die erhaltene Phagenlösung wurde nach Umfüllung in Reaktionsgefäße erneut für 10 min bei 13.000 xg

abzentrifugiert, um letzte Bakterienreste zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt. Zur Bestimmung der gewonnenen Phagenkonzentration konnte abschließend der Phagentiter im Nanodrop bestimmt werden.

3.2.4. Capture ELISA

Um die selektierten Phagen auf ihre Bindungseigenschaften zum S100A12 Hexamer und Tetramer zu testen, wurde ein Capture ELISA durchgeführt.

Hierfür wurden auf ELISA-Platten 0,08 µg Hexamer und 0,1 µg Tetramer in 100 µl PBS pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Um zu verhindern, dass durch eine unspezifische Bindung an das S100A12 Monomer ein höheres Bindungssignal beim S100A12 Hexamer durch die höhere Monomer-Anzahl im Vergleich zum Tetramer generiert (sechs Monomere beim Hexamer vs. vier Monomere) wurde die beschriebene Konzentration an immobilisiertem Hexamer und Tetramer gewählt. Am nächsten Tag wurden die ELISA-Vertiefungen 3x mit je 200 µl 0,05 % PBST im Platewasher gewaschen. Anschließend wurden die restlichen Bindungsstellen durch die Zugabe von je 200 µl 5% MPBST für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde zunächst 70 µl PBS pro Vertiefung vorgelegt und anschließend je 30 µl eines phagenhaltigen Überstandes (siehe 3.2.3. Amplifikation der vereinzelt Peptid- und scFv-präsentierenden Phagenklone) hinzugegeben. Die anschließende Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift erfolgte die Detektion mit einem anti-M13-HRP-konjugiertem Antikörper (1:5000 Verdünnung in 5 % MPST) für 1 h bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschvorgang konnten die gebundenen Phagen mit OPD visualisiert werden. Hierfür wurde OPD in Citratpuffer gelöst (0.5 mg/ml OPD in 0.1 M Citratpuffer) und mit 4 µl 30 %igem H₂O₂ aktiviert. Pro Vertiefung wurden 100µl OPD-Lösung pipettiert. Nach circa sechs-minütiger Entwicklung in Dunkelheit wurde die Farbreaktion mit jeweils 100 µl 1,0 M H₂SO₄ pro Vertiefung beendet. Die Farbreaktion konnte mittels mit dem Mikroplatten-Lesegerät Sunrise™ Tecan bei einer Wellenlänge von 492 nm und 620 nm ausgewertet werden.

3.2.5. Bestätigungs-ELISA

Um die S100A12 Hexamerspezifität der selektierten Phagen zu bestätigen wurde ein Bestätigungs-ELISA durchgeführt. Der Bestätigungs-ELISA wurde entsprechend des Capture ELISAs (Kapitel 3.2.4. Capture ELISA) durchgeführt mit dem Unterschied, dass die selektierten und aufgereinigten Phagen in einer Konzentration von circa 1×10^{10} PFU in jeweils 100 μ l PBS-Puffer pro Vertiefung hinzugegeben wurden anstatt einer undefinierten Phagenkonzentration im Capture-ELISA.

3.2.6. Sequenzierung

Die DNA wurde aus isolierten und amplifizierten Phagenklonen (siehe Kapitel 3.2.3. Amplifikation der vereinzelt Peptid- und scFv-präsentierenden Phagenklone) isoliert. Die DNA-Präparation wurde mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde Primer 96gIII verwendet (New England Biolabs). 2,5 μ l des Primers wurden jeweils mit 5 μ l der jeweiligen DNA und 2,5 μ l destilliertem Wasser vermischt.

3.2.7. Kompetitions-ELISA

Als Vorversuch des Kompetitions-ELISAs wurde die konzentrationsabhängige Bindung an S100A12 Hexamer getestet, um die optimale Phagenkonzentrationen zu ermitteln, die sich im linearen Bereich des Signals befindet. Die Durchführung des ELISAs erfolgte entsprechend den vorangegangenen ELISAs. Pro ELISA Vertiefung wurden 0,08 μ g S100A12 Hexamer immobilisiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Blocken mit 5 % MPBST für 2 h bei Raumtemperatur wurden Phagenverdünnungen in folgenden Konzentrationen in die ELISA Vertiefungen pipettiert: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 (Peptid-präsentierende Phage 4: $2,675 \times 10^{12}$ Phagen/ml Stocklösung; Peptid-präsentierende Phage 10: $3,655 \times 10^{12}$ Phagen/ml Stocklösung). Nach zwei stündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion der gebundenen Phagen mit einem anti-M13-HRP-konjugiertem Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung (in 5 % MPBST, 100 μ l pro Vertiefung) für 2 h bei Raumtemperatur. Die Detektion und Visualisierung mit OPD wurde entsprechend den vorangegangenen ELISA

durchgeführt. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurde die ELISA Platten im Platewasher entsprechend den Angaben in den vorangegangenen ELISAs gewaschen.

Zur weiteren Analyse der Hexamerspezifität der selektierten Phagen wurde ein Kompetitions-ELISA durchgeführt. Hierbei wurde die Bindung der selektierten Phagen an das S100A12 Hexamer mit der Bindung an das S100A12 Tetramer und S100A12 Dimer verglichen. Die I wurde analog des Capture-ELISAs (Kapitel 3.2.4. Capture ELISA) durchgeführt mit einer Konzentration von 0,08 µg Hexamer pro Vertiefung. Nach dem Blocken der ELISA Platte mit 5 % MPBST für 2h bei Raumtemperatur wurden die Phagen mit S100A12 Tetramer sowie S100A12 Dimer gemeinsam in den jeweiligen Ansätzen pipettiert.

Die Dimer und Tetramerkonzentrationen entsprechen einem Konzentrationsverhältnis von dem 0,01-fachen bis zum 100-fachen an Dimer und Tetramer pro Vertiefung verglichen mit der Konzentration an immobilisiertem Hexamer (Verdünnungsschritte jeweils 1:10 ausgehend von der höchsten Konzentration (1×10^{-10} mol pro Vertiefung)).

Für die Peptid-präsentierenden Phagen wurde eine Phagenkonzentration von 5×10^8 bis 3×10^7 Phagen pro Vertiefung verwendet. Für die scFv-präsentierenden Phagen lag die Konzentration zwischen 8×10^9 bis 2×10^{11} Phagen pro Vertiefung. Die jeweiligen Phagenverdünnungen wurden so berechnet, dass sich die Konzentrationen im linearen Bereich befinden, entsprechend den Ergebnissen des Vorversuches.

Die Verdünnungen wurden in 5 % MPBST hergestellt. Jeder Kompetitionsansatz wurde mit der Bindung des jeweiligen Phagen an das S100A12 Hexamers ohne Competition mit S100A12 Tetramer oder S100A12 Dimer verglichen.

Die Kompetitions- und Kontrolllösungen wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2h wurden die ELISA-Vertiefungen 3x im Platewasher mit je 200 µl 0,05 % PBST gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Phagen wurde erneut anti-M13-HRP-konjugierter Antikörper verwendet (1:5000 Verdünnung in 5 % MPBST, jeweils 100 µl pro Vertiefung). Die Detektion und Visualisierung mit OPD wurde entsprechend des Captures ELISAs (Kapitel 3.2.4. Capture ELISA) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurde die ELISA Platten jeweils mit 200 µl 0,05 % PBST 3x im Platewasher gewaschen.

3.2.8. Bindung von synthetischen Peptiden und Kontrollpeptiden an S100A12

Die in der Affinitätsselektion selektierten Phagen wurden als biotinylierte Peptide bestellt und auf ihre Bindung an das S100A12 Hexamer getestet. Zusätzlich wurden Kontrollpeptide genutzt mit den jeweils gleichen Aminosäuren jedoch in randomisierter Reihenfolge (siehe Material: *Synthetisierte Peptide*).

Für den Peptid-ELISA wurden 10 pmol Streptavidin pro Vertiefung immobilisiert. Streptavidin wurde dafür in destilliertem Wasser verdünnt (100 µl pro Vertiefung). Nachdem über Nacht bei 37 °C das destillierte Wasser verdunstet war, konnten die ELISA Vertiefungen am nächsten Tag geblockt werden. Als Blockpuffer wurde 2% BSA in PBST (2% BSA/ PBST) für 2 h bei Raumtemperatur in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurden die Vertiefungen 3x mit je 200 µl 0,05 % PBST im Platewasher gewaschen. Im nächsten Schritt wurden je 400 pmol der Peptide 4 und 10 und der jeweiligen Kontrollpeptide hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen im Platewasher erneut gewaschen. Anschließend wurden 3,4 pmol pro Vertiefung Hexamer in 2 % BSA/PBST hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am dritten Versuchstag erfolgte nach einem Waschvorgang im Platewasher die Detektion mit einem anti-S100A12-Antikörper (Stocklösung: 0,382 mg/ml) in einer 1:1000 Verdünnung in 2 % BSA/PBST (100 µl pro Vertiefung). Nach zwei-stündiger Inkubation bei Raumluft wurde zur Detektion der gebundenen anti-S100A12-Antikörper ein anti-Ratte-HRP-konjugierter-Antikörper (Stocklösung: 1 mg/ml) in einer 1:500 Verdünnung in 2% BSA/ PBST (100 µl pro Vertiefung) verwendet. Dieser zweite Detektionsantikörper wurde ebenfalls für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der ELISA wurde abschließend, wie in vorangegangenen ELISA bereits beschrieben, mit 100 µl OPD pro Vertiefung entwickelt und mithilfe des ELISA-Readers ausgewertet.

3.2.9. Konzentrationsabhängige Bindung der Peptide an das Hexamer

Die biotinylierten Peptide 4 und 10 wurden im Folgenden auf ihre Spezifität an das S100A12 Hexamer im Vergleich zu dem Tetramer getestet. Um die Bindungsspezifität zu testen, wurde die ELISA-Platte zunächst mit 10 pmol

Streptavidin über Nacht in destilliertem Wasser bei 37 °C immobilisiert (100 µl pro Vertiefung). Nachdem über Nacht das destillierte Wasser vollständig verdunstet war, konnten die Vertiefungen mit 2 % BSA/PBST für 2 h bei Raumtemperatur geblockt werden. Nach einem Waschvorgang im Platewasher wurden die Peptide 4 und 10 hinzugegeben. Hierbei wurden 200 pmol Peptide pro Vertiefung in PBST verdünnt und jeweils 100 µl pro Vertiefung hinzugegeben. Die Peptide wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift im Platewasher wurde Hexamer und Tetramer hinzugegeben. Das S100A12 Hexamer wurde in sechs Verdünnungsschritten von 3,4 pmol bis 0,001 pmol pro Vertiefung in 2 % BSA/PBST verdünnt (jeweils 1:5 Verdünnungen ausgehend von 3,4 pmol). Das S100A12 Tetramer wurde in 6 Verdünnungsschritten von 5,1 pmol bis 0,0016 pmol pro Vertiefung in 2 % BSA/PBST verdünnt (jeweils 1:5 Verdünnungen ausgehend von 5,1 pmol). Die S100A12 Proteine wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Konzentrationen wurden wie in vorangegangenen ELISAs an die jeweiligen S100A12 Monomeruntereinheiten angepasst (siehe 3.2.4. Capture ELISA). Pro Vertiefung wurden jeweils 100 µl des jeweiligen Ansatzes pipettiert. Am nächsten Versuchstag wurden die ELISA Vertiefungen mit 0,05 % PBST im Platewasher gewaschen. Die gebundenen S100A12 Proteine wurden schließlich mit einem anti-S100A12-Antikörper in 2 % BSA/PBST (1:1000-Verdünnung einer 0,392 mg/ml Antikörper-Lösung) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der anti-S100A12-Antikörper mit einem anti-Ratte-HRP-konjugierte-Antikörper in 2 % BSA/PBST (1:500 Verdünnung einer 1 mg/ml Antikörper-Lösung) für 2 h bei Raumtemperatur detektiert. Die Visualisierung erfolgte wie in vorherigen ELISAs mittels OPD. Die Auswertung der Farbreaktion wurde mit einem ELISA-Reader durchgeführt.

3.2.10. Peptid ELISA mit Tetramerüberschuss

In diesem ELISA wurde getestet welche S100A12 Tetramerkonzentration ein vergleichbares Hexamersignal erreicht. Analog zu der Beschreibung des bereits beschriebenen Peptid ELISAs (Kapitel 3.2.10. Peptid ELISA mit Tetramerüberschuss) wurde Streptavidin immobilisiert und Peptid 10 hinzugegeben. Nach einem Waschschrift wurden das Hexamer und das

Tetramer hinzugegeben. Je 100 µl Hexamer (0,68 pmol) in 2 % BSA/PBST wurden in die Vertiefung gegeben. Das Tetramer wurde im 5-, 25- und 125-fachen molaren Überschuss im Vergleich zum Hexamer (0,68 pmol) eingesetzt (entspricht 5,1 pmol, 25,5 pmol und 127,5 pmol). Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Versuchstag wurden die Vertiefungen mit 0,05 % PBST im Platewasher gewaschen. Gebundene Hexamere und Tetramere wurden mit 100 µl anti-S100A12-Antikörper (0,392 mg/ml) in einer 1:1000 Verdünnung in 2 % BSA/PBST detektiert. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden gebundene anti-S100A12-Antikörper mit 100 µl anti-Ratte-HRP-konjugierte-Antikörpern (2 µg/ml) in 2 % BSA/PBST detektiert. Die Entwicklung erfolgte mit OPD analog zu den vorangegangenen ELISA (Kapitel 3.2.4. Capture ELISA).

3.2.11. scFv-Fc-Konstrukt Produktion

Die selektierten scFv-Fragmente (scFv) 41 und 42 wurden als scFv-Fc-Konstrukt kloniert. Die scFv-Fc-Konstrukt Produktion verlief in verschiedenen Schritten ab: zuerst musste das in der scFv kodierende DNA-Sequenz enthaltene Stop-Codon entfernt werden. Im zweiten Schritt wurden die veränderten Sequenzen in einen Vektor integriert, der die Information für das vollständige scFv-Fc-Konstrukt besitzt. Anschließend wurden die Vektoren in Zellen transformiert, um das scFv-Fc-Konstrukt zu produzieren. Für die Mutation des Plasmids wurde auf die DNA-Präparation von der scFv Sequenzierung zurückgegriffen (siehe 3.2.7. Sequenzierung).

Die Mutierung des Stopcodons UAG (sog. Amber-Stopcodon mit die Basenabfolge CAG) wurde mit Hilfe des Quik-Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Die Basenfolge CAG ist codierend für die Aminosäure Glutamin. Als Primer wurden „forward“- und „reverse“-Primer verwendet (siehe Material: Primer mit Sequenzen). Entsprechend den Herstellerangaben wurden die forward- und reverse-Primer, die Plasmid-DNA der scFvs mit dem PCR-Enzym-Gemisch (Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix) und Nuklease-freies Wasser vermischt. Anschließend wurden die PCR-Zyklen wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]
Zyklus 1: Initiale Denaturierung	98	30
Zyklus 2-26: Amplifikationszyklen:		
- Denaturierung	98	10
- Primerhybridisierung	50-72	10-30
- Amplifikation	72	20-30
Zyklus 27: Finaler Schritt	72	120
Zyklus 28: Ende	4-10	

Nach Beenden der PCR wurden das PCR Produkt, zusammen mit dem 2x KLD Reaktionspuffer und dem 2x KLD Enzym-Mix (Kinase, Ligase, DpnI) mit Nuklease-freiem Wasser vermischt. Parallel wurde eine Charge NEB 5-alpha kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes aus PCR-Produkt und Enzym-/Puffer-Mix zu den aufgetauten *E. coli* gegeben, vorsichtig 4-5x invertiert und 30 min auf Eis gelagert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 42 °C folgte erneut die Lagerung auf Eis für 5 min. Im nächsten Schritt wurden 950 µl des SOC-Medium hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. 50 µl der transformierten *E. coli* wurden auf LB_{AMP}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden pro Konstrukt acht Einzelklone ausgewählt und mit jeweils 4 ml LB_{AMP}-Medium vermischt und über Nacht bei 37 °C, 60 rpm inkubiert. Anschließend wurde eine DNA-Präparation mit Hilfe des DNA-Präparationskits PEQ-GOLD durchgeführt. Die Mutation wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

Die erfolgreich mutierten DNA Sequenzen wurden schließlich amplifiziert. Hierfür wurden die jeweiligen Einzelklone in 4 ml LB_{AMP}-Medium vermischt und über Nacht bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Am nächsten Versuchstag wurden die Übernachtskulturen verwendet, um für jeden Ansatz mehrere DNA-Präparationen durchzuführen. Die DNA-Präparationen wurden mit Hilfe des

PEQ-GOLD Kits durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde anschließend für eine 3-Stufen PCR verwendet.

Die erste PCR wurde zur Amplifikation des DNA-Abschnittes durchgeführt, welche für die Bindungsstelle des scFv-Fragmentes codiert. Pro scFv-Fc-Konstrukt wurden jeweils 2 PCRs mit einem forward- und einem reverse-Primer vorbereitet:

scFv-Fc-Konstrukt 41 Ansatz:

PCR1= OMHI-427 (forward-Primer) + OMHI-65 (reverse-Primer)

PCR2= OMHI-433 (reverse-Primer) + OMHI-66 (forward-Primer)

scFv-Fc-Konstrukt 42 Ansatz:

PCR1= OMHI-429 (forward-Primer) + OMHI-65 (reverse-Primer)

PCR2= OMHI-434 (reverse-Primer) + OMHI-66 (forward-Primer)

In jedes PCR-Reaktionsgefäß wurde schließlich 5 µl PCR-Puffer, 5 µl 2 mM dNTP-Solution Mix, 5 µl Primer 1, 5 µl Primer 2, 1 µl Taq-Polymerase sowie 125 ng der jeweiligen DNA vermischt und mit dH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]
Zyklus 1:	95	120
Initiale Denaturierung		
Zyklus 2-35:		
Amplifikationszyklen:		
- Denaturierung	94	60
- Primerhybridisierung	56	60
- Amplifikation	72	120
Zyklus 36:	72	420
Finaler Schritt		
Zyklus 37: Ende	4	

Das PCR Produkt wurde im nächsten Schritt in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde aus 120 ml TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer), 1,8 g Agarose und 7 µl ROTI®GelStain hergestellt. Pro Gel-Tasche wurden 50 µl PCR-Produkt und 10 µl 6xOrange-DNA-Ladepuffer pipettiert. Als Standard wurden 5 µl High-Range- und 5 µl Low-Range-Ladder verwendet. Die Gelelektrophorese wurde für 21 min bei 100 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zur anschließenden DNA-Aufreinigung wurde das GeneJET™ Gel-Extraktionskit verwendet. Entsprechend der Herstellerangaben wurde der Bindungspuffer im gleichen Verhältnis zur Menge an ausgeschnittenem Gel vermischt (1:1 Verhältnis von Milligramm Gel zu Milliliter an Bindungspuffer). Zur Auflösung des Gels wurde der Ansatz bei 55 °C für 10 min im Wasserbad erhitzt. Das aufgelöste Gel wurde anschließend auf die GeneJet-Purifikations-Säule aufgetragen, bei 12.000 xg für eine Minute zentrifugiert, dann für 1 min mit 700 µl Waschpuffer bei 12.000 xg gewaschen und abschließend mit 12.000 xg für 1 min trocken zentrifugiert. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte mit 30 µl angewärmtem, destilliertem Wasser (circa 50 °C) in einem Reaktionsgefäß. Die DNA Konzentration konnte mit Hilfe eines Nanodrops ermittelt werden. Im nächsten Schritt wurde die zweite PCR vorbereitet.

Zur Vorbereitung wurden die DNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen geschnitten. Hierfür wurden die PCR-Reaktionsgefäße erneut mit 5 µl PCR-Puffer, 5 µl dNTP Solution Mix, 5 µl Primer 1 (OMHI 65), 5 µl Primer 2 (OMHI 66), 1 µl Taq-Polymerase und die zwei gewonnen DNA-Fragmente aus der ersten PCR vermischt. Da für die PCR die DNA-Fragmente jeweils äquimolar vorliegen müssen, wurden für den scFv-Fc-Konstrukt 41 Ansatz 125 ng der 700-Basenpaar-Fragmente und 64,43 ng der 360-Basenpaar-Fragmente eingesetzt. Für den scFv-Fc-Konstrukt 42 Ansatz wurde ebenfalls 125 ng der 700-Basenpaar-Fragmente sowie 62,5 ng der 350-Basenpaar-Fragmente eingesetzt. Beide PCR-Ansätze wurden mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die zweite PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]
Zyklus 1: Initiale Denaturierung	95	120
Zyklus 2-35: Amplifikationszyklen:		
- Denaturierung	94	60
- Primerhybridisierung	56	60
- Amplifikation	72	120
Zyklus 36: Finaler Schritt	72	420
Zyklus 37: Ende	4	

Die PCR-Produkte wurden anschließend erneut in der Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJET™ Gel-Extraktionskit aufgereinigt. Die Durchführung wurde entsprechend der vorherigen Elektrophorese durchgeführt. Die gewonnene Konzentration der aufgereinigten DNA wurde anschließend erneut im Nanodrop gemessen.

Die DNA wurde im Anschluss mit den Restriktionsenzymen Nco1 und Not1 geschnitten. Hierfür werden pro Ansatz 20 µl DNA-Fragmente (DNA-Konzentration zwischen 72ng/µl bis 145 ng/µl) mit 2,5 µl 10x CutSmart® Puffer, 0,5 µl destilliertem Wasser und je 1 µl der Restriktionsenzyme Nco1 und Not1 vermischt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das DNA-Enzym Gemisch mit je 5 µl Ladepuffer versetzt und in die Gelelektrophorese gegeben. Als Standard wurde erneut ein Low-Range- und ein High-Range-Marker verwendet. Nach einer Laufzeit von 20 min bei 100 Volt wurde die Gelelektrophorese gestoppt und das Bandenmuster ausgewertet. Die 750 basenpaargroße Bande wurde anschließend ausgeschnitten und mit dem GeneJET™ Gel-Extraktionskit aufgereinigt. Die gewonnene DNA-Konzentration wurde im Nanodrop ermittelt. Im nächsten Schritt wurden die ausgeschnittenen DNA-Fragmente mit dem Vektor ligiert. Als Vektor wurde der pCMX2.5-mlgG2c-Fc-XP-Vektor (siehe 7.2. Plasmidkarte eines pCMX2.5-mlgG2c-Fc-XP)

verwendet. Dieser codiert für die Fc-Region eines IgG2c-Antikörpers einer Maus. Für die Ligase wurden 0,8 µl Vektor-DNA mit 10 µl Ligase-Pufferlösung, 1 µl Ligase und die geschnittenen scFv-Fc-Konstrukt-Fragmente (3,2 µl scFv-Fc-Konstrukt 41 Fragment, 2,5 µl scFv-Fc-Konstrukt 42 Fragment) vermischt. Das Verhältnis von scFv-Fc-Konstrukt-Fragment zu Vektor betrug 3:1. Mit destilliertem Wasser wurden die Ansätze auf 20 µl aufgefüllt. Die Inkubationszeit für die Ligation betrug 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die ligierten Plasmide in *E. coli* transformiert. Die Transformation wurde analog zu der bereits beschriebenen Transformation durchgeführt mit dem Unterschied, dass pro Ansatz 20 µl Plasmid-Lösung mit 200 µl *E. coli* Kultur vermischt wurden und nach der abwechselnden Inkubation auf Eis und 42 °C jeweils 950 µl SOC-Medium hinzugegeben wurde.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Kolonie-PCR zur Kontrolle der ligierten Plasmide. Hierfür wurden für die Ansätze der scFv-Fc-Konstrukte jeweils mehrere Einzelklone gepickt und in einen PCR-Ansatz vermischt. Die PCR-Ansätze bestanden jeweils aus 115 µl 10xTaq-Puffer, 23 µl Primer 1 (OMHI 67), 23 µl Primer 2 (OMHI 253), 23 µl dNTPs, 23 µl Taq-Polymerase und 943 µl destilliertem Wasser. Das PCR-Programm wurde folgendermaßen durchgeführt:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]
Zyklus 1:	95	300
Initiale Denaturierung		
Zyklus 2-30:		
Amplifikationszyklen:		
- Denaturierung	95	60
- Primerhybridisierung	55	45
- Amplifikation	72	55
Zyklus 31:	72	300
Finaler Schritt		
Zyklus 32: Ende	4	

Die PCR-Produkte wurden in einer Gelelektrophorese analysiert. 10 µl der PCR-Ansätze wurde mit 2 µl Ladepuffer vermischt und in die Gelelektrophorese gegeben. Die Durchführung verlief entsprechend der vorherigen Elektrophorese. Das Bandenmuster wurde anschließend analysiert. Die Einzelklone, die die erwartete Größe und damit ein vollständiges Plasmid mit dem für das scFv-kodierende Teil besaßen, wurden in je 4 ml LB_{AMP}-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 30 rpm amplifiziert. Es folgte die DNA-Präparation aus den amplifizierten Einzelklonen (siehe 3.2.7. Sequenzierung). Die Plasmide wurden anschließend sequenziert und die Sequenz überprüft.

Von den Einzelklonen, welche einen vollständigen Vektor besaßen, wurde im nächsten Schritt eine DNA-Präparation mit dem NucleoBOND PC500 Kit durchgeführt. Die Einzelklone wurden mit je 250 µl LB_{AMP}-Medium gemischt und über Nacht bei 37 °C und 60rpm geschüttelt. Die Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag für 15 min bei 6.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden das Bakterienpellet mit Puffer S1 und RNase A resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde zu der Resuspension nacheinander Buffer S2 und S3 hinzugegeben und vermischt. Anschließend wurde nach Benetzen des Filters sowie der Säule mit Buffer N2, das Lysat aufgetragen und bei 10.000 xg für 15 min zentrifugiert. Danach wurde mit 32 ml Buffer N3 die Säule mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert und gewaschen. Die Elution erfolgte anschließend mit 15 ml Buffer N5 in der Zentrifuge (10.000 xg, 15 min). Die eluierte DNA wurde im nächsten Schritt gefällt. Dazu wurde Isopropanol gegeben und bei 10.000 xg für 50 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 70 % Ethanol zum Pellet hinzugegeben und resuspendiert. Die Resuspension wurde bei 10.000 xg für 20 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Ethanol steril entnommen und das Röhrchen bei Raumtemperatur für 10-20 min getrocknet. Das gewonnene DNA-Pellet wurde mit 400 µl dH₂O bei 4 °C über Nacht aufgelöst. Die DNA-Konzentration wurde abschließend im Nanodrop gemessen.

Im letzten Abschnitt der scFv-Fc-Konstrukt Produktion wurden die DNA-Plasmide in embryonale Zellen transformiert und die produzierten scFv-Fc-Konstrukte schließlich geerntet und aufgereinigt. Zur Vorbereitung wurden auf Zellkulturplatten je 2,5 bis 5⁶ HEK-Zellen in DMEM-ITS Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag

folgte die DNA-Transfektion. Hierfür wurde pro Ansatz 1 ml aufgewärmtes ITS-Medium mit 50 µl PEI (Polyethylenimin) und 5 µl der jeweiligen DNA vermischt. Das Gemisch wurde anschließend auf die Zellen geträufelt und über Nacht bei 37 °C gelagert. Als Kontrolle wurde GFP-M420 mit 50 µl PEI vermischt und auf eine Platte ausgesäter Zellen hinzugegeben. Am nächsten Versuchstag wurde von den Zellkulturplatten das Medium entnommen, einmal mit 10 ml PBS vorsichtig gespült und durch je 8 ml frisches ITS-Medium ersetzt. Die Zellkulturplatten wurden über Nacht wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und bei -80°C gelagert. Es wurde ein weiteres Mal frisches ITS-Medium hinzugegeben und am nächsten Tag abgenommen. Die Überstände wurden für 10 min bei 2.000 xg zentrifugiert und die gewonnenen Überstände anschließend erneut abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die im Überstand enthaltenen Antikörper wurden auf Ihre Bindung getestet (siehe 3.2.12. Bindung der scFv-Fc-Konstrukte an S100A12 Hexamer). Anschließend erfolgte die weitere Aufreinigung der produzierten scFv-Fc-Konstrukte. Hierfür wurde das Affi-Gel[®] Immunoaffinity Kit verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurde der Zellkulturüberstand mit 1:20 mit dem Protein A Bindepuffer (20x) vermischt und steril filtriert. Die gefilterte Lösung wurde 1 h auf Eis inkubiert und anschließend erneut gefiltert. Als nächstes wurde eine HiTrap Protein A HP Säule über Nacht mit den gefilterten Überständen beladen. Am Folgetag wurden die gebundenen Antikörper eluiert und die Fraktionen in Reaktionsgefäßen mit 250 µl Protein-A-Neutralisationspuffer aufgefangen. Die Eluate mit den scFv-Fc-Konstrukten wurden mittels Zentrifugalkonzentratoren in PBS umgepuffert und abschließend die Konzentration im Nanodrop bestimmt. Die produzierten und aufgereinigten scFv-Fc-Konstrukte konnten schließlich in weiteren Tests auf ihre Hexamerspezifität getestet werden.

3.2.12. Bindung der scFv-Fc-Konstrukte an S100A12 Hexamer

Die produzierten scFv-Fc-Konstrukte wurden vor der Aufreinigung auf ihre Funktionalität getestet. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit Hexamer und Tetramer immobilisiert. Wie in vorherigen ELISAs wurden 0,08 µg Hexamer und 0,1 µg Tetramer pro Vertiefung in PBS immobilisiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte nach einem Waschschrift die Blockung der

Vertiefungen mit 5 % MPBST für 2 h bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die scFv-Fc-Konstrukte in 5 % MPBST hinzugegeben, 2 h inkubiert und erneut gewaschen. Gebundene scFv-Fc-Konstrukte wurden mit einem anti-Maus-HRP-konjugierter Antikörper (1:2000-Verdünnung einer 0,4 mg/ml Stocklösung) detektiert. Die Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.13. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42

Um die Hexamerspezifität des ELISA-Aufbaus noch weiter zu optimieren wurde Peptid 10 mit den selektierten scFv-Fc-Konstrukten 41 und 42 kombiniert. Die Immobilisierung von Streptavidin und Peptid erfolgte analog zum Peptid ELISA (Kapitel 3.2.10. Peptid ELISA mit Tetramerüberschuss) mit der Ausnahme, dass 4 pmol pro Vertiefung Streptavidin und 18 pmol biotinyliertes Peptid verwendet wurde. Anschließend wurden 3,4 pmol Hexamer, 5,1 pmol Tetramer und 10 pmol Dimer in 2 % BSA/PBST oder PBS hinzugefügt und 1 h bei 37 °C (alternativ 2 h bei Raumtemperatur) inkubiert. Die Konzentrationen an Hexamer, Tetramer und Dimer orientiert sich nach der Anzahl der S100A12 Monomere der jeweiligen Peptide. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 60-100 ng pro Vertiefung (entsprechen 0,5-1 pmol pro Vertiefung) scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in 2 % BSA/PBST oder PBS hinzugegeben. Die scFv-Fc-Konstrukte wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die gebundenen scFv-Fc-Konstrukte wurden nach einem weiteren Waschschrift im Platemasher mit anti-Maus-HRP-konjugiertem Antikörper (1:1000 Verdünnung einer 15 µg/ml Lösung) detektiert. Im letzten Schritt folgte nach einem weiteren Waschvorgang die Visualisierung mit OPD entsprechend der Beschreibung in vorangegangenen ELISAs.

3.2.14. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss

Entsprechend der Beschreibung des vorangegangenen ELISAs (Kapitel 3.2.13. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42) wurde die Immobilisation von Streptavidin und des Peptides durchgeführt. Anschließend wurden 0,435 pmol pro Vertiefung Hexamer mit 1,02 pmol, 5,1 pmol, 25,5 pmol und 127,5 pmol Tetramer in 2 % BSA/PBST verglichen (100 µl pro Vertiefung). Die

Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C. Die gebundenen S100A12 Proteine wurden anschließend mit den 0,6 µg/ml scFv-Fc-Konstrukt 41 und 1,1 µg/ml scFv-Fc-Konstrukt 42 in 2 % BSA/PBST detektiert (100 µl pro Vertiefung). Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37 °C und einem Waschschrift erfolgte die Detektion mit anti-Maus-HRP-konjugiert Antikörpern. Die Auswertung des ELISA wurde entsprechend der vorangegangenen ELISAs durchgeführt.

3.2.15. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in gespiktem Plasma

Entsprechend der Beschreibung des vorangegangenen ELISAs (Kapitel 3.2.14. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss) wurde die Immobilisierung von Streptavidin und des Peptides durchgeführt. Anschließend wurden 3,4 pmol Hexamer, 5,1 pmol Tetramer und 10pmol Dimer pro Vertiefung vermischt mit dem Standardpuffer 2 % BSA/PBST oder PBS und einer 10 % sowie 5 % Plasmaverdünnung. Die S100A12 Verdünnungen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der gebundenen S100A12 Proteine mit den scFv-Fc-Konstrukten 41 und 42 entsprechend der Beschreibung in vorangegangenen ELISAs (Kapitel 3.2.15. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in gespiktem Plasma). Die weitere Detektion und Auswertung wurde ebenfalls analog zum vorangegangenen ELISA durchgeführt (Kapitel 3.2.14. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss).

3.2.16. Peptid 4 mit crosslinked Hexamer versus „Wildtyp“ Hexamer

Zur Testung von crosslinked Hexamer im Vergleich zu „Wildtyp“ Hexamer ohne Crosslinker wurde zunächst 10pmol Streptavidin pro ELISA-Vertiefung immobilisiert. Entsprechend den Beschreibungen des vorangegangenen ELISAs (3.2.15. Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in gespiktem Plasma) wurde die ELISA-Platte bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Versuchstag wurde 2% BSA/PBST zum Blocken auf die ELISA-Platte hinzugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Nach einem Waschvorgang im Platewasher mit PBST wurden je 200pmol Peptid 4 hinzugegeben und für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem anschließenden Waschvorgang wurde jeweils 3,4pmol crosslinked bzw. „Wildtyp“ Hexamer pro Ansatz hinzugegeben. Für den crosslinked Hexamer

Ansatz wurde 2 % BSA/PBST verwendet. Für den „Wildtyp“ Hexamer Ansatz wurde HEPES gepufferte Saline (HBS) verwendet, aufgrund der höheren Calciumkonzentration. Die anschließende Inkubation wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Der folgende Waschschrift wurde mit BSA/PBST bzw. HBS Puffer durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Gabe von 100 µl anti-S100A12-Antikörper (0,392 mg/ml) in einer 1:1000 Verdünnung in 2 % BSA/PBST bzw. in HBS Puffer zur Detektion gebundenem S100A12 Hexamer. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden gebundene anti-S100A12-Antikörper mit 100 µl anti-Ratte-HRP-konjugierte-Antikörpern (2 µg/ml) in 2 % BSA/PBST bzw. HBS detektiert. Wie in vorangegangenen ELISAs beschrieben erfolgte die Auswertung mittels OPD und H₂SO₄.

4. Ergebnisse

4.1.1. Capture-ELISA

Nach Beendigung der Affinitätsselektion mit den Phagenbibliotheken (Peptid-präsentierenden Phagen: Ph.D.-7 Phage Display Peptide (lineare sieben Aminosäure Sequenz), Ph.D.-C7C Phage Display Peptide (zyklische sieben Aminosäure Sequenz), Ph.D.-12 Phage Display Peptide (lineare 12 Aminosäure Sequenz)) (scFv-präsentierenden Phagen: Tomlinson J, Tomlinson I, HuScL-2, HuScL-3) wurden insgesamt 17 Phagen mit Peptid-präsentierenden Phagen und 48 scFv-präsentierenden Phagen isoliert und auf die Bindung überprüft. Von 17 Peptid-präsentierenden Phagen zeigten 17 Phagen (100%) eine spezifische Reaktivität mit dem S100A12 Hexamer im Capture ELISA. Fünf Peptid-präsentierende Phagen bestätigten die Hexamerspezifität im weiteren Verlauf (29,4%). Von 48 scFv-präsentierenden Phagen zeigten 48 Phagen (100%) eine spezifische Reaktivität mit dem S100A12 Hexamer. Zwei scFv-präsentierende Phagen bestätigten die Hexamerspezifität im weiteren Verlauf (4,1%).

Von der Affinitätsselektion der Phagen mit Expression von linearen Heptamer-Peptiden (lineare sieben Aminosäure-Sequenz) zeigte sich im Capture-ELISA ein Binder mit besserer Bindung an das S100A12 Hexamer im Vergleich zum S100A12 Tetramer. Aus der Phagenbibliothek mit präsentiertem, zyklischem Heptamer (zyklische c7c Aminosäure-Sequenz) konnte kein Binder isoliert werden, der spezifisch an das Hexamer bindet. Aus der Phagenbibliothek mit präsentiertem Duodecamer (lineare 12 Aminosäure-Sequenz) konnten 17 Klone mit spezifischer Hexamerbindung isoliert werden. Aus dem Biopanning der vier Phagenbibliotheken mit präsentierten scFvs konnten aus der HuScL-2-Phagenbibliothek 39 Klone, aus der Tomlinson-I-Phagenbibliothek ein Klon und aus der Tomlinson-J-Phagenbibliothek 8 Klone mit spezifischer Hexamerbindung isoliert werden (Abbildung 2 und 3).

Die isolierten Klone wurden wie folgt benannt:

Phagenbibliotheken Heptamer: Peptid-Phagenklon 1

Phagenbibliotheken Duodecamer: Peptid-Phagenklone 2 bis 17

HuScI-2 Bibliothek: scFv-Phagenklone 1 bis 39
 Tomlinson I Bibliothek: scFv-Phagenklon 40
 Tomlinson J Bibliothek: scFv-Phagenklone 41 bis 48

Für die weitere Analyse wurden die 17 Phagenklone mit spezifischem Peptid und die 48 Phagenklone mit spezifischem scFv zunächst amplifiziert und anschließend in einem Bestätigungs-ELISA weiter analysiert.

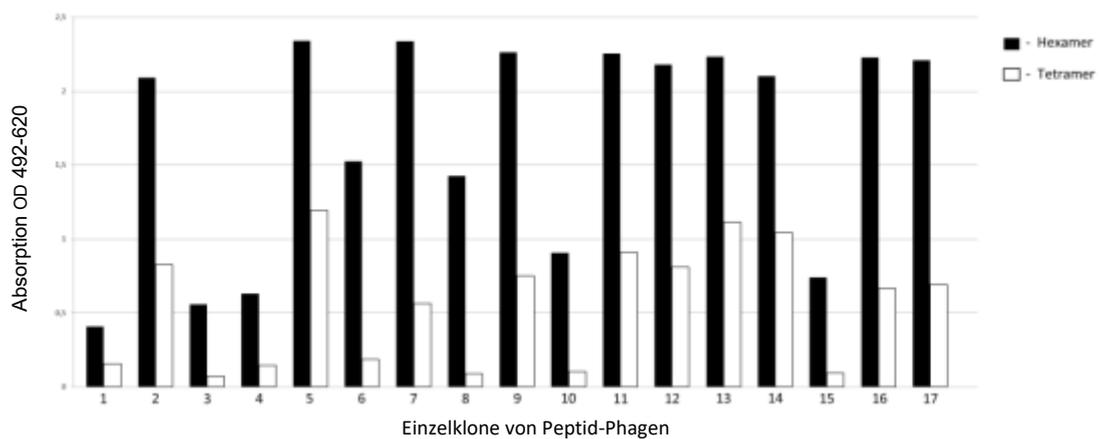


Abbildung 2: Bindung der Peptid-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Capture-ELISA)

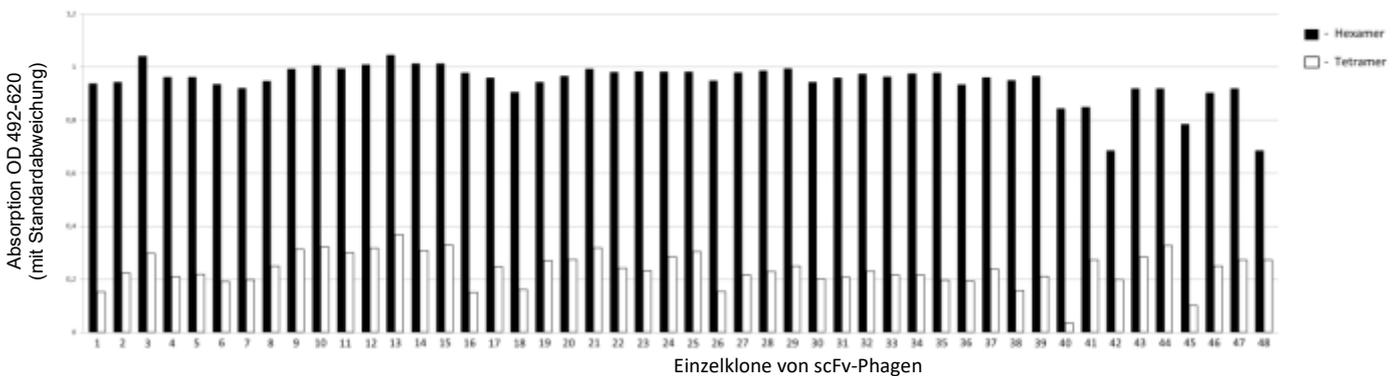


Abbildung 3: Bindung der scFv-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Capture-ELISA)

4.1.2. Bestätigungs-ELISA

Die 17 Phagenklone mit spezifischem Peptid und die 48 Phagenklone mit spezifischem scFv, welche im Capture-ELISA gute Bindungssignale an das Hexamer zeigten, wurden nun in einem Bestätigungs-ELISA erneut getestet.

Die Ergebnisse des Bestätigungs-ELISAs zeigten, dass die selektierten Phagen ein hohes Signal auf immobilisiertem Hexamer aufweisen. Im Vergleich zum Hexamersignal erreichten die Bindungen der Bakteriophagen auf immobilisiertes Tetramer niedrige Level und blieben deutlich unterhalb der Hexamersignale.

Einzelne Phagen, wie beispielsweise scFv-Phage 40 oder Peptid-Phage 8 und 15, zeigten schwächere Hexamerbindungssignale im Vergleich zu den durchschnittlichen Hexamersignalen. (Abbildung 4 und 5)

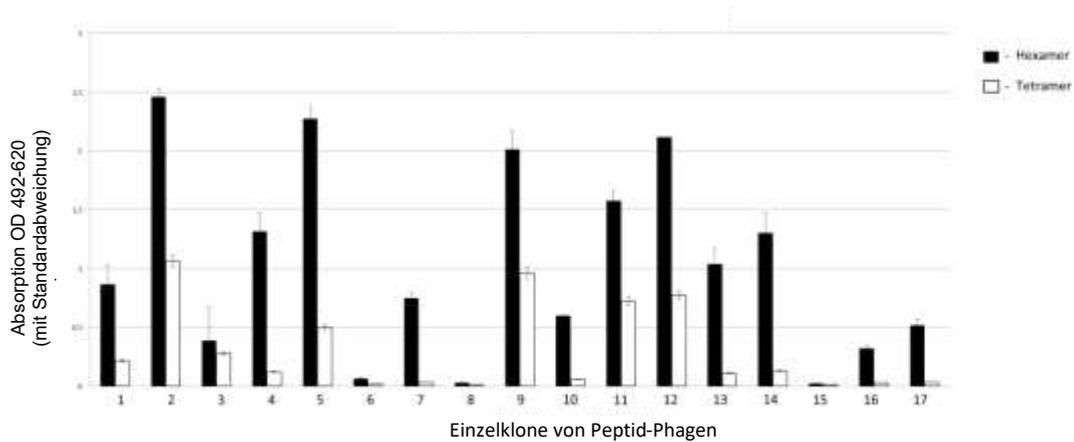


Abbildung 4: Bindung der Peptid-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Bestätigungs-ELISA)

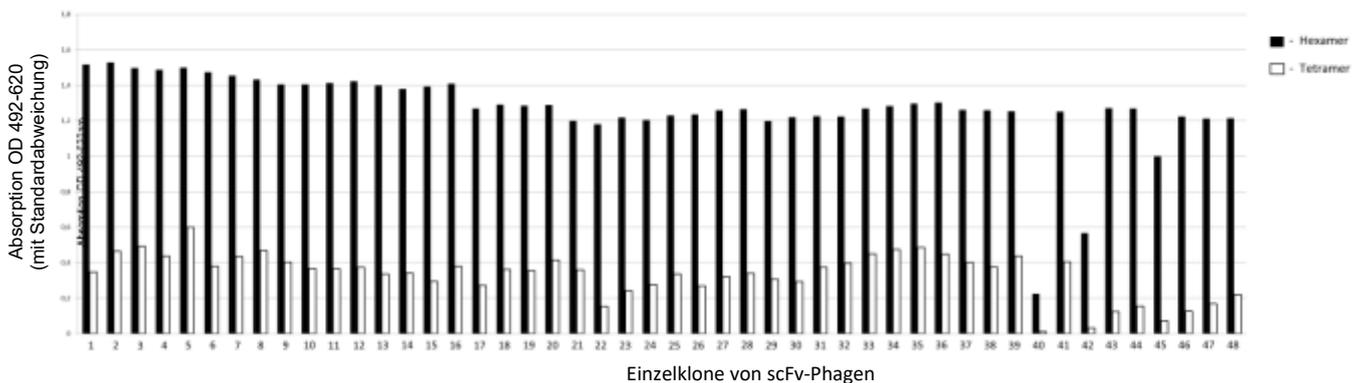


Abbildung 5: Bindung der scFv-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Bestätigungs-ELISA)

4.1.3. Sequenzierung

Für die weitere Analyse wurde das gIII Gen der selektierten Phagen mit den entsprechenden Inserts sequenziert. Die nachfolgenden Tabellen zeigen die

Aminosäuresequenzen der selektierten Peptiden und scFvs. Analysen auf gleiche Aminosäure-Muster der selektierten Sequenzen ergaben keine Ergebnisse.

Selektierte Peptide	Sequenzen und Bibliothek
Peptid 1	Sequenz: WPFYLLH
	Phagen-Bibliothek: Ph.D.-7 Phage Display Peptide
Peptide 2, 5, 7, 9, 11, 13, 14 und 15	Sequenz: IDLTFWWRPLLA
	Phagen-Bibliothek: Ph.D.-12 Phage Display Peptide
Peptide 3 und 4	Sequenz: EGLSWQYMLDLW
	Phagen-Bibliothek: Ph.D.-12 Phage Display Peptide
Peptide 6, 8 und 10	Sequenz: EPMRWTD MVGLF
	Phagen-Bibliothek: Ph.D.-12 Phage Display Peptide
Peptide 12 und 16	Sequenz: ACTVRTSADC
	Phagen-Bibliothek: Ph.D.-c7c Phage Display Peptide
Peptide 17	Sequenz: GNNPLHVHDKR
	Phagen-Bibliothek: Ph.D.-12 Phage Display Peptide

Herstellerangaben der Peptide: JPT Peptide Technologies GmbH,
Volmerstrasse 5, 12489 Berlin, Deutschland

Selektierte scFvs	Sequenzen und Bibliothek
scFv 1-39	<p>Sequenz: MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIHRDGVRTX YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGIGLFDYWGGTTLTVSSGGGG SGGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY HASYLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE EDFATYYCQQSLQNPRTFGQGTKVEIKR</p> <p>Phagen-Bibliothek: HuScI-2</p>
scFv 40	<p>Sequenz: MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSDITSNGAATYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKTNSSFDYWGGTTLTVSSGGGGGSGGGGSG GGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASGLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNATPS TFGQGTKVEIKR</p> <p>Phagen-Bibliothek: Tomlinson I</p>
scFv 41	<p>Sequenz: MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSDIHRDGVRTXYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGIGLFDYWGGTTLTVSSGGGGGSGGGGSGG GGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SYLNWYQQKPGKAPKLLIYHASYLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSLQNP TFGQGTKVEIKR</p> <p>Phagen-Bibliothek: Tomlinson J</p>

scFv 42	Sequenz: MAEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSTIXPRGQSTLYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKSRTRFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSTDIQMTQSPSSL SASVGDRTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYWASLLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQAASPPP TFGQGTKVEIKR
	Phagen-Bibliothek: Tomlinson J
scFv 43, 44,45, 46,47 und 48	keine Sequenzierungsergebnisse

4.1.4. Kompetitions-ELISA

Zunächst wurde als Vorbereitung in einem Hexamer-Phagen ELISA die konzentrationsabhängige Bindung bestimmt, um die Konzentrationen für eine lineare, nicht gesättigte Bindung zu evaluieren. Getestet wurden die Peptid-Phagenklone 4 und 10 sowie die scFv-Phagenklone 41 und 42, da diese eine spezifischere Bindung an das S100A12 Hexamer zeigten verglichen mit den restlichen, selektierten Liganden. Abbildung 6 zeigt die Bindungskurve für verschiedene Konzentration der Phagenklone mit spezifischem Peptid. Die optimale Konzentration zeigte sich für Phagenklon 4 bei einer Konzentration von $1,672 \times 10^9$ Phagen pro Vertiefung und für Phagenklon 10 bei einer Konzentration von $4,569 \times 10^9$ Phagen pro Vertiefung. Abbildung 7 zeigt die Bindungskurve für verschiedene Konzentration der Phagenklone mit spezifischem scFv. Die optimale Konzentration zeigte sich für Phagenklon 41 bei einer Konzentration von $8,192 \times 10^9$ Phagen pro Vertiefung und für Phagenklon 42 bei einer Konzentration von $2,658 \times 10^{11}$ Phagen pro Vertiefung.

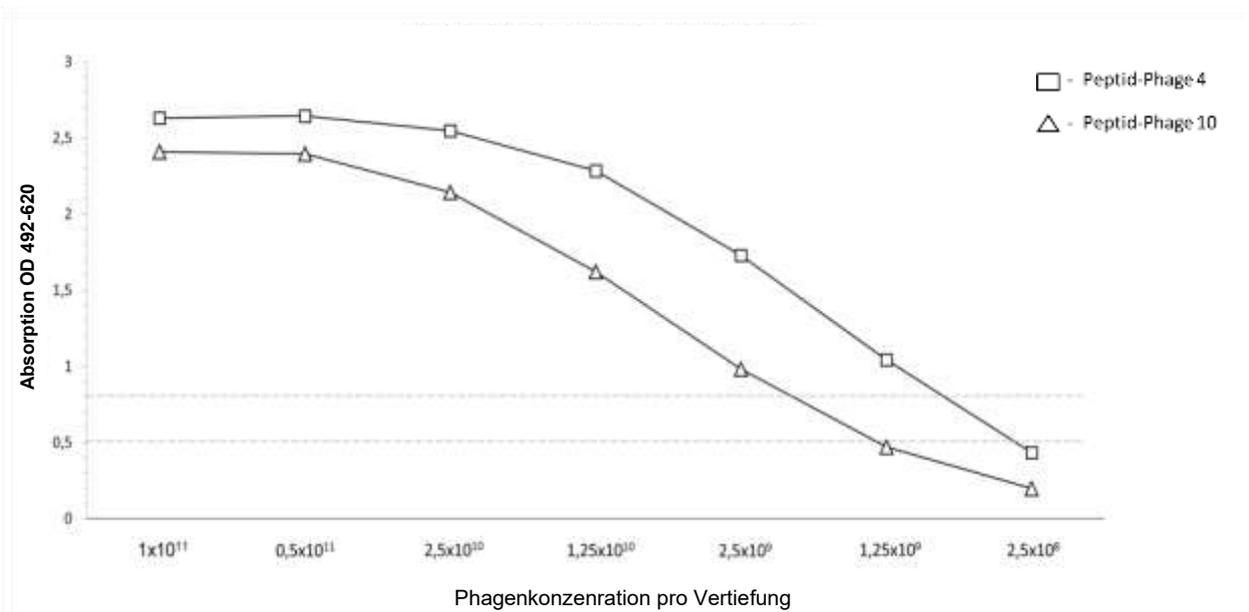


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Bindungskurve der Peptid-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer

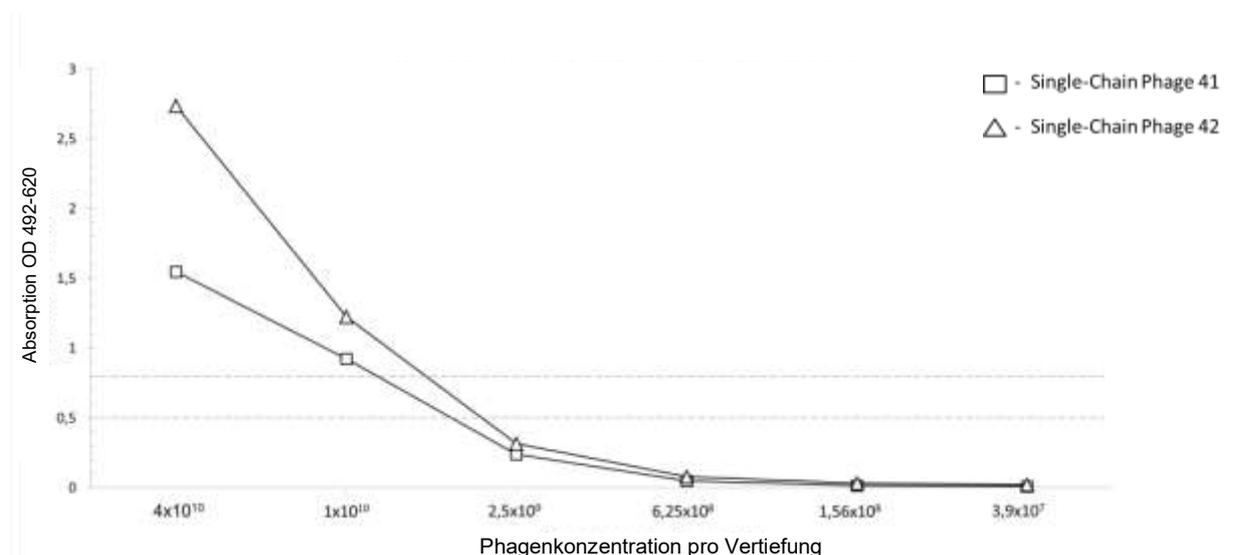


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Bindungskurve der scFv-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer

In dem Kompetitions-ELISA wurden die Bindungssignale der Peptid- oder scFv-exprimierenden Phagen auf immobilisiertes Hexamer mit in Medium befindlichem Tetramer und Dimer kompetitiert. Entsprechend der Bindungskurven der Peptid- oder scFv-exprimierenden Phagen (Abbildung 6 und 7) wurden die optimalen Konzentrationen für einen linearen Bindungsbereich gewählt. Peptid- oder scFv-exprimierenden Phagen wurden

mit Dimer oder Tetramer in Verdünnungsstufen von 8µg pro Vertiefung bis 0,8 ng pro Vertiefung auf das Hexamer gegeben.

Im Peptid-Kompetitions-ELISA erreichten die Peptid-exprimierenden Phagen 4 und 10 auch in Anwesenheit von Dimer und Tetramer annähernd die gleichen Signale wie die verwendete Kontrolle ohne Anwesenheit von Dimer oder Tetramer. Lediglich bei dem 100-fachen Überschuss von Tetramer zeigte sich eine leichte Reduktion der Bindung an das Hexamer (Abbildung 8).

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei der Konkurrenz von scFv-exprimierenden Phagen. Die scFv-exprimierenden Phagen 41 und 42 erreichten bei der Konkurrenz mit Tetramer und Dimer annähernd die Signale wie die verwendeten Kontrollen ohne Konkurrenz. ScFv-exprimierende Phage 41 zeigte eine leichte Signalabschwächung bei einem 100-fachen Überschuss von Dimer und Tetramer. ScFv-exprimierende Phage 42 zeigte bei jeder Konzentration von Dimer und Tetramer eine unveränderte Bindung an das Hexamer (siehe Abbildung 9).

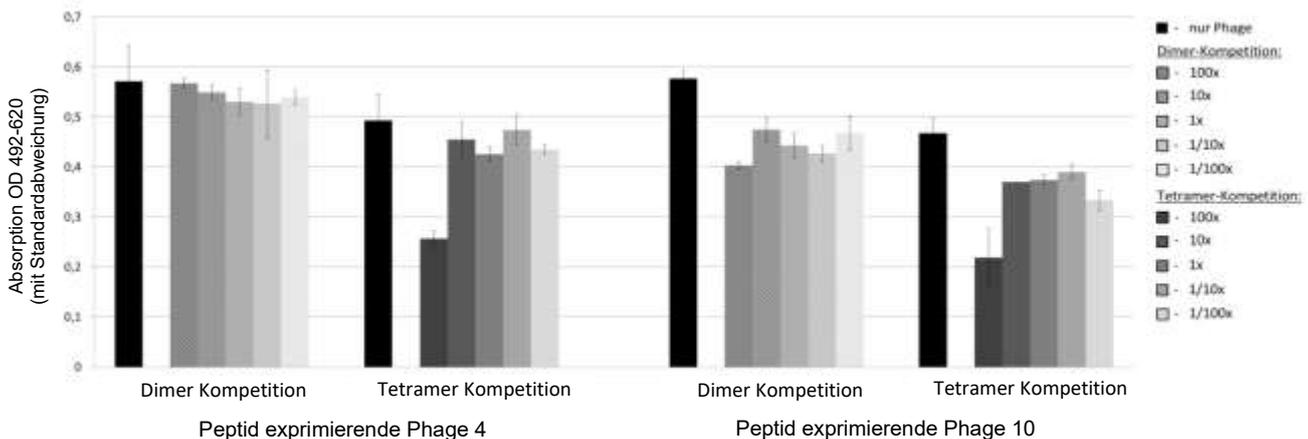


Abbildung 8: Kompetitions-ELISA mit den Peptid-präsentierenden Phagen 4 und 10

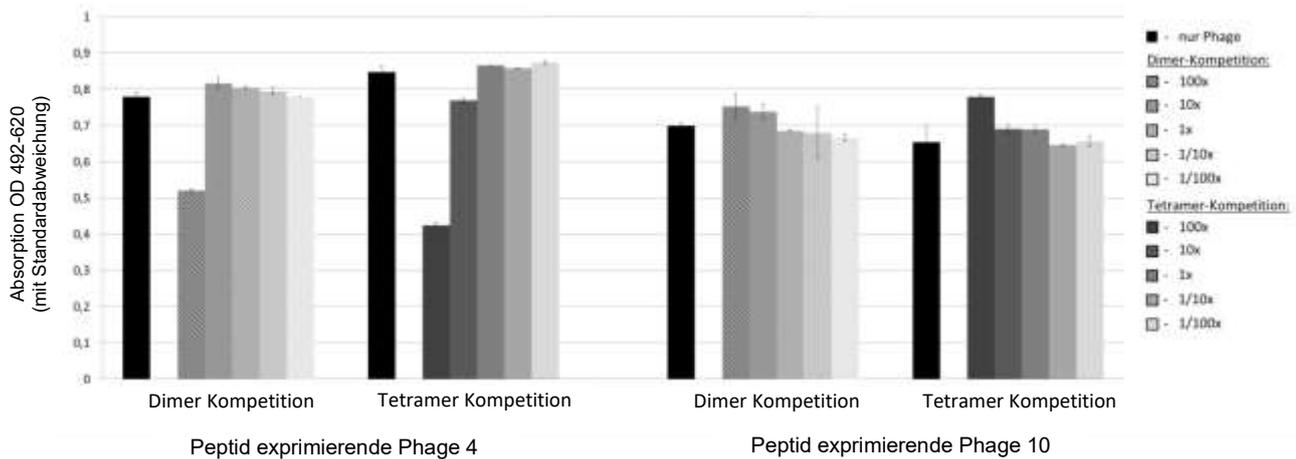


Abbildung 9: Kompetitions-ELISA mit den scFv-präsentierenden Phagen 4 und 10

4.1.5. Bindung von synthetischen Peptiden und Kontrollpeptiden an S100A12

Die biotinylierten Peptide mit der Aminosäuresequenz der Peptide 4 und 10 wurden in einem ELISA auf die Bindung an immobilisiertes Hexamer getestet. Zusätzlich wurden die Kontrollpeptide mit den identischen Aminosäuren jedoch in zufälliger Reihenfolge genutzt.

Die Ergebnisse zeigten ein sehr hohes Bindungssignal von Peptid 4 und 10 an das Hexamer im Vergleich zu den Kontrollpeptiden. Die Kontrolle zeigte ein niedriges Hintergrundsignal (Abbildung 10).

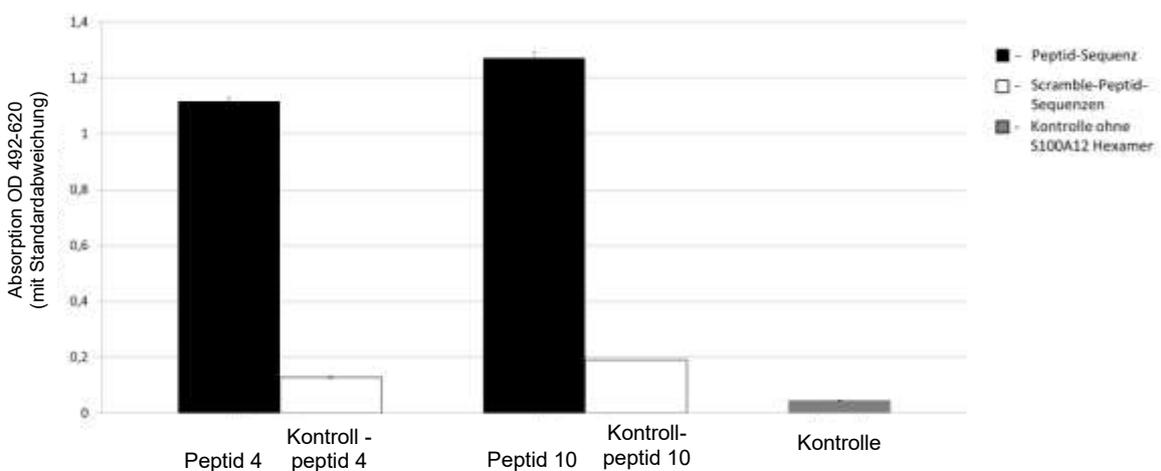


Abbildung 10: Bindung von synthetischen Peptiden an immobilisiertes S100A12 Hexamer

4.1.6. Konzentrationsabhängige Bindung der Peptide an das Hexamer

Um die Bindungseigenschaften der bestellten, biotinylierten Peptide 4 und 10 zu testen, wurde in einem ELISA die Bindung an das Hexamer mit dem Tetramer verglichen. Es zeigten sich deutlich höhere Signale bei der Bindung an das Hexamer im Vergleich zu der Bindung an das Tetramer. Mit steigenden Hexamerkonzentrationen stieg die Signalhöhe an. Das Tetramersignal blieb in jeder Verdünnungsstufe auf sehr niedrigem Niveau (Abbildung 11). Lediglich in der höchsten Konzentration des Tetramers (5,1 pmol pro Vertiefung) von Peptid 10 zeigte sich ein diskret erhöhtes Tetramersignal oberhalb der Kontrolle.

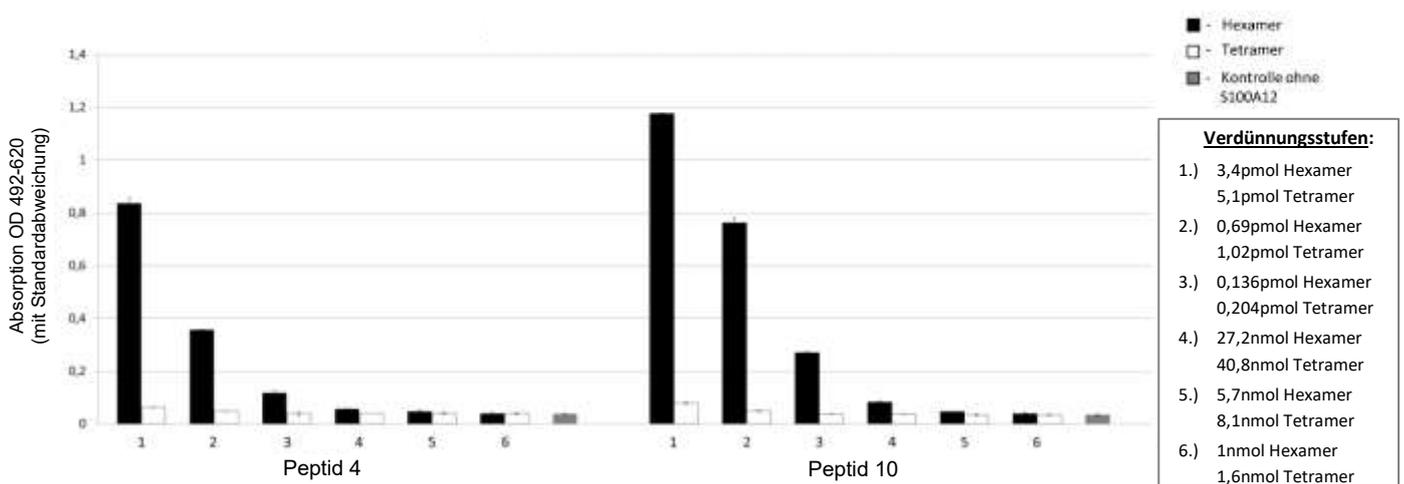


Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Bindung der Peptide an das Hexamer

4.1.7. Peptid-ELISA mit Tetramerüberschuss

Um im nächsten Schritt zu untersuchen, bei welcher Tetramerkonzentration das gleiche Bindungssignal zu einer bestimmten Hexamerkonzentration erreicht wird, wurde ein ELISA mit hohen Tetramerkonzentrationen durchgeführt. Die einfache Hexamerkonzentration wurde hierbei mit der 5-, 25- und 125-fachen Tetramerkonzentration (bezogen auf die S100A12 Monomeruntereinheiten des S100A12 Hexamers und Tetramers) verglichen. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Bindungssignale bei steigender Tetramerkonzentration. Die 125-fache Tetramerkonzentration überstieg die einfache Hexamerkonzentration mit einer $OD_{492-620 \text{ nm}}$ von 0,7.

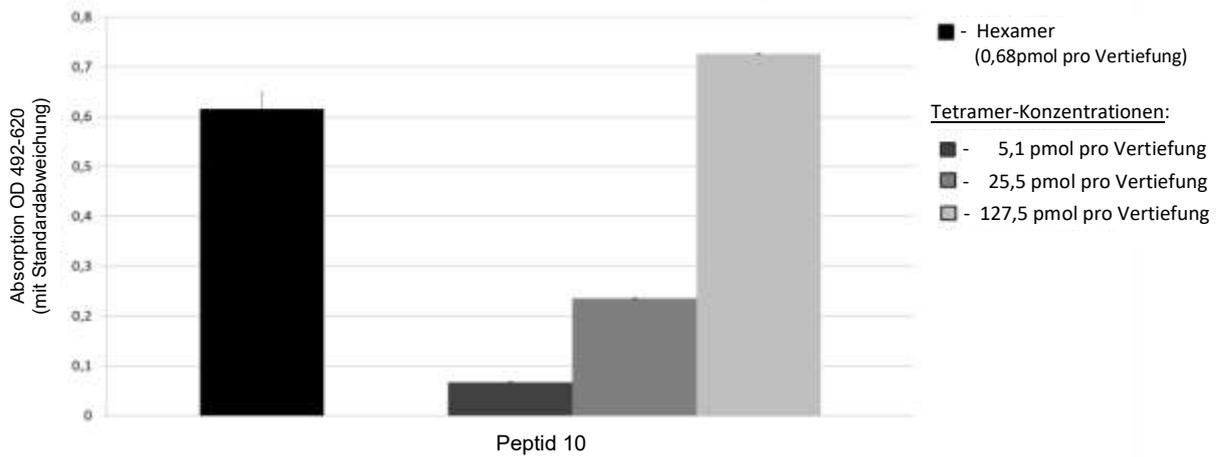


Abbildung 12: Peptid ELISA mit Tetramerüberschuss

4.1.8. scFv-Fc-Konstrukt Produktion

Nachdem die Bindung der produzierten scFv-Fc-Konstrukte an das S100A12 Hexamer in einem ersten Bindungstest bestätigt wurde, wurden die scFv-Fc-Konstrukte aufgereinigt.

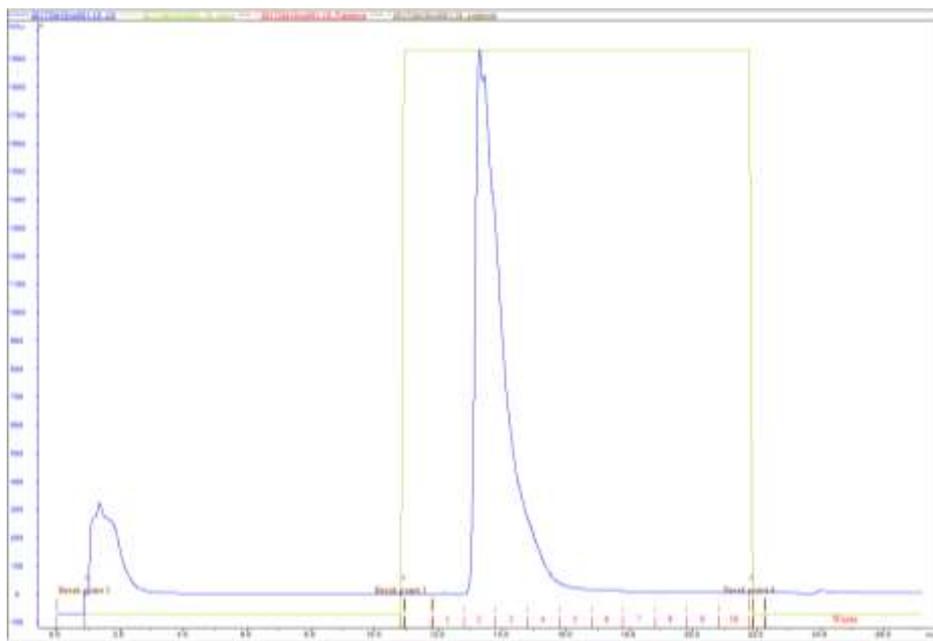


Abbildung 13: Aufreinigung von scFv-Fc-Konstrukt 41 über ÄKTA™

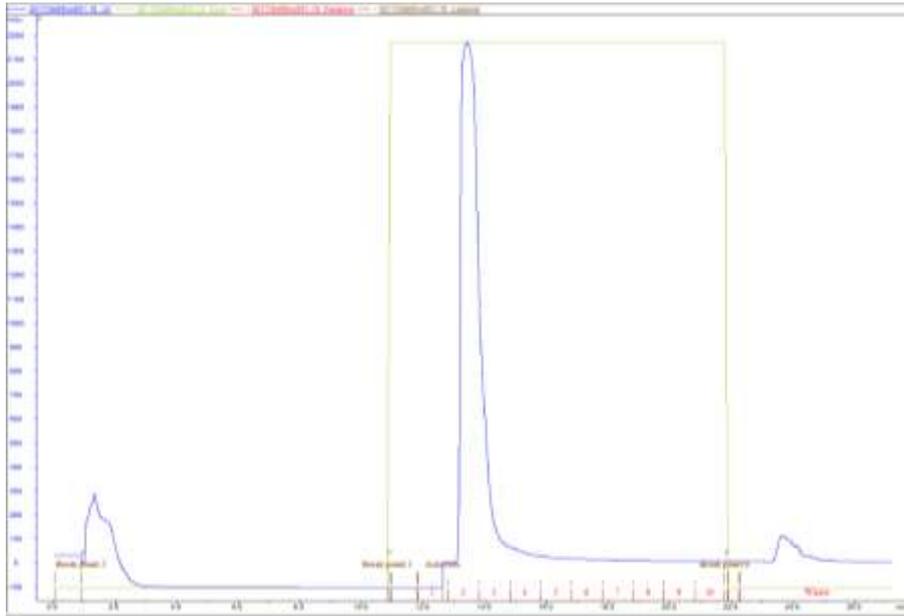


Abbildung 14: Aufreinigung von scFv-Fc-Konstrukt 42 über ÄKTA™

Nach erfolgreicher Aufreinigung konnten folgenden Konzentrationen für die scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 gemessen werden:

scFv-Fc- Konstrukt 41: 4,0 mg/ml

scFv-Fc- Konstrukt 42: 6,3 mg/ml

4.1.9. Bindung der scFv-Fc-Konstrukte an S100A12 Hexamer

Die produzierten scFv-Fc-Konstrukte wurden auf immobilisiertes S100A12 Hexamer und Tetramer gegeben und gebundene Konstrukte anschließend mittels anti-Maus-HRP-konjugierten Antikörpern detektiert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Hexamers und Tetramers wurde zunächst die Spezifität zum Hexamers im Vergleich zum Tetramer getestet. Die Bindungseigenschaften der selektierten Liganden zum Dimer wurden in den folgenden ELISAs getestet.

Ein Bindungs-ELISA der produzierten scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 vor Aufreinigung zeigte ein spezifisches Bindungssignal an immobilisiertes Hexamer. Das Tetramersignal blieb bei der Testung des scFv-Fc-Konstrukt 42 auf dem Niveau der verwendeten Kontrolle ohne S100A12 Protein. Bei dem

scFv-Fc-Konstrukt 41 lag das Tetramersignal leicht oberhalb der Kontrolle. (Abbildung 15)

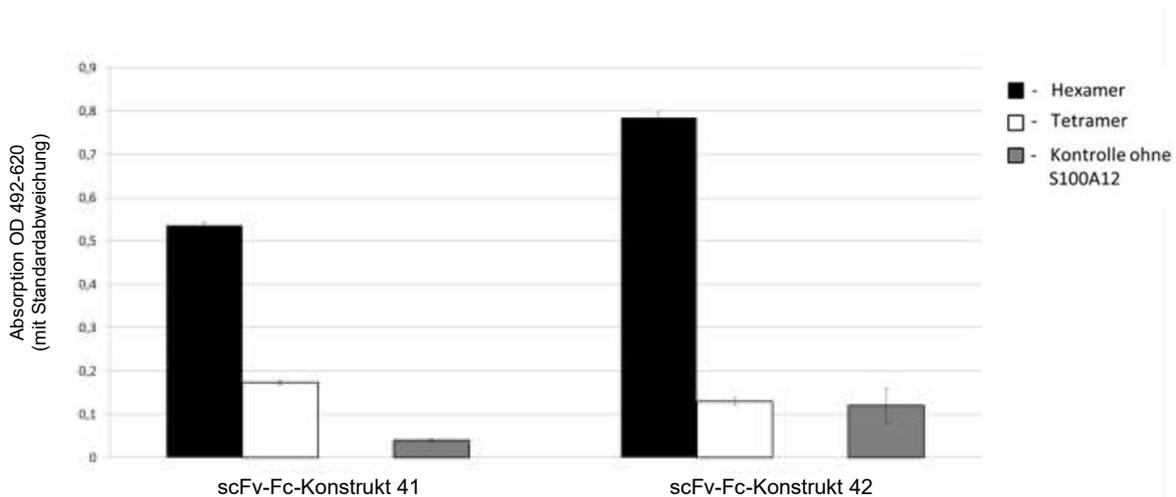


Abbildung 15: Bindung der scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 an S100A12 Hexamer

4.1.10. Sandwich-ELISA mit Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42

Um die Hexamerspezifität weiter zu erhöhen, wurden die Peptide und die scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in einem ELISA kombiniert: auf Streptavidin wurde Peptid 10 immobilisiert, anschließend S100A12 Hexamer, Tetramer und Dimer hinzugegeben und mit den scFv-Fc Konstrukten 41 und 42 detektiert. Der anti-S100A12-Antikörper wurde somit durch die hexamerspezifischen scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 ersetzt.

In diesem Testaufbau zeigten sich deutlich höhere und spezifischere Hexamer Bindungssignale im Vergleich zu den Tetramer- und Dimersignalen. Für das scFv-Fc-Konstrukt 41 entspricht das Hexamersignal dem circa 5,5-fachen Tetramersignal und dem 22-fachen Dimersignal. Für das scFv-Fc-Konstrukt 42 entspricht das Hexamersignal dem circa 4-fachen Tetramersignal und dem 8-fachen Dimersignal. Die Bindungssignale des Tetramers überschritten nicht die $OD_{492-620 \text{ nm}}$ von 0,2 und blieben deutlich unterhalb der Hexamersignale. Die Dimerbindungssignale blieben auf dem Niveau wie die verwendeten Kontrollen ohne S100A12 Protein (Abbildung 16).

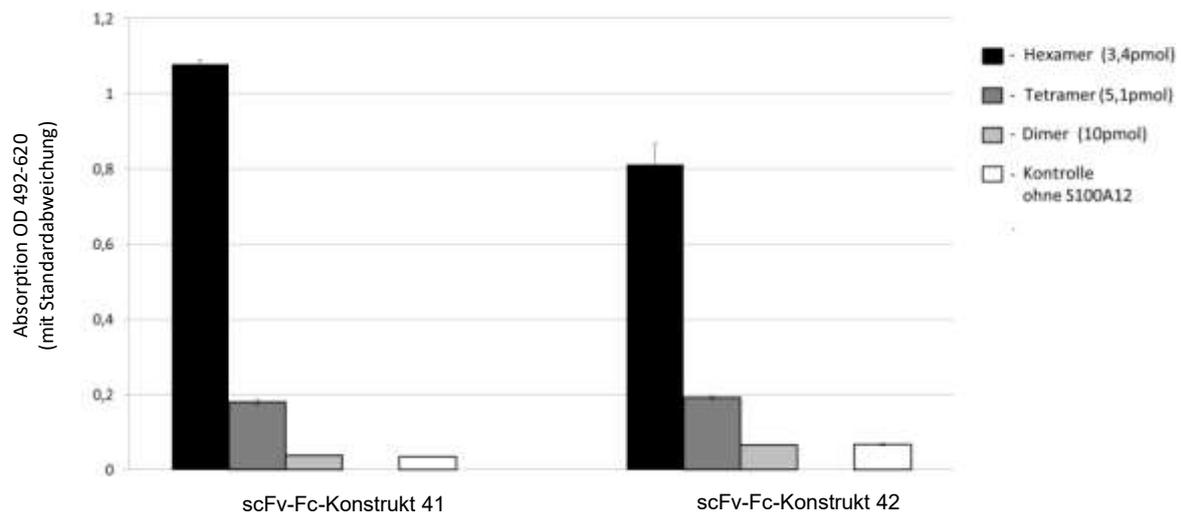


Abbildung 16: Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42

4.1.11. Bindung von Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss

In der Kombination mit Peptid 10 und den scFv-Fc-Konstrukten 41 und 42 wurde ein ELISA mit einem Tetramerüberschuss durchgeführt. Die Hexamerkonzentration wurde mit dem 1-, 5-, 25- und 125-fachen Tetramerüberschuss (bezogen auf die S100A12 Monomer-Untereinheiten von Hexamer und Tetramer) verglichen.

Für das scFv-Fc-Konstrukt 42 zeigte sich in Anwesenheit von Tetramer ein Anstieg der Bindungssignale mit steigenden Konzentrationen. Selbst im 125-fachen Überschuss des Tetramers konnten Bindungssignale von maximal $\frac{3}{4}$ des Hexamersignals erreicht werden.

Für das scFv-Fc-Konstrukt 41 zeigte sich im Tetramerüberschuss ebenfalls ein Anstieg der Bindungssignale mit steigenden Konzentrationen. Die 125-fache Tetramerkonzentration erreichte eine $OD_{492-620 \text{ nm}}$ von circa 0,3 und blieb damit deutlich unterhalb des Hexamersignals von über 0,6. (Abbildung 17)

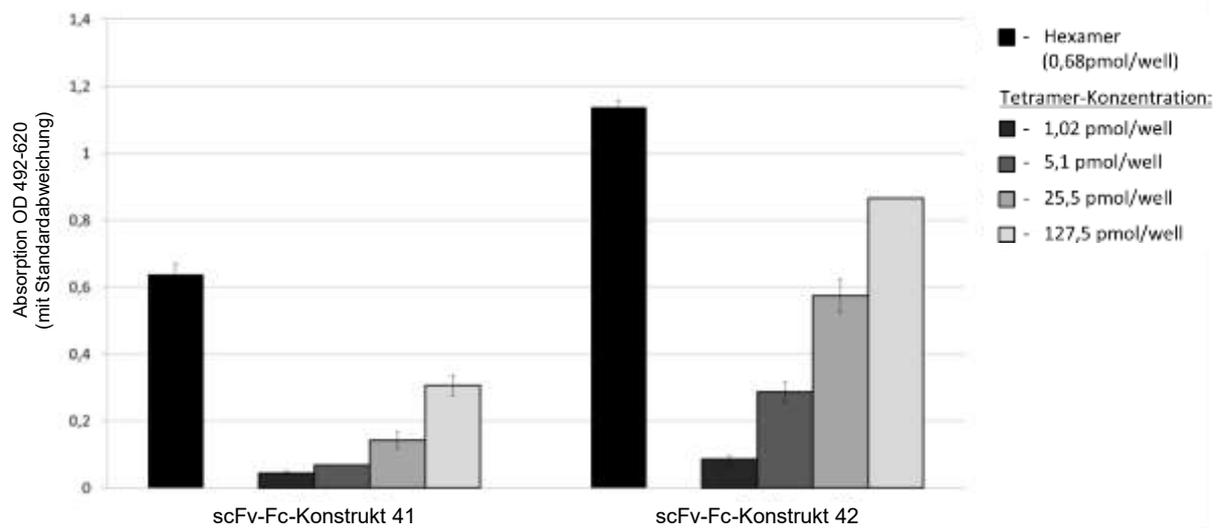


Abbildung 17: Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss

4.1.12. Bindung von Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit S100A12 Hexamer, Tetramer und Dimer versetztem Plasma

Die Möglichkeit mit Peptid 10 und den scFv-Fc-Konstrukten 41 und 42 Hexamer, Tetramer und Dimer im Plasma zu detektieren wurde mit 5 %iger und 10 %iger Plasmaverdünnungen in PBS bzw. 2 % BSA/PBST getestet. 3,4 pmol pro Vertiefung Hexamer, 5,1 pmol pro Vertiefung Tetramer und 10 pmol pro Vertiefung Dimer wurden in PBS bzw. 2 % BSA/PBST mit 5 %iger und 10 %iger Plasmaverdünnungen auf das immobilisierte Peptid gegeben und mit den scFv-Fc-Konstrukten detektiert. Die Ergebnisse zeigten eine geringere Bindung im Plasma im Vergleich zu reinem Puffer. Das Hexamersignal fiel mit steigendem Plasmaanteil deutlich ab. Bei der Verwendung des scFv-Fc-Konstruktes 41 fiel bei einem Plasmaanteil von 10 % das Hexamersignal unter die $OD_{492-620\text{ nm}}$ von 0,2. Bei der Detektion mit scFv-Fc-Konstrukt 42 waren mit einer $OD_{492-620\text{ nm}}$ von 0,4 deutlich höhere Hexamersignale in 10%iger Plasmaverdünnung messbar. Die Bindung von Tetramer und Dimer zeigte sich bei höheren Plasmakonzentrationen ebenfalls schwächer. In der 10-prozentigen Plasmaverdünnung fielen die Dimer- und Tetramersignale bis auf die Höhe der verwendeten Kontrollen ohne S100A12 Proteine ab. Für den Testaufbau mit scFv-Fc-Konstrukt 41 zeigten sich in der 5 % Plasmaverdünnung 5,2fach höhere Hexamersignale verglichen mit dem Tetramersignal. Ohne

Plasmaverdünnung zeigt sich das Hexamer 6,8fach erhöht verglichen mit dem Tetramersignal.

Für den Testaufbau mit scFv-Fc-Konstrukt 42 zeigten sich in der 5 % Plasmaverdünnung 6,8fach höhere Hexamersignale verglichen mit dem Tetramersignal. Ohne Plasmaverdünnung zeigt sich das Hexamer 5,0fach erhöht verglichen mit dem Tetramersignal. (Abbildung 18)

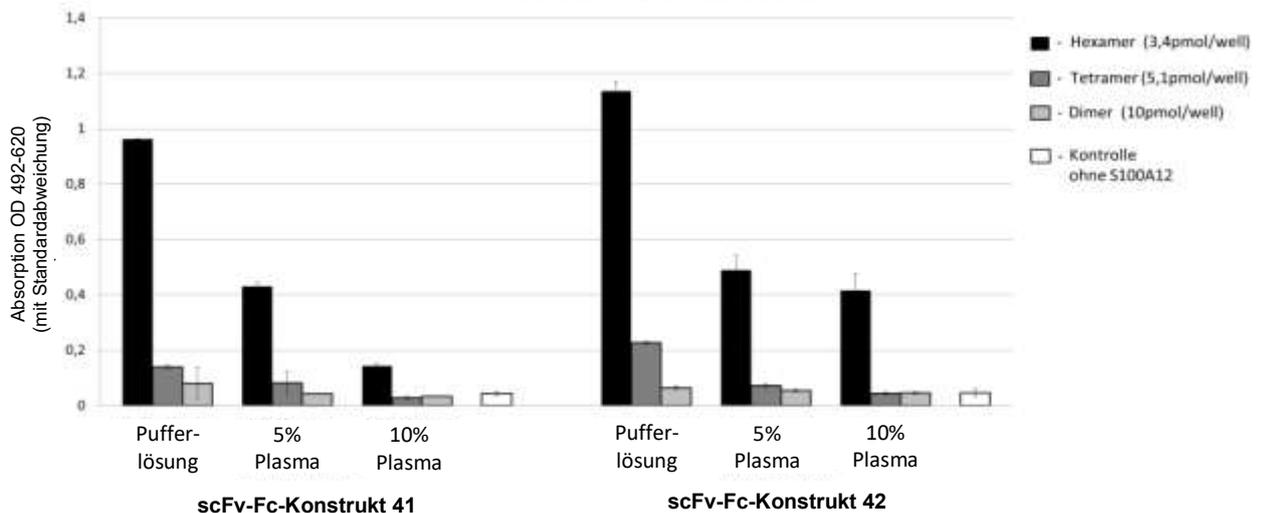


Abbildung 18: Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukt 41 und 42 in gespiktem Plasma

4.1.13 Peptid 4 mit crosslinked Hexamer versus „Wildtyp“ Hexamer

Da die verwendeten S100A12 Proteine zur Stabilisierung der jeweiligen Konformation mit Crosslinkern stabilisiert wurden, wurde abschließend die Bindung des selektierten Peptids 4 an das crosslinked Hexamer mit der Bindung an das „Wildtyp“ Hexamer verglichen. Als „Wildtyp“ Hexamer wird im Folgenden das S100A12 Hexamer ohne Stabilisierung mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat-Crosslinkern beschrieben. Die Abbildung 19 zeigt die Bindungssignale von gecoatetem Peptid 4 an crosslinked Hexamer im Vergleich zu „Wildtyp“ Hexamer. Es zeigte sich ein deutlich höheres „Wildtyp“ Hexamer Signal mit einer OD über 1,0 im Vergleich zum crosslinked Hexamer mit einer OD von unter 0,4. Die Kontrolle fiel mit einer OD unter 0,1 negativ aus.

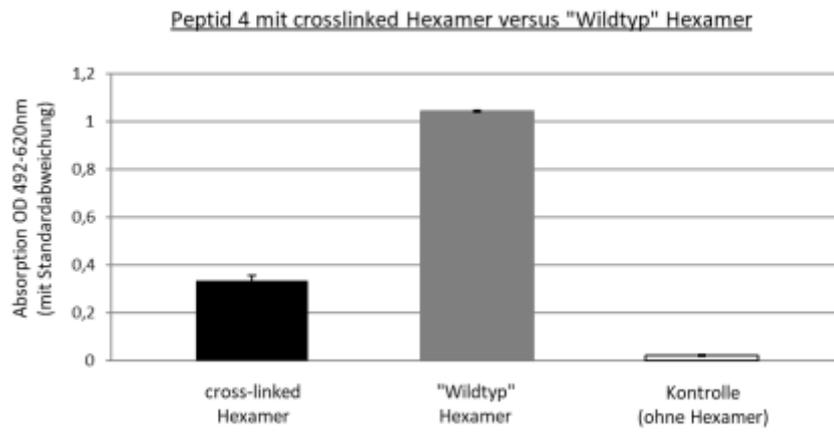


Abbildung 19: Peptid 4 mit crosslinked Hexamer versus „Wildtyp“ Hexamer

5. Diskussion

5.1. Aktueller Stand der Diagnostik und Monitoring von JIA, FMF und RA

Autoimmunerkrankungen wie die rheumatische Arthritis, autoinflammatorische Erkrankungen wie die juvenile idiopathische Arthritis und die Erkrankung des familiäre Mittelmeerfieber sind schwerwiegende Erkrankungen mit großem Leidensdruck für die noch jungen Patienten. Das FMF, die JIA und die RA verlaufen in der Regel in Schüben. Bei der JIA zeigen sich wochenlange Gelenkentzündungen mit Knorpeldestruktionen und Langzeitfolgen wie Wachstumsverzögerungen bis zum Wachstumsstillstand durch den vorzeitigen Epiphysenschluss. Patienten mit FMF leiden unter heftigen Bauchschmerzen zusammen mit hohem Fieber. Häufig ist bei den Patienten mit FMF eine Appendektomie narbe sichtbar, da ein inflammatorischer Schub als akutes Abdomen fehlinterpretiert wurde (8, 9).

Die späte Diagnostik stellt nachwievor ein großes Problem bei der JIA, der RA und dem FMF dar. Laura Aoust konnte 2017 zeigen, dass bei Patienten mit einer JIA es initial durchschnittlich 3 Monate dauerte bis die richtige Diagnose gestellt wurde und in 99% der untersuchten Fälle zunächst falsche Diagnosen ausgestellt wurden (34). Die Diagnostik der JIA basiert noch heute vor allem auf der klinischen Evaluation der Patienten. Ergänzend können unspezifische Inflammationsmarker wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit bestimmt werden (54). Auch bei der RA steht die klinische Beurteilung im Vordergrund. Zur Sicherung der Diagnostik können aufwendige Antikörperbestimmungen wie die Bestimmung von anti-CCP-(cyclisches citrulliniertes Peptid) und antinukleären Antikörpers sowie die Bestimmung von Rheumafaktoren hinzugezogen werden (55). Und bei der FMF ist die Verifizierung der Diagnose in der Regel nur durch die genetische Analyse des MEFV-Gens möglich (56).

Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt bei autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen stellt das Krankheitsmonitoring dar. Durch ein exaktes Monitoring kann die Therapie frühzeitig eskaliert oder deeskaliert werden - im Idealfall noch vor Symptomausbruch. Ein adäquates Therapiemanagement durch ein valides Monitoring ist maßgeblich für einen günstigen Krankheitsverlauf verantwortlich. Die Bedeutung des Krankheitsmonitorings konnte 2020 auch von Lisa Buckley (35) im

Zusammenhang mit der juvenilen idiopathischen Arthritis gezeigt werden. Das Monitoring wird heutzutage vor allem durch regelmäßige klinische Kontrollen durchgeführt. Hierbei werden bei der JIA neben Gelenkschwellungen und Gelenkschmerzen auch die Blutsenkungsgeschwindigkeit bestimmt (57). Entscheidend ist auch die regelmäßige Augendruckmessung, um die JIA-assoziierte Uveitis zu kontrollieren, welche sich bei circa 13% der betroffenen Patienten entwickelt (58).

Bei dem familiären Mittelmeerfieber besteht das Monitoring ebenfalls aus regelmäßigen klinischen Kontrollen. Zusätzlich können zur Abschätzung der Krankheitsschwere und der damit verbundenen Prognose das Serumamyloid A sowie das CRP bestimmt werden. Die empfohlenen Kontrollintervalle können sich bei Symptommexazerbation und anschließender Therapieeskalation auf einen Abstand von drei Monaten verkürzen (59). Auch bei der rheumatoiden Arthritis spielt die klinische Evaluation eine wichtige Rolle im Monitoring der Krankheitsaktivität. Unterstützt wird die Evaluation durch bildgebende Untersuchungen der Gelenke vor allem durch die Gelenksonographie aber auch durch die Magnetresonanztomographie. Smolen konnte 2011 für die RA zeigen, welche wichtige Bedeutung ein gutes Monitoring für das Erreichen der Behandlungsziele spielt (60).

5.2. S100A12 Hexamer als potenter Inflammationsmarker

Die Etablierung eines neuen krankheitsspezifischen und validen Inflammationsmarkers, welcher bei den betroffenen Patienten mit JIA, FMF oder RA signifikant erhöht ist und im besten Fall bereits vor Symptombeginn eine Krankheitsexazerbation anzeigt, hätte das Potential das Therapiemanagement und den Krankheitsverlauf deutlich zu verbessern. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von S100A12 Proteinen in den Erkrankungen der JIA (40), der RA (41) und dem FMF (42) deutlich erhöht ist und vor allem in der JIA (43) sowie beim FMF (42) sehr exakt mit dem Inflammationsstatus der betroffenen Patienten korreliert.

Die circa 10-12 kDa großen S100-Proteine wurden 1965 von B.W. Moore zum ersten Mal beschrieben (37). Moore entschied sich aufgrund der Löslichkeit in 100 %iger Ammoniumsulfat-Lösung für den Namen S100. Bis heute sind circa

25 verschiedene S100-Proteine bekannt (siehe Anhang: 7.3. S100 Proteine), unter anderem das S100A12 Protein.

Tilmann Kallinich konnte 2010 bei Patienten mit FMF zeigen, dass das S100A12 Protein bei subklinischen Entzündungsprozessen signifikant erhöht ist und somit bereits bei symptomlosen Patienten schon beginnende Inflammationsprozesse anzeigt (42). Kallinich konnte mit einer S100A12 Konzentration von rund dem 290-fachen über dem Normwert zeigen, dass S100A12 deutlich höher exprimiert wird im Rahmen eines inflammatorischen Ereignisses bei FMF-Patienten im Vergleich zu anderen Inflammationsmarkern wie der Blutsenkungsgeschwindigkeit, dem CRP oder dem Serumamyloid A (42). Orczyk prognostizierte 2018, dass das S100A12 Protein aufgrund einer sehr hoher Sensitivität und Spezifität großes Potential besitzt ein wichtiger Faktor bei Therapieentscheidungen für die JIA zu werden (51).

Bereits 2009 konnte Moroz zeigen, dass das S100A12 Protein in drei verschiedenen Konformationen vorliegen kann: das S100A12 Hexamer, das S100A12 Tetramer und das S100A12 Dimer (36). Entscheidend ist für die Ausbildung der verschiedenen Konformationen die Konzentration an Zink und Calciumionen (36) (siehe Anhang: 7.4. Konformationsänderung von S100A12). In Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem das S100A12 Hexamer für die Bindung an proinflammatorischen Rezeptoren wie RAGE (49) und TLR-4 (50) verantwortlich ist. Durch die Aktivierung von RAGE und TLR-4 wird die Expression weiterer S100A12 Proteine in Granulozyten stimuliert und die inflammatorische Kaskade verstärkt (44, 45, 61). Das S100A12 Hexamer besitzt somit eine Schlüsselfunktion in Entzündungsreaktionen, da es nicht nur ein Indikator für den inflammatorischen Status ist, sondern auch ein maßgeblicher Aktivator inflammatorischer Signalkaskaden darstellt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es Liganden zu finden, die spezifisch das S100A12 Hexamer und nicht das S100A12 Tetramer oder Dimer binden, da nach der aktuellen Literatur nur das Hexamer für die Bindung an proinflammatorische Rezeptoren verantwortlich ist. Hexamerspezifische Binder würden es ermöglichen einen Test aufzubauen, der S100A12 Hexamertiter in Patientenplasmen spezifisch detektiert. Durch einen hexamerspezifischen Test könnte die Diagnostik und das Monitoring von Erkrankungen wie der JIA, der RA und dem FMF verbessert und neue Möglichkeiten einer individuellen

Therapieanpassung eröffnet werden, welche im Idealfall eine Therapieeskalation oder –deeskalation noch vor Symptombeginn erlauben. Außerdem könnte das therapeutische Potential der selektierten hexamerspezifischen Liganden getestet werden. Wenn die hexamerspezifischen Binder die Interaktion des S100A12 Hexamers mit den proinflammatorischen Rezeptoren blockieren würden, wäre eine therapeutische Anwendung denkbar. Die Hexamer-Rezeptor Bindung könnte dann bei den Patienten gezielt unterdrückt werden und die proinflammatorische Signalkaskade unterbrochen werden.

5.3. Entwicklung eines hexamerspezifischen Tests

Das Biopanning beschreibt eine biotechnologische Methode zur Selektion von Bindungspartner an ein Zielprotein. Als Basis für die Selektionsschritte werden rekombinante Bibliotheken mit einer hohen Diversität aus Bakteriophagen verwendet, welche eine Vielzahl an verschiedenen Peptiden oder Antikörperfragmenten auf ihrer Oberflächen präsentieren. Den Grundstein für die Entwicklung des Biopannings wurde 1985 von George P. Smith gelegt (62). George P. Smith ist es gelungen Fremd-DNA in ein Protein III (pIII)-Plasmid von Bakteriophagen zu fusionieren. Das Proteinprodukt der Fremd-DNA wurde exprimiert und auf dem pIII-Protein der Bakteriophage präsentiert. Stephen F. Parmley baute 1988 (63) auf den Ergebnissen von Smith auf und entwickelte eine Affinitätsselektion von Peptiden und Antikörperfragmenten, die er an das pIII-Protein koppelte. Durch eine hohe Vielzahl an verschiedenen Peptid-Sequenzen und Antikörper (scFv)-Fragmente, die von den Bakteriophagen präsentiert werden, entstehen sogenannte rekombinante Bibliotheken. Diese können in einem Selektionsprozess aus Negativ- und Positivselektion ausgelesen werden, um spezifische Binder an eine Zielstruktur zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde das Biopanning verwendet, um eine Affinitätsselektion von Bindern für das S100A12 Hexamer durchzuführen.

Die rekombinanten Bibliotheken aus Peptid- und scFv-präsentierenden Phagen wurden zunächst einer Negativselektion zugefügt. Diese wurde mit dem S100A12 Tetramer durchgeführt. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit des Tetramers im Vergleich zum Hexamer (36) wurde sich für eine

Negativselektion mit Tetramer entschieden. Das Dimer wurde anschließend in weiterführenden Test analysiert.

Nach drei Runden der Affinitätsselektion aus Negativ- und Positivselektion wurden die selektierten Peptid-präsentierenden Phagen und scFv-präsentierenden Phagen in einem Capture-ELISA getestet. Hierbei zeigten sich mit 17 Peptid-exprimierenden Phagen und 48 scFv-exprimierenden Phagen einige Liganden mit hohen Bindungssignalen an das S100A12 Hexamer. Die selektierten Phagen zeigten zu dem S100A12 Tetramer ebenfalls Bindungssignale, jedoch fielen diese deutlich geringer aus im Vergleich zu den Hexamerbindungssignalen (Abbildung 2 und 3). Angesichts der strukturellen Verwandtschaft des S100A12 Hexamer zum Tetramer durch die gleichen Monomere (36), war es nicht verwunderlich, dass die selektierten Phagen ebenfalls eine schwache Bindung an das Tetramer zeigten. In einem Bestätigungs-ELISA verifizieren sich die 17 Peptid-präsentierenden Phagen und 48 scFv-präsentierenden Phagen (Abbildung 4 und 5). Wie im Capture-ELISA zeigten die Bakteriophagen hohe Hexamersignale und niedrige Tetramersignale.

Die selektierten Peptid- und scFv-präsentierenden Phagen wurden anschließend in einem Kompetitions-ELISA mit ansteigenden Konzentrationen des Tetramers und Dimers getestet (Abbildung 6 bis 9). Von allen getesteten Phagen zeigte die scFv-präsentierende Phage 42 die vielversprechendsten Ergebnisse: trotz Anwesenheit sehr hohen Dimer- und Tetramerkonzentrationen in Lösung zeigte sich die Bindung an das immobilisierte Hexamer nicht gestört. Die Peptid-exprimierenden Phagen 4 und 10 sowie die scFv-exprimierende Phage 41 zeigten lediglich bei sehr hohen Tetramerkonzentrationen eine Abschwächung des Bindungssignals. Bei sehr hohen Dimerkonzentrationen blieb das Hexamerbindungssignal bis auf die scFv-exprimierende Phage 41 annähernd so hoch wie die Kontrolle ohne Dimerkompetition. Die selektierten Phagen, allen voran scFv-exprimierende Phage 42, zeigten demnach trotz hoher Tetramerkonzentration in Lösung eine gute Bindung an das immobilisierte Hexamer. Diese Ergebnisse demonstrieren eine hohe Hexamerspezifität. Lediglich die geringe Signalabschwächung der Peptid-exprimierenden Phagen 4 und 10 und der scFv-exprimierenden Phage 41 bei sehr hohen Tetramerkonzentrationen deuten auf eine leichte

Kreuzreaktivität zum Tetramer hin. ScFv-exprimierende Phage 41 zeigte ebenfalls eine geringe Kreuzreaktivität zum Dimer. Die geringe Kreuzreaktivität konnte bereits im vorangegangenen Capture- und Bestätigungs-ELISA beobachten werden und lässt sich am ehesten aufgrund der gleichen Grundbestandteilen an S100A12 Monomeren und somit identischen Aminosäuresequenz begründen (36). Eine höhere Kreuzreaktivität zum Tetramer im Vergleich zum Dimer könnte auf die höhere strukturelle Verwandtschaft des Hexamer zum Tetramers rückgeführt werden (36). Um zu verhindern, dass höhere Bindungssignale durch potentiell, vermehrte Bindungsstellen im Tetramer und vor allem im Hexamer aufgrund der höheren Anzahl an Monomeruntereinheiten verursacht werden, wurden die S100A12 Proteinkonzentrationen jeweils an die Monomereinheiten angeglichen.

Eine Analyse der Aminosäuren der selektierten Peptide und scFvs konnte kein gemeinsames Aminosäuremuster identifizieren.

Ziel war es in einem Vergleich zwischen Peptid und Kontrollpeptid zu untersuchen, ob die selektierte Peptidsequenz verantwortlich für die Bindung an das Hexamer ist oder durch unspezifische, einzelne Aminosäuren zustande kommt. Die Ergebnisse (Abbildung 10) zeigten, dass die Kontrollpeptide nur ein sehr schwaches Hexamersignal erzeugen, welches annähernd auf dem Niveau der Kontrolle blieb. Die selektierten Peptide zeigten hingegen ein hohes Hexamerbindungssignal. Folglich konnte aus den Ergebnissen darauf geschlossen werden, dass die selektierten Peptidsequenzen verantwortlich sind für die hexamerspezifische Bindung.

Basierend auf den selektierten Peptiden 4 und 10 wurde ein Testaufbau konzipiert, welcher wie folgt aufgebaut wurde: die selektierten Peptide 4 und 10 wurden auf einer mit Streptavidin-beschichteten ELISA-Platte immobilisiert. Nachdem S100A12 Proteine hinzugegeben wurden, folgte eine Detektion mit einem unspezifischen anti-S100A12-Antikörper, welcher zu S100A12 Hexamer, Tetramer und Dimer jeweils ähnliche Bindungsaffinitäten besitzt.

In einem Vergleich von Hexamer und Tetramer konnte eine sehr hohe Hexamerspezifität gezeigt werden (Abbildung 11): die Hexamersignale waren signifikant erhöht und die Tetramersignale blieben in fast jeder Konzentration auf dem Niveau der Kontrollen ohne S100A12 Proteine. Da in diesem Versuchsaufbau das Peptid 10 bei ähnlicher Konzentration höhere

Bindungssignale liefert als Peptid 4, wurde dies als bessere Bindungsstärke des Peptids 10 zum Hexamer gewertet. In nachfolgenden Tests wurde sich daher auf das Peptid 10 konzentriert.

Um im nächsten Schritt die Kreuzreaktivität des vorläufigen Testaufbaus zum Tetramer zu testen, wurde eine Hexamerkonzentration mit ansteigenden Tetramerkonzentrationen (5-, 25- und 125-fache Konzentration – bezogen auf die monomeren Untereinheiten der S100A12 Proteine) verglichen. Es zeigte sich bei der 125-fachen Tetramerkonzentration ein höheres Bindungssignal als die 1-fache Hexamerkonzentration (Abbildung 12). Die 100-fache Tetramerkonzentration würde in etwa die gleichen Bindungssignale erreichen wie die 1-fache Hexamerkonzentration. In diesem Testaufbau liegt die Grenze der Hexamerspezifität somit bei circa 1:100 bezogen auf die Konzentrationen von Hexamer zu Tetramer.

In einem parallelen Ansatz wurden die selektierten, hexamerspezifischen, scFv-präsentierenden Phagen 41 und 42 zu scFv-Fc-Fusionsproteinen kloniert und schließlich als Konstrukte produziert. In einem anschließenden ELISA bestätigten die produzierten scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 bereits die Hexamerbindung (Abbildung 15).

Im nächsten Schritt wurde nun versucht die Hexamerspezifität des Testaufbaus zu steigern. Ziel war es das hexamerspezifische Peptid 10 und die hexamerspezifischen scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in einem ELISA zu kombinieren, um so die Spezifität für das S100A12 Hexamer deutlich zu erhöhen. Damit dies gelang, hätten sich die Peptide nicht blockieren dürfen und es hätte eine Möglichkeit für die Detektion der gebundenen Hexamere geben müssen.

Nach einigen Versuchen von verschiedenen ELISA-Konzepten wurde schließlich auf den vorherigen Testaufbau zurückgegriffen. Es wurde versucht in dem ELISA Aufbau aus immobilisierten Peptiden, die scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 als Detektionskomponente zu integrieren. Gebundene scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42, welche einen Fc-Teil einer Maus besitzen, können anschließend mit einem HRP-konjugierten anti-Maus-Antikörper detektiert und visualisiert werden.

In einem ersten Vergleich zwischen Hexamer und Tetramer zeigten sich keine großen Unterschiede verglichen mit dem vorherigen Testaufbau (Abbildung 11

vs. Abbildung 16): hohe Hexamersignale standen niedrigen Tetramer- und Dimerbindungssignalen gegenüber (Abbildung 16). Um diesen neuen Testaufbau nun weiter auf die Hexamerspezifität zu testen, wurde erneut ein ELISA mit Tetramerüberschuss durchgeführt. Die 1-fache Hexamerkonzentration wurde wieder mit den 1-, 5-, 25- und 125-fachen Tetramerkonzentrationen verglichen. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls ein Anstieg der Tetramersignale mit steigenden Konzentrationen (Abbildung 17). Allerdings blieben die Signalhöhen der Tetramerkonzentrationen weit unter den Level verglichen mit den Ergebnissen des vorherigen Testaufbaus (Abbildung 12 vs. Abbildung 17). Vor allem bei der Detektion mit scFv-Fc-Konstrukt 41 lagen die Tetramerbindungssignale deutlich unterhalb des Hexamersignals. Das Bindungssignal der 1-fache Hexamerkonzentration wurde erst bei etwa der 250-fachen Tetramerkonzentration erreicht. Im Vergleich zu den Ergebnissen des vorherigen Testaufbaus bedeutet dies eine deutliche Verbesserung der Hexamerspezifität.

Es zeigte sich demnach, dass der Testaufbau funktionstüchtig war und sich Peptid 10 und die scFv-Fc-Konstrukte nicht gegenseitig blockieren. Dies ist möglicherweise ein Hinweis dafür, dass sich die Bindungsstellen des Peptids 10 und der scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 an das S100A12 Hexamer voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse bestätigen jedoch vor allem die Überlegung, dass die Hexamerspezifität erhöht werden kann, durch die Kombination beider Liganden. Auch die geringe Kreuzreaktivität zum Tetramer konnte deutlich reduziert werden.

Um abschließend zu untersuchen, wie sich der neue Testaufbau im Plasma verhält, wurde Plasma von gesunden Probanden in verschiedenen Verdünnungen (5%iger und 10%iger Plasmaverdünnung) mit Hexamer, Tetramer und Dimer versetzt. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass die Hexamerspezifität des Testaufbaus in Plasmaverdünnungen reproduzierbar ist (Abbildung 18). Zusätzlich zeigte sich insgesamt eine deutliche Signalabschwächung, je höher der Plasma-Anteil der Verdünnung war. Neben den Hexamersignalen reduzierten sich auch die Tetramersignale deutlich. Die Tetramersignale fielen sogar auf das Niveau der verwendeten Kontrollen ohne Einsatz von S100A12 Proteinen. Die geringe Kreuzreaktivität zum Tetramer war somit nicht mehr messbar. Vor allem scFv-Fc-Konstrukt 42 zeigte sehr gute

Bindungseigenschaft zum S100A12 Hexamer in Plasmaverdünnungen. Im Vergleich zum scFv-Fc-Konstrukt 41 fielen bei der Detektion mit scFv-Fc-Konstrukt 42 die Bindungssignale in Verdünnungen mit höherem Plasmaanteil deutlich geringer ab. Die Bindungsstärke von scFv-Fc-Konstrukt 42 präsentierte sich somit deutlich höher. Insgesamt zeigte sich, dass in dem neuen Testaufbau die Verwendung der scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 als Detektionskomponente zu einer deutlichen Steigerung der Hexamerspezifität geführt hat. Das scFv-Fc-Konstrukt 41 erreichte in dem ELISA mit Tetramerüberschuss eine signifikant verbesserte Hexamerspezifität und eine sehr geringe Tetramerkreuzreaktivität. Wohingegen das scFv-Fc-Konstrukt 42 eine höhere Bindungsstärke zum Hexamer aufbaut, welche vor allem im Zusammenhang mit den abfallenden Bindungssignalen in Plasmatests von nicht unbedeutender Relevanz scheint, da auch im Plasma hohe Hexamersignale erreicht werden.

Ergänzend wurde die Bindung des selektierten Peptids 4 an das crosslinked Hexamer im Vergleich zu dem „Wildtyp“ Hexamer getestet, da die verwendeten S100A12 Proteine zur Stabilisierung der jeweiligen Konformation mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat Crosslinkern verknüpft wurden. Peptid 4 steht hierbei stellvertretend für die beiden selektierten Peptide 4 und 10. Es zeigte sich ein deutlich höheres Bindungssignal bei der Bindung von Peptid 4 mit dem „Wildtyp“ Hexamer im Vergleich zum crosslinked Hexamer (Abbildung 19). Daraus lässt sich schließen, dass die verwendeten Crosslinker die Bindung zum Peptid reduzieren. Ohne die Verwendung von Crosslinkern zeigt sich eine sehr gute Bindung des Peptids zum „Wildtyp“ Hexamer. Es lässt sich vermuten, dass die durchgeführten ELISAs mit crosslinked Hexamer unter Verwendung von „Wildtyp“ Hexamer noch höhere Bindungssignale zeigen.

5.4. Interpretation der gewonnenen Ergebnisse

Zusammenfassend ist es uns gelungen mittels Biopanning zwei hexamerspezifische Peptide sowie zwei hexamerspezifische scFv-Fc-Konstrukte zu selektieren. Diese konnten wir zu einem Testaufbau kombinieren, in dem das S100A12 Hexamer sehr spezifisch detektiert wird. Wie in verschiedenen Studien dargelegt, könnte ein S100A12 hexamerspezifischer Test eine deutliche Verbesserung des Monitorings von autoinflammatorischen

Erkrankungen wie der JIA oder Erkrankungen wie dem FMF ermöglichen. Dies liegt vor allem an der hohen Sensitivität und Spezifität des S100A12 Proteins und an der Überlegenheit gegenüber unspezifischen Inflammationsmarkern wie dem CRP (51, 40, 42). S100A12 zeigte vor allem in der JIA bereits subklinische Inflammationen auf molekularer Ebene an und eröffnet dadurch die Möglichkeit bei Patienten einen Krankheitsrückfall zu detektieren noch vor Symptombeginn (48).

Weitere Publikationen zeigen, dass S100A12 ebenfalls eine zunehmende Relevanz in der Diagnostik von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gewinnt. Marc Sidler konnte 2008 demonstrieren, dass S100A12 im Stuhl bei inflammatorischen Darmerkrankungen deutlich erhöht ist (64). S100A12 im Stuhl zeigte sich aufgrund einer sehr hohen Sensitivität und Spezifität von jeweils 97% dem klinisch häufig verwendeten Calprotectin (S100A8/S100A9-Heterotetramer) überlegen (Sensitivität von 100%, Spezifität von 67%). Sidler betonte die entscheidenden Vorteile von fäkalen S100A12 Analysen bei inflammatorischen Darmerkrankungen aufgrund der Einfachheit und einer neuen Möglichkeit einer nicht-invasiven Testung (64). Der von uns entwickelte S100A12 hexamerspezifische Test könnte somit durch eine Anpassung an ein anderes Probenmaterial nicht nur bei autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen über die Bestimmung der S100A12 Serumkonzentrationen Relevanz erlangen, sondern auch die Möglichkeit eröffnen S100A12 Hexamer im Stuhl zu messen. Dies könnte bei Patienten mit inflammatorischen Darmerkrankungen zu einer Verbesserung der initialen Diagnostik führen und unter anderem die Anzahl von invasiveren Untersuchungsmethoden wie Endoskopien reduzieren (65).

Über die Grenzen der Aussagefähigkeit des S100A12 Proteins wird in vereinzelt Publikationen hingewiesen. Claas Hinze zeigte 2019, dass S100A12 bei der JIA eine begrenzte Aussagekraft besitzt, wenn in der Erhaltungstherapie Anti-TNF-Therapeutika verwendet werden (66). Da die Sekretion von S100A12 durch TNF initiiert und stimuliert wird (45, 67), werden durch die Verwendung von anti-TNF-Therapeutika die S100A12 Serumkonzentrationen reduziert. In diesen Fällen wird die Aussagekraft von S100A12 in der Erhaltungstherapie der JIA eingeschränkt.

Zudem können Serumkonzentrationen von S100A12 durch Infektionen variieren. Keyi Liu konnte 2012 zeigen, dass S100A12 im Serum von Kindern mit einer akuten Otitis media, welche durch *Streptokokkus pneumoniae* oder *Hämophilus influenzae* ausgelöst wird, deutlich erhöht ist (46). Somit sind Schwankungen des S100A12 Serumlevels durch Infektionen bei Patienten unter antiinflammatorischen Erhaltungstherapie möglicherweise nicht ausschließbar. Die Bewertung des S100A12 Hexamerspiegels müsse demnach unter Berücksichtigung der aktuellen Infektanamnese und Akut-Phase-Proteinen wie dem CRP durchgeführt werden.

Über die Anwendbarkeit des entwickelten S100A12 hexamerspezifischen Tests ist zu erwähnen, dass in der Literatur neben der Relevanz von S100A12 in autoinflammatorischen Erkrankungen wie der JIA oder Erkrankungen wie dem FMF auch ein Zusammenhang zu weiteren Krankheitsbildern wie dem Akuten Lungenversagen (ARDS)(68), Asthma (69), das Kawasaki Syndrom (70), die Myasthenia Gravis (71) und zahlreichen onkologischen Erkrankungen beschrieben wird. Xiaojie Wang konnte 2020 zeigen, dass S100A12 ein vielversprechender Marker im papillärer Schilddrüsenkrebs (PTC) ist (72). Wang demonstrierte in seiner Publikation, dass die Expression von S100A12 im PTC signifikant erhöht ist und eine Korrelation zur Tumorgröße, zum Tumorstadium und zur lymphatischen Metastasierung aufweist. Dass S100A12 in noch weiteren onkologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, konnte unter anderem Ayssar Elamin zeigen. Elamin publizierte 2020 über die Relevanz von S100A12 im Zusammenhang mit Urothelkarzinomen der Harnblase (73). Eine Analyse von bis zu 141 Genbereichen bei Patienten mit Urothelkarzinomen der Harnblase zeigte eine vermehrte Expression des S100A12 Genbereichs. Elamin etablierte einen Grenzwert von S100A12 Serumkonzentrationen (350 ng/mL) mit einer Sensitivität von 90,5% und einer Spezifität von 75%. Elamin konnte auch zeigen, dass eine vermehrte S100A12 Expression bei Urothelkarzinomen der Harnblase mit einem hohen Tumorstadium und einer erhöhten Rezidivrate vergesellschaftet ist. Elamin zeigte sich optimistisch, dass auf Grundlage der Ergebnisse S100A12 als potentieller Marker und prognostischer Faktor für Urothelkarzinome der Harnblase klinische Anwendung finden könne. Vergleichbare Ergebnisse

konnte Dan Li 2016 für die Relevanz von S100A12 im Kontext mit Magenkarzinomen zeigen (74). Auch bei Magenkarzinomen zeigte sich eine Korrelation zwischen S100A12 und der Tumorgroße, der Tumormetastasierung, der Infiltrationstiefe und Zelldifferenzierung. Anders als bei Urothelkarzinomen oder PTC zeigten sich die S100A12 Protein- und S100A12 mRNA-Konzentration bei Magenkarzinomen deutlich erniedrigt, verglichen mit nicht-karzinogenen Magenzellen.

In der aktuellen Literatur werden somit weitere Krankheitsbilder beschrieben, bei denen S100A12 eine relevante Rolle zu spielen scheint. Es bleibt somit zu diskutieren, ob das S100A12 Protein als spezifischer Biomarker für die autoinflammatorischen Erkrankungen wie der JIA und Erkrankungen wie dem FMF verwendet werden kann.

Noch 2004 erkannte Foell (40) in S100A12 einen spezifischen Marker, um die beginnende, systemische JIA von systemischen Infektionen unterscheiden können. 2008 beschrieb Wittkowski (106) S100A12 als Marker vor allem für Autoimmunerkrankungen und Tilmann Kallinich zeigte 2010 ebenfalls die Bedeutung von S100A12 als spezifischen Marker für die JIA und dem FMF (42). Durch die neuen Erkenntnisse von Wang (72) 2020 über die Rolle von S100A12 im papillären Schilddrüsenkrebs, die Beschreibungen von Elamin 2020 (73) bezüglich der Bedeutung von S100A12 im Urothelkarzinom oder die Publikation von Liu 2012 (46), dass S100A12 auch bei der akuten Otitis media erhöht sein kann, bleibt die Verwendung von S100A12 als spezifischer Biomarker bei der JIA oder dem FMF unklar. Es lässt sich vermuten, dass S100A12 vor allem bei der initialen Diagnosestellung von autoinflammatorischen Erkrankungen wie der JIA oder Erkrankungen wie dem FMF viel mehr als unterstützender Biomarker anstatt als alleiniger, spezifischer Diagnosefaktor betrachtet werden kann. Bezogen auf den entwickelten S100A12 hexamerspezifischen Test würde dies eine breitere Anwendbarkeit bedeuten, welche eine Verwendung neben autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankung auch bei Infektionen und onkologischen Erkrankungen denkbar macht. Die Verwendung als spezifischen Test für die JIA und das FMF könne somit an Bedeutung verlieren.

Weiterhin sind die therapeutischen Möglichkeiten der hexamerspezifischen Peptide und scFv-Fc-Konstrukte zu prüfen. Wie Pietzsch 2009 publizierte, ist das S100A12 Hexamer verantwortlich für die Bindung an den inflammatorischen Rezeptor RAGE und löst eine Sekretion von Cytokinen wie dem TNF- α und dem Interleukin-1 β aus (76). Eine Unterbindung oder Hemmung der S100A12-RAGE-Interaktion würde die inflammatorische Signalkaskade unterbrechen und könnte einen positiven, klinischen Einfluss auf den Progress vor allem von Autoimmunerkrankungen haben. Chin-Chi Chang versuchte 2016 bereits die Interaktion von S100A9 mit RAGE mittels CHAPS, einem zwitterionischen Detergens, welches zur Solubilisierung von Membranproteinen häufig verwendet wird, zu blockieren (77). Falls das entwickelte S100A12 hexamerspezifische Peptid und die hexamerspezifischen scFv-Fc-Konstrukte die S100A12-RAGE-Interaktion unterbinden würden, könnte dies im Kontext von autoinflammatorischen Erkrankungen wie der JIA oder Erkrankungen wie dem FMF neue, therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Aber auch für onkologische Erkrankungen wie das beschriebene PTC, dem Urothelkarzinome der Harnblase sowie dem Magenkarzinome, bei denen S100A12 eine entscheidene Rolle spielt, könnte die Hemmung der S100A12-RAGE-Interaktion eine neue, therapeutische Option bedeuten. Xiaojie Wang testete 2020 im Kontext des PTCs (72) wie sich eine Herabregulierung von S100A12 auf die Entwicklung von PTC auswirkt. Wang inaktivierte mittels „small hairpin RNA“ (shRNA) das S100A12 Gen in PTC-Zellen. Durch die genetische Stilllegung von S100A12 präsentierte sich *in vitro* eine signifikante Reduktion der Proliferation in PTC-Zellen. Weiterhin konnte neben der deutlich verringerten Proliferationsrate eine Reduktion der Zellmigration und -invasion nachgewiesen werden. Somit zeigte sich durch die Hemmung von S100A12 im Kontext von PTC-Zellen eine Unterdrückung der gesamten Tumorgenese, welche Wang auch *in vivo* im Mausmodell reproduzieren konnte.

Ob durch die Hemmung von S100A12 und der S100A12-RAGE Interaktion unerwünschte Nebenwirkungen auftreten, wurde von Wang oder Chang nicht beschrieben. Eine mögliche immunsuppressive Wirkung mit gesteigerter Infektneigung durch eine Unterdrückung der RAGE-vermittelten Cytokin-Ausschüttung bleibt noch zu klären. Aufgrund der sehr vielversprechenden Ergebnisse von Wang ist jedoch die Analyse einer Blockade der S100A12-

RAGE-Interaktion durch die entwickelten S100A12 hexamerspezifischen Peptide 4 und 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 durchaus als aussichtsreich anzusehen. Die Anwendung der entwickelten S100A12 hexamerspezifischen Peptide 4 und 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 wären dann nicht nur diagnostisch im Rahmen des entwickelten Testaufbaus beschränkt, sondern würden auch neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

Ein Aspekt, welcher nach aktuell vorliegender Literatur noch ungeklärt bleibt, ist die Bestimmung der exakten Konzentrationen des S100A12 Hexamers, Tetramer und Dimers im Plasma. Moroz beschreibt 2002 (49), dass im Extrazellulärraum das S100A12 Hexamer die vorherrschende Konformation ist. Er konnte zeigen, dass die 10.000-fach höhere Calciumkonzentration extrazellulär die strukturelle Anlagerung vom Tetramer und Dimer zum Hexamer verursacht. Somit ist davon auszugehen, dass das S100A12 Tetramer und Dimer im Extrazellulärraum nur in niedriger Konzentration vorliegt. Dies würde bedeuten, dass die bestehende geringe Kreuzreaktivität gegenüber dem Tetramer keine Relevanz mehr hätte. Die Tetramerkonzentrationen würden in Plasmatests keine ausreichend hohen Titer erreichen, um von dem entwickelten Test detektiert zu werden.

5.5. Fazit

Abschließend ist zusammenzufassen, dass es uns gelungen ist die hexamerspezifischen Peptide 4 und 10 und die hexamerspezifischen scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 zu selektieren. Mit diesen Liganden konnten wir einen Test aufbauen, welches das S100A12 Hexamer spezifisch bindet. Vor allem durch die Kombination der gewonnenen Peptide und der scFv-Fc-Konstrukte in einem Testaufbau war es möglich die Spezifität zum Hexamer noch weiter zu steigern und die Kreuzreaktivität zum Tetramer zu verringern. Da bei Erkrankungen wie der JIA, der RA und dem FMF das S100A12 Hexamer exakt den inflammatorischen Status der Patienten widerspiegelt, besitzt unser Test Potential die initiale Diagnostik sowie vor allem das Monitoring zu verbessern. Um nun die klinische Anwendbarkeit des Tests zu evaluieren, sind weitere Tests mit Plasma von Patienten mit Erkrankungen wie der JIA, der RA und dem FMF

nötig. Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit solcher Plasmen wurden in den durchgeführten Tests gespiktes Plasma von gesunden Probanden verwendet. Außerdem wäre eine therapeutische Verwendung der selektierten Peptide und scFv-Fc-Konstrukte eine interessante und vielversprechende Option. Sollten sich die Interaktion des S100A12 Hexamers mit den proinflammatorischen Rezeptoren RAGE und TLR-4 durch die hexamerspezifischen Peptide und scFv-Fc-Konstrukte blockieren lassen, würde dies einen neuen therapeutischer Ansatz eröffnen. Die inflammatorische Signalkaskade könnte durch die Liganden unterbrochen werden und die inflammatorischen Schübe in Erkrankungen wie der JIA, der RA oder dem FMF gehemmt werden. So könnte der Krankheitsprogress und der damit verbundene Leidensdruck der Patienten abgemildert werden. Eine mögliche immunsuppressive Wirkung durch die Unterdrückung der S100A12-RAGE bzw. S100A12-TLR-4 Interaktion bleibt zu prüfen.

Zusätzlich wäre die Anwendung der S100A12 Binder in weiteren Erkrankungen zu erforschen. In verschiedenen Quellen wird die Interaktion von S100A12 mit den proinflammatorischen Rezeptoren RAGE und TLR-4 als entscheidende Signalkaskade bei vielen weiteren Krankheitsbildern beschrieben. In der Literatur werden unter anderem das ARDS (68), Asthma (69), das Kawasaki Syndrom (70), die Myasthenia Gravis (71), entzündliche Darmerkrankungen (78) und zahlreichen onkologischen Erkrankungen (72, 73, 74) beschrieben. Damit besteht die Möglichkeit, dass es für die selektierten hexamerspezifischen Peptide und scFv-Fc-Konstrukte diagnostisch und auch therapeutisch in weiteren Erkrankungen eine Verwendung geben könnte.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Ehrlich, P. & Morgenroth, J. Berlin klin. Wochenschr. 36, 6–9 & 481–486 (1899); 37, 453–458 & 681–687 (1900); 38, 251–257 & 569–574 (1901). (Translations: Ehrlich, P. in *The Collected Papers of Paul Ehrlich* Vol. II, Pergamon, New York, 1957.)
- (2) Ribatti D. Sir Frank Macfarlane Burnet and the clonal selection theory of antibody formation. *Clin Exp Med*. 2009 Dec;9(4):253-8. doi: 10.1007/s10238-009-0048-y. Epub 2009 May 1. PMID: 19408101.
- (3) Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015 Oct;278(4):369-95. doi: 10.1111/joim.12395. Epub 2015 Jul 25. PMID: 26212387.
- (4) Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, Siminovitch KA, Bae SC, Plenge RM, Gregersen PK, de Bakker PI. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2012 Jan 29;44(3):291-6. doi: 10.1038/ng.1076. PMID: 22286218; PMCID: PMC3288335.
- (5) French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):25-31. doi: 10.1038/ng0997-25. PMID: 9288094.
- (6) Rigante D, Bosco A, Esposito S. The Etiology of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Oct;49(2):253-61. doi: 10.1007/s12016-014-8460-9. PMID: 25384710.
- (7) Do infections trigger juvenile idiopathic arthritis? – Mustafa Aslan – PMID: 20012631 – *Rheumatol Int*. 2011
- (8) Petty RE, Southwood TR, Manners P, Woo P; International League of Associations for Rheumatology. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004 Feb;31(2):390-2. PMID: 14760812.
- (9) Barut K, Adrovic A, Şahin S, Kasapçopur Ö. Juvenile Idiopathic Arthritis. *Balkan Med J*. 2017 Apr 5;34(2):90-101. doi: 10.4274/balkanmedj.2017.0111. PMID: 28418334; PMCID: PMC5394305.
- (10) Holzinger D, Frosch M, Kastrup A, Wittkowski H. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):974-80. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200598. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22267331.

- (11) Weiss JE, Ilowite NT. Juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Clin North Am.* 2005 Apr;52(2):413-42, vi. doi: 10.1016/j.pcl.2005.01.007. PMID: 15820374.
- (12) Kasapçopur Ö, Barut K. Treatment in juvenile rheumatoid arthritis and new treatment options. *Turk Pediatri Ars.* 2015 Mar 1;50(1):1-10. doi: 10.5152/tpa.2015.2229. PMID: 26078691; PMCID: PMC4462330.
- (13) Tufan A, Lachmann HJ. Familial Mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: a contemporary review. *Turk J Med Sci.* 2020 Nov 3;50(SI-2):1591-1610. doi: 10.3906/sag-2008-11. PMID: 32806879; PMCID: PMC7672358.
- (14) Giancane G, Ter Haar NM, Wulffraat N, Ozen S. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2015 Apr;74(4):635-41. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206844. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25628446.
- (15) Holzinger D, Foell D, Kessel C. The role of S100 proteins in the pathogenesis and monitoring of autoinflammatory diseases. *Mol Cell Pediatr.* 2018 Sep 25;5(1):7. doi: 10.1186/s40348-018-0085-2. PMID: 30255357; PMCID: PMC6156694.
- (16) Hentgen V, Vinit C, Fayand A, Georgin-Lavialle S. The Use of Interleukine-1 Inhibitors in Familial Mediterranean Fever Patients: A Narrative Review. *Front Immunol.* 2020 May 28;11:971. doi: 10.3389/fimmu.2020.00971. PMID: 32670263; PMCID: PMC7326122.
- (17) Varan O, Kucuk H, Babaoglu H, Tufan A. Effect of interleukin-1 antagonists on the quality of life in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol.* 2019 Apr;38(4):1125-1130. doi: 10.1007/s10067-018-4384-8. Epub 2018 Dec 10. PMID: 30535829.
- (18) Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016 Oct 22;388(10055):2023-2038. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8. Epub 2016 May 3. Erratum in: *Lancet.* 2016 Oct 22;388(10055):1984. PMID: 27156434.
- (19) Hurd ER. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1979 Feb;8(3):151-76. doi: 10.1016/s0049-0172(79)80005-0. PMID: 370982.
- (20) Baecklund E, Iliadou A, Askling J, Klareskog L. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Mar;54(3):692-701. doi: 10.1002/art.21675. PMID: 16508929.
- (21) Kitas GD, Gabriel SE. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jan;70(1):8-14. doi: 10.1136/ard.2010.142133. Epub 2010 Nov 24. Erratum in: *Ann Rheum Dis.* 2011 Aug;70(8):1520. PMID: 21109513.
- (22) Listing J, Kekow J, Manger B, Strangfeld A. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids,

- TNF α inhibitors and rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2015 Feb;74(2):415-21. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204021. Epub 2013 Nov 29. PMID: 24291654; PMCID: PMC4316844.
- (23) Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, van Riel PL. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001 Sep;44(9):2009-17. doi: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2009::AID-ART349>3.0.CO;2-L. PMID: 11592361.
- (24) Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):44-8. doi: 10.1002/art.1780380107. PMID: 7818570.
- (25) Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Tugwell P. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Feb;42(2):244-57. doi: 10.1093/rheumatology/keg072. PMID: 12595618.
- (26) Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Smolen JS. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R796-806. doi: 10.1186/ar1740. Epub 2005 Apr 7. PMID: 15987481; PMCID: PMC1175030.
- (27) Mandl P, Balint PV, Brault Y, Dougados M. Metrologic properties of ultrasound versus clinical evaluation of synovitis in rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized study. *Arthritis Rheum*. 2012 Apr;64(4):1272-82. doi: 10.1002/art.33491. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22131049.
- (28) Jimenez-Boj E, Nöbauer-Huhmann I, Hanslik-Schnabel B, Schett G. Bone erosions and bone marrow edema as defined by magnetic resonance imaging reflect true bone marrow inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Apr;56(4):1118-24. doi: 10.1002/art.22496. PMID: 17393390.
- (29) Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Dijkmans BA. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2005 Nov;52(11):3381-90. doi: 10.1002/art.21405. PMID: 16258899.
- (30) Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Spencer-Green GT. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):26-37. doi: 10.1002/art.21519. PMID: 16385520.

- (31) Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, TEMPO (Trial of Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004 Feb 28;363(9410):675-81. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15640-7. PMID: 15001324.
- (32) Dougados M, Kissel K, Conaghan PG, Huizinga TW. Clinical, radiographic and immunogenic effects after 1 year of tocilizumab-based treatment strategies in rheumatoid arthritis: the ACT-RAY study. *Ann Rheum Dis*. 2014 May;73(5):803-9. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204761. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24473673; PMCID: PMC3995223.
- (33) Kaneko Y, Atsumi T, Tanaka Y, Takeuchi T. Comparison of adding tocilizumab to methotrexate with switching to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis with inadequate response to methotrexate: 52-week results from a prospective, randomised, controlled study (SURPRISE study). *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov;75(11):1917-1923. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208426. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26733110; PMCID: PMC5099201.
- (34) Aoust L, Rossi-Semerano L, Koné-Paut I, Dusser P. Time to diagnosis in juvenile idiopathic arthritis: a french perspective. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Feb 28;12(1):43. doi: 10.1186/s13023-017-0586-4. PMID: 28241879; PMCID: PMC5329952.
- (35) Buckley L, Ware E, Kreher G, Wiater L, Mehta J, Burnham JM. Outcome Monitoring and Clinical Decision Support in Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol*. 2020 Feb;47(2):273-281. doi: 10.3899/jrheum.190268. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31308202.
- (36) Moroz OV, Blagova EV, Wilkinson AJ, Bronstein IB. The crystal structures of human S100A12 in apo form and in complex with zinc: new insights into S100A12 oligomerisation. *J Mol Biol*. 2009 Aug 21;391(3):536-51. doi: 10.1016/j.jmb.2009.06.004. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19501594.
- (37) Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965 Jun 9;19(6):739-44. doi: 10.1016/0006-291x(65)90320-7. PMID: 4953930.
- (38) Pruenster M, Vogl T, Roth J, Sperandio M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther*. 2016 Nov;167:120-131. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.07.015. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27492899.
- (39) Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Jul;33(7):637-68. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00046-2. PMID: 11390274.

- (40) Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, Roth J. Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1286-95. doi: 10.1002/art.20125. PMID: 15077313.
- (41) Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Roth J. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Nov;42(11):1383-9. doi: 10.1093/rheumatology/keg385. Epub 2003 Jun 27. PMID: 12832707.
- (42) Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2010 Apr;69(4):677-82. doi: 10.1136/ard.2009.114363. Epub 2009 Sep 17. PMID: 19762364.
- (43) Bae CB, Suh CH, An JM, Kim HA. Serum S100A12 may be a useful biomarker of disease activity in adult-onset Still's disease. *J Rheumatol.* 2014 Dec;41(12):2403-8. doi: 10.3899/jrheum.140651. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25274901.
- (44) Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 1999 Jun 25;97(7):889-901. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80801-6. PMID: 10399917.
- (45) Foell D, Wittkowski H, Kessel C, Roth J. Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jun 15;187(12):1324-34. doi: 10.1164/rccm.201209-1602OC. PMID: 23611140.
- (46) Liu K, Pichichero ME. Clinical significance of serum S100A12 in acute otitis media in young children. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Mar;31(3):e56-8. doi: 10.1097/INF.0b013e31824672cb. PMID: 22198825; PMCID: PMC3308144.
- (47) Reis RA, Bortot LO, Caliri A. In silico assessment of S100A12 monomer and dimer structural dynamics: implications for the understanding of its metal-induced conformational changes. *J Biol Inorg Chem.* 2014 Oct;19(7):1113-20. doi: 10.1007/s00775-014-1149-y. Epub 2014 Jun 19. PMID: 24944024.
- (48) Gerss J, Roth J, Holzinger D, Foell D; Paediatric Rheumatology International Trials Organization (PRINTO). Phagocyte-specific S100 proteins and high-sensitivity C reactive protein as biomarkers for a risk-adapted treatment to maintain remission in juvenile idiopathic arthritis: a comparative study. *Ann Rheum Dis.* 2012 Dec;71(12):1991-7. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201329. Epub 2012 Jun 11. PMID: 22689317.
- (49) Moroz OV, Antson AA, Dodson EJ, Bronstein IB. The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002 Mar;58(Pt 3):407-

13. doi: 10.1107/s0907444901021278. Epub 2002 Feb 21. PMID: 11856825.
- (50) Kessel C, Fuehner S, Zell J, Foell D. Calcium and zinc tune autoinflammatory Toll-like receptor 4 signaling by S100A12. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Oct;142(4):1370-1373.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2018.06.027. Epub 2018 Jul 3. PMID: 30010542.
- (51) Orczyk K, Smolewska E. A Granulocyte-Specific Protein S100A12 as a Potential Prognostic Factor Affecting Aggressiveness of Therapy in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Immunol Res*. 2018 Oct 22;2018:5349837. doi: 10.1155/2018/5349837. PMID: 30426025; PMCID: PMC6217747.
- (52) Kristensen P, Winter G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold Des*. 1998;3(5):321-8. doi: 10.1016/S1359-0278(98)00044-3. PMID: 9806934.
- (53) Jackson E, Little S, Franklin DS, Gaddy JA, Damo SM. Expression, Purification, and Antimicrobial Activity of S100A12. *J Vis Exp*. 2017 May 13;(123):55557. doi: 10.3791/55557. PMID: 28570542; PMCID: PMC5607942.
- (54) Giancane G, Consolaro A, Lanni S, Davì S, Schiappapietra B, Ravelli A. Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment. *Rheumatol Ther*. 2016 Dec;3(2):187-207. doi: 10.1007/s40744-016-0040-4. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27747582; PMCID: PMC5127964.
- (55) Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician*. 2011 Dec 1;84(11):1245-52. PMID: 22150658
- (56) Kucuk A, Gezer IA, Ucar R, Karahan AY. Familial Mediterranean Fever. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2014;57(3):97-104. doi: 10.14712/18059694.2014.47. PMID: 25649364.
- (57) Buchanan WW, Tugwell P. Traditional assessments of articular diseases. *Clin Rheum Dis*. 1983 Dec;9(3):515-29. PMID: 6653079.
- (58) Sabri K, Saurenmann RK, Silverman ED, Levin AV. Course, complications, and outcome of juvenile arthritis-related uveitis. *J AAPOS*. 2008 Dec;12(6):539-45. doi: 10.1016/j.jaapos.2008.03.007. Epub 2008 Sep 12. PMID: 18789737.
- (59) Ozen S, Demirkaya E, Erer B, Carmona L. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):644-51. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208690. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26802180.
- (60) Smolen JS, Aletaha D. Monitoring rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 May;23(3):252-8. doi: 10.1097/BOR.0b013e328345743a. PMID: 21427576.
- (61) Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(7):949-55. doi: 10.1172/JCI14002. PMID: 11581294; PMCID: PMC200958.

- (62) Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985 Jun 14;228(4705):1315-7. doi: 10.1126/science.4001944. PMID: 4001944.
- (63) Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. 1988 Dec 20;73(2):305-18. doi: 10.1016/0378-1119(88)90495-7. PMID: 3149606.
- (64) Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Mar;14(3):359-66. doi: 10.1002/ibd.20336. PMID: 18050298.
- (65) Heida A, Van de Vijver E, Muller Kobold A, van Rheenen P. Selecting children with suspected inflammatory bowel disease for endoscopy with the calgranulin C or calprotectin stool test: protocol of the CACATU study. *BMJ Open*. 2017 May 29;7(5):e015636. doi: 10.1136/bmjopen-2016-015636. PMID: 28554936; PMCID: PMC5730001.
- (66) Hinze CH, Foell D, Johnson AL, Lovell DJ. Serum S100A8/A9 and S100A12 Levels in Children With Polyarticular Forms of Juvenile Idiopathic Arthritis: Relationship to Maintenance of Clinically Inactive Disease During Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Occurrence of Disease Flare After Discontinuation of Therapy. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Mar;71(3):451-459. doi: 10.1002/art.40727. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30225949; PMCID: PMC6393224.
- (67) Xu K, Geczy CL. IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *J Immunol*. 2000 May 1;164(9):4916-23. doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4916. PMID: 10779802
- (68) Wittkowski H, Sturrock A, van Zoelen MA, Viemann D, van der Poll T, Hoidal JR, Roth J, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2007 May;35(5):1369-75. doi: 10.1097/01.CCM.0000262386.32287.29. PMID: 17414728.
- (69) Yang Z, Yan WX, Cai H, Geczy CL. S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jan;119(1):106-14. doi: 10.1016/j.jaci.2006.08.021. Epub 2006 Oct 6. PMID: 17208591.
- (70) Armaroli G, Verweyen E, Pretzer C, Kessel C. Monocyte-Derived Interleukin-1 β As the Driver of S100A12-Induced Sterile Inflammatory Activation of Human Coronary Artery Endothelial Cells: Implications for the Pathogenesis of Kawasaki Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2019 May;71(5):792-804. doi: 10.1002/art.40784. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30447136.

- (71) Angelopoulou E, Paudel YN, Piperi C. Unraveling the Role of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Its Ligands in Myasthenia Gravis. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Mar 4;11(5):663-673. doi: 10.1021/acschemneuro.9b00678. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32017530.
- (72) Wang X, Sun Z, Tian W, Piao C, Xie X, Zang J, Peng S, Yu X, Wang Y. S100A12 is a promising biomarker in papillary thyroid cancer. *Sci Rep*. 2020 Feb 3;10(1):1724. doi: 10.1038/s41598-020-58534-1. PMID: 32015423; PMCID: PMC6997206.
- (73) Elamin AA, Klunkelfuß S, Kämpfer S, Singh M. A Specific Blood Signature Reveals Higher Levels of S100A12: A Potential Bladder Cancer Diagnostic Biomarker Along With Urinary Engrailed-2 Protein Detection. *Front Oncol*. 2020 Jan 9;9:1484. doi: 10.3389/fonc.2019.01484. PMID: 31993369; PMCID: PMC6962349.
- (74) Li D, Zeng Z, Yu T, Qin J, Wu J, Song JC, Zhou ZY, Yuan JP. Expression and clinical implication of S100A12 in gastric carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 May;37(5):6551-9. doi: 10.1007/s13277-015-4460-5. Epub 2015 Dec 5. PMID: 26638166.
- (75) Moroz OV, Antson AA, Grist SJ, Maitland NJ, Dodson GG, Wilson KS, Lukanidin E, Bronstein IB. Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003 May;59(Pt 5):859-67. doi: 10.1107/s0907444903004700. Epub 2003 Apr 25. PMID: 12777802.
- (76) Pietzsch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation? *Amino Acids*. 2009 Mar;36(3):381-9. doi: 10.1007/s00726-008-0097-7. Epub 2008 Apr 29. PMID: 18443896.
- (77) Chang CC, Khan I, Tsai KL, Li H, Yang LW, Chou RH, Yu C. Blocking the interaction between S100A9 and RAGE V domain using CHAPS molecule: A novel route to drug development against cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov;1864(11):1558-69. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.08.008. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27524699.
- (78) Foell D, Kucharzik T, Kraft M, Vogl T, Sorg C, Domschke W, Roth J. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003 Jun;52(6):847-53. doi: 10.1136/gut.52.6.847. PMID: 12740341; PMCID: PMC1773692.
- (79) Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Jun;1867(6):118677. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118677. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32057918.
- (80) Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, Arner P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):105-9. doi:

- 10.2337/db09-0942. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19846802; PMCID: PMC2797910.
- (81) Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, Schlag PM, Shoemaker RH. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology*. 2006 Nov;131(5):1486-500. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.041. Epub 2006 Aug 22. PMID: 17101323.
- (82) Stein U, Arlt F, Smith J, Sack U, Herrmann P, Walther W, Lemm M, Fichtner I, Shoemaker RH, Schlag PM. Intervening in β -catenin signaling by sulindac inhibits S100A4-dependent colon cancer metastasis. *Neoplasia*. 2011 Feb;13(2):131-44. doi: 10.1593/neo.101172. PMID: 21403839; PMCID: PMC3033592.
- (83) Aguilar-Morante D, Morales-Garcia JA, Santos A, Perez-Castillo A. CCAAT/enhancer binding protein β induces motility and invasion of glioblastoma cells through transcriptional regulation of the calcium binding protein S100A4. *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):4369-84. doi: 10.18632/oncotarget.2976. PMID: 25738360; PMCID: PMC4414196.
- (84) Liu J, Xu ZM, Qiu GB, Zheng ZH, Sun KL, Fu WN. S100A4 is upregulated via the binding of c-Myb in methylation-free laryngeal cancer cells. *Oncol Rep*. 2014 Jan;31(1):442-9. doi: 10.3892/or.2013.2824. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24174222.
- (85) Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Type 2 diabetes - An autoinflammatory disease driven by metabolic stress. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Nov;1864(11):3805-3823. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.034. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30251697.
- (86) Chen H, Fernig DG, Rudland PS, Sparks A, Wilkinson MC, Barraclough R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Sep 7;286(5):1212-7. doi: 10.1006/bbrc.2001.5517. PMID: 11527429.
- (87) Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Mar;87(3):235-47. doi: 10.1007/s00109-009-0439-2. Epub 2009 Feb 3. PMID: 19189073; PMCID: PMC2659764.
- (88) Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1776-84. doi: 10.1172/JCI20530. PMID: 14679171; PMCID: PMC297008.
- (89) Zhang G, Li M, Jin J, Bai Y, Yang C. Knockdown of S100A4 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma cells by repression of matrix metalloproteinase-9. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(8):2075-80. PMID: 22292654.

- (90) Dahlmann M, Sack U, Herrmann P, Lemm M, Fichtner I, Schlag PM, Stein U. Systemic shRNA mediated knock down of S100A4 in colorectal cancer xenografted mice reduces metastasis formation. *Oncotarget*. 2012 Aug;3(8):783-97. doi: 10.18632/oncotarget.572. PMID: 22878175; PMCID: PMC3478456.
- (91) Zhang K, Yu M, Hao F, Dong A, Chen D. Knockdown of S100A4 blocks growth and metastasis of anaplastic thyroid cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biomark*. 2016 Sep 26;17(3):281-291. doi: 10.3233/CBM-160640. PMID: 27802204.
- (92) Bian Y, Guo J, Qiao L, Sun X. miR-3189-3p Mimics Enhance the Effects of S100A4 siRNA on the Inhibition of Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells by Targeting CFL2. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 13;19(1):236. doi: 10.3390/ijms19010236. PMID: 29342841; PMCID: PMC5796184.
- (93) Klingelhöfer J, Grum-Schwensen B, Beck MK, Ambartsumian N. Anti-S100A4 antibody suppresses metastasis formation by blocking stroma cell invasion. *Neoplasia*. 2012 Dec;14(12):1260-8. doi: 10.1593/neo.121554. PMID: 23308057; PMCID: PMC3540950.
- (94) Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J, Beck M, Bonefeld CM, Hamerlik P, Guldberg P, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. S100A4-neutralizing antibody suppresses spontaneous tumor progression, pre-metastatic niche formation and alters T-cell polarization balance. *BMC Cancer*. 2015 Feb 12;15:44. doi: 10.1186/s12885-015-1034-2. PMID: 25884510; PMCID: PMC4335362.
- (95) Hernández JL, Padilla L, Dakhel S, Messeguer R. Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e72480. doi: 10.1371/journal.pone.0072480. PMID: 24023743; PMCID: PMC3762817.
- (96) Sack U, Walther W, Scudiero D, Stein U. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/ β -catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2011 Sep;22(18):3344-54. doi: 10.1091/mbc.E10-09-0739. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21795396; PMCID: PMC3172260.
- (97) Sack U, Walther W, Scudiero D, Stein U. Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Jul 6;103(13):1018-36. doi: 10.1093/jnci/djr190. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21685359.
- (98) Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M, Sorg C. Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. *Int Immunol*. 2000 Nov;12(11):1593-604. doi: 10.1093/intimm/12.11.1593. PMID: 11058579.
- (99) Sack U, Walther W, Scudiero D, Stein U. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/ β -catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2011 Sep;22(18):3344-

54. doi: 10.1091/mbc.E10-09-0739. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21795396; PMCID: PMC3172260.
- (100) Stein U, Arlt F, Smith J, Schlag PM. Intervening in β -catenin signaling by sulindac inhibits S100A4-dependent colon cancer metastasis. *Neoplasia*. 2011 Feb;13(2):131-44. doi: 10.1593/neo.101172. PMID: 21403839; PMCID: PMC3033592.
- (101) Brini M, Ottolini D, Cali T, Carafoli E. Calcium in health and disease. *Met Ions Life Sci*. 2013;13:81-137. doi: 10.1007/978-94-007-7500-8_4. PMID: 24470090.
- (102) Miller P, Kidwell KM, Thomas D, Lippman ME. Elevated S100A8 protein expression in breast cancer cells and breast tumor stroma is prognostic of poor disease outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Nov;166(1):85-94. doi: 10.1007/s10549-017-4366-6. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28717852.
- (103) O'Connell PA, Surette AP, Liwski RS, Svenningsson P, Waisman DM. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood*. 2010 Aug 19;116(7):1136-46. doi: 10.1182/blood-2010-01-264754. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20424186.
- (104) Dahlmann M, Kobelt D, Walther W, Mudduluru G, Stein U. S100A4 in Cancer Metastasis: Wnt Signaling-Driven Interventions for Metastasis Restriction. *Cancers (Basel)*. 2016 Jun 20;8(6):59. doi: 10.3390/cancers8060059. PMID: 27331819; PMCID: PMC4931624.
- (105) Bjørnland K, Winberg JO, Odegaard OT, Maelandsmo GM. S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4702-8. PMID: 10493528.
- (106) Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, Goldbach-Mansky R, Kallinich T, Kuemmerle-Deschner J, Frühwald MC, Dassmann S, Pham TH, Roth J, Foell D. S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3924-31. doi: 10.1002/art.24137. PMID: 19035478; PMCID: PMC2680303.
- (107) Ralli M, Angeletti D, Fiore M, D'Aguzzo V, Lambiase A, Artico M, de Vincentiis M, Greco A. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmun Rev*. 2020 Oct;19(10):102649. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102649. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32805423
- (108) DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018 Jun 16;391(10138):2449-2462. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5. PMID: 29916386; PMCID: PMC6661119
- (109) Terao C, Ohmura K, Kochi Y, et al A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative

- rheumatoid arthritis in Japanese subjects *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011;70:2134-2139
- (110) Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903-11. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06075-5. PMID: 11567728
- (111) Pincus T, Sokka T. How can the risk of long-term consequences of rheumatoid arthritis be reduced? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001 Mar;15(1):139-70. doi: 10.1053/berh.2000.0131. PMID: 11358420
- (112) Sönmez HE, Batu ED, Özen S. Familial Mediterranean fever: current perspectives. *J Inflamm Res*. 2016 Mar 17;9:13-20. doi: 10.2147/JIR.S91352. PMID: 27051312; PMCID: PMC4803250
- (113) Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Lancet*. 2016 Jun 25;387(10038):2641-2654. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01274-X. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26719234
- (114) Leitlinie „Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten“, Stand 01.04.2018
- (115) Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol*. 2018 Feb;48(2):230-238. doi: 10.1002/eji.201746947. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29148036
- (116) Ankli B, Krähenbühl S. Therapie der Gicht [Gout management: an update]. *Ther Umsch*. 2016;73(3):115-24. German. doi: 10.1024/0040-5930/a000766. PMID: 27008442
- (117) Mikuls TR, Payne JB, Deane KD, Thiele GM. Autoimmunity of the lung and oral mucosa in a multisystem inflammatory disease: The spark that lights the fire in rheumatoid arthritis? *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Jan;137(1):28-34. doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.024. PMID: 26768760
- (118) Wasserman A. Rheumatoid Arthritis: Common Questions About Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2018 Apr 1;97(7):455-462. PMID: 29671563
- (119) Wang KK, Yang Z, Zhu T, Shi Y, Rubenstein R, Tyndall JA, Manley GT. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 Feb;18(2):165-180. doi: 10.1080/14737159.2018.1428089. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29338452; PMCID: PMC6359936.
- (120) Lee CM, Iorno N, Sierro F, Christ D. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat Protoc*. 2007;2(11):3001-8. doi: 10.1038/nprot.2007.448. PMID: 18007636.
- (121) Fuehner S, Foell D, Kessel C. Purification of Human S100A12 and Its Ion-induced Oligomers for Immune Cell Stimulation. *J Vis Exp*. 2019 Sep 29;(151). doi: 10.3791/60065. PMID: 31609337.
- (122) Brown KL, Lubieniecka JM, Armaroli G, Kessel K, Gibson KM, Graham J, Liu D, Hancock REW, Ross CJ, Benseler SM, Luqmani RA, Cabral DA, Foell D, Kessel C. S100A12 Serum Levels and PMN Counts Are Elevated in Childhood Systemic Vasculitides Especially

Involving Proteinase 3 Specific Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies.
Front Pediatr. 2018 Nov 23;6:341. doi: 10.3389/fped.2018.00341.
PMID: 30533405; PMCID: PMC6266798.

- (123) Silverstein, A. Autoimmunity versus horror autotoxicus: The struggle for recognition. Nat Immunol 2, 279–281 (2001). <https://doi-org.emedien.ub.uni-muenchen.de/10.1038/86280>

7. Anhang

7.1. Klassifikation der ILAR

Kategorien	Definition
1. Systemische Arthritis	Arthritis und Fieber (intermittierend, Dauer mindestens 2 Wochen) und mindestens ein weiteres Kriterium: flüchtiger erythematöser Hautausschlag, generalisierte Lymphknotenvergrößerung, Hepatomegalie/oder Splenomegalie, Serositis
2. Oligoarthritis - persistierend - erweitert	Arthritis von 1 bis 4 Gelenken innerhalb der ersten 6 Erkrankungsmonate kumulativ im Verlauf maximal 4 Gelenke in den Entzündungsprozess einbezogen nach den ersten 6 Erkrankungsmonaten > 4 Gelenke in den Entzündungsprozess einbezogen
3. Rheumafaktor negative Polyarthritis	Arthritis in >4 Gelenken während der ersten 6 Erkrankungsmonate und negativer Test auf Rheumafaktoren
4. Rheumafaktor positive Polyarthritis	Arthritis in >4 Gelenken während der ersten 6 Erkrankungsmonate und positiver Test auf RF (mindestens 2mal im Abstand von 3 Monaten)
5. Psoriasisarthritis	Arthritis und Psoriasis, oder Arthritis und mindestens zwei der folgenden Kriterien: Daktylitis; Nagelveränderungen (Tüpfelung oder Onycholyse); Psoriasis bei einem Verwandten 1. Grades

6. Enthesitis-assoziierte Arthritis	Arthritis und Enthesitis oder Arthritis und mindestens zwei der folgenden Kriterien: Druckschmerz über den Iliosakralgelenken und/oder entzündlicher Rückenschmerz lumbosakral; HLA-B27-Nachweis; Junge mit einem Erkrankungsbeginn > 6 Jahre; akute (symptomatische) anteriore Uveitis; ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroilitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom oder akute anteriore Uveitis bei einem Angehörigen 1. Grades
5. andere Arthritis	Arthritiden, die nicht eindeutig den definierten Subgruppen 1-6 zugeordnet werden können

Quelle: S2k-Leitlinie „Therapie der Juvenilen Idiopathischen Arthritis“
(letzte Überarbeitung 04/2018)

7.2. Klassifikationskriterien für die RA

Score	Kriterien	Stadien			
		Remission	niedrige Krankheitsaktivität	moderate Krankheitsaktivität	hohe Krankheitsaktivität
DAS28-ESR	<ul style="list-style-type: none"> - druckschmerzhafte Gelenke - geschwollen Gelenke (von max. 28 Gelenken), - Blutsenkungs Geschwindigkeit (mm/h) - Aktivitätslevel 	< 2,6	2,6 bis 3,2	> 3,2 bis ≤ 5,1	> 5,1

DAS28- CRP	- druckschmerzhafte Gelenke - geschwollen Gelenke (von max. 28 Gelenken), - C-reaktives Protein (mg/l) - Aktivitätslevel	< 2,6	2,6 bis 3,2	> 3,2 bis ≤ 5,1	> 5,1
SDAI	- druckschmerzhafte Gelenke - geschwollen Gelenke (von max. 28 Gelenken) - C-reaktives Protein (mg/l) - Krankheitsaktivität (durch Untersucher ermittelt) - Krankheitsaktivität (durch Patient ermittelt)	< 3,3	> 3,3 bis ≤ 11	> 11 bis ≤ 26	> 26
CDAI	- druckschmerzhafte Gelenke - geschwollen Gelenke (von max. 28 Gelenken) - Krankheitsaktivität (durch Untersucher ermittelt) - Krankheitsaktivität (durch Patient ermittelt)	< 2,8	> 2,8 bis ≤ 10	> 10 bis ≤ 22	> 22

Quelle: S2e-Leitlinie: „Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten“
(3. Auflage, 2019)

7.3. S100 Proteine

S100 Protein	Synonym	Expression	Funktion	Interaktion	assoziierte Pathologie	Regulation	Referenz
S100A1	S100 alpha	Skelettmuskel-faser, Kardiomyozyten, neuronale Populationen	<p><u>Extrazellulär:</u> internalisiert in Neuronen and transportiert zu Endosomen, Golgi-Apparat und Lysosomen. Verstärkt den Calcium-Einstrom in Kardiomyozyten</p> <p><u>Intrazellulär:</u> assoziiert mit zytoskeletalen Komponenten, interagiert mit $SRCa^{2+}$-ATPase und RyR2 im Herzen, Verbesserung der Kontraktilität</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> RAGE.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> SERCA, RyR1 und 2, Fructose-bisphosphate aldolase</p>	S100A1 Defizit verursacht eine abnormale $SRCa^{2+}$ -Funktion mit Verschlechterung der kardialen Funktion bis zum Herzversagen	Hemmende Transkriptionsfaktoren mit runterregulierung von GPCRs und PKC	[80], [81], [82]
S100A2	S100L, CAN19	Urotheliales, respiratorisches, gastrointestinales Epithel und Plattenepithel	<p><u>Extrazellulär:</u> chemotaktische Faktoren für Eosinophile.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> bindet p53 und potenziert Tumorsuppressor Aktivität</p>	<u>Extrazellulär:</u> RAGE.	Aktivitätsminderung sowie -steigerungen in vielen Krebserkrankungen	–	[83], [84]
S100A3	S100E	Haarwurzeln, vereinzelt Astrozytome	Epithelzell-Differenzierung und Calcium-abhängige Haarschutz Funktion	RAR α	Involviert in HCC Tumorigenese und Tumor-Aggressivität	–	[85], [86]

S100A4	Metastasin1 (Mts1) Calvasculin	Tumor und Stromazellen, Myeloide Zellen, Adipozyten, Fibroblast, Immunozyt, vasculäre Zelle	<p><u>Extrazellulär:</u> Schlüsselrolle in Tumorzellüberleben und Metastasierung. Aktivierung von NF-κB, induzieren der Produktion von proinflammatorische Cytokine und Migration von Neutrophilen, Monocyten und Makrophagen. Aktiviert ERK1/2, Modulation von Wachstum und Überleben.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Induzieren von MMP Expression und interagieren mit Den zytoskeletalen Proteinen NMIIA, Tropomyosin und Aktin um die Zellmigration zu fördern.</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> RAGE, EGFR, Gαq-paar Rezeptor.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> NMIIA, Tropomyosin, Aktin, p53, S100A1, Annexin 2</p>	Hochreguliert in vielen Krebsformen	Hochreguliert in β-Catenin/T-Zellfaktor Komplexen	[87, 88, 89]
S100A5	S100D	–	–	RAGE	Hochreguliert in Blasenkrebs und wiederkehrendem Grad 1 Meningiomen	–	[90]

S100A6	Calcylin (CACY)	Epithelzellen, Fibroblasten und verschiedene Krebszellen	<p><u>Extrazellulär:</u> Aktiviert RAGE und fördert Apoptosis. Stimuliert Insulin-Ausschüttung von Pankreas-Inselzellen.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Interagiert mit Caldesmon, Calponin, Tropomyosin und Kinesin zu modulierten Zellproliferationen, zytoskeletaler Dynamik und Tumorgenese</p>	<u>Extrazellulär:</u> RAGE	Überexprimiert in AT.	–	[91]
S100A7	Psoriasin1 (PSOR1)	Keratinocyten	<p><u>Extrazellulär:</u> Signale durch RAGE um NF-κB zu aktivieren, induzieren der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Migration von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> fördert aggressive Eigenschaften in Brustkrebs durch Stimulierung von Akt und NF-κB</p>	<u>Extracellär:</u> RAGE	Überexpresssion induziert Leukozyten Infiltration verbunden mit inflammatorische Haut-Erkrankung wie Psoriasis	Hochregulierung in Brustkrebs durch proinflammatorische Zytokine und in Keratinocyten durch IL-17, IL-22 und Flagellin	[92, 93]

S100A8	Calgranulin-A (CAGA), Calprotectin 1 L1	Makrophagen, dendritische Zellen, mikrovakuolare endotheliale Zellen, epitheliale Zellen, epitheliale Zellen und Fibroblasten durch Aktivierung	<p><u>Extrazellulär:</u> Reguliert Inflammation, chemotaktische Faktoren für Neutrophile. Induziert Zelldifferenzierung und TNF-α and IL-1β Produktion in myeloiden Zellen. Stabilisierung von NO in Neutrophilen, schützen von oxidativem Schäden in entzündlichen Läsionen.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Stimuliert Keratinozyten-Differenzierung und übt anti-inflammatorische Effekte aus.</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> GPCR, TLR4, Scavenger Rezeptor CD36.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> telomerase</p>	Überexprimiert in inflammatorische und autoimmune Bedingungen	Induziert durch proinflammatorische Stimuli, TLR Agonisten und oxidativer Stress in IL-10 abhängigem Umfeld	[94], [95], [96], [97]
S100A9	Calgranulin-B (CAGB), Calprotectin L1H	Monozyten Neutrophile und dendritische Zellen; Fibroblasten, reife Makrophagen, vasculär-endotheliale Zellen und Keratinozyten unter Aktivierung	<p><u>Extrazellulär:</u> Involviert in Leukozyten Migration, Chemotatische für Neutrophile. Induziert TNF-α, IL-1β, IL-6 und IL-8 in Makrophagen durch TNF-α Aktivierung.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Hemmung von Myeloid-Differenzierung und Akkumulation von Myeloid-abgeleiteter Suppressorzelle</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> RAGE, TLR4, Scavenger receptor CD36</p>	Anti-inflammatorisch in gesunden Zustand – bei oxidativem Stress Aktivierung von proinflammatorischen Funktionen. Trägt zur Pathogenese von autoimmunen Erkrankungen bei	Hochregulierung von oxidativem Stress, Corticosteroide, Zytokinen und Wachstumsfaktoren	[98, 99, 100]

			n durch ROS Generation, unterstützung von Tumorwachstum. Regulierung von S100A8/S100A9 Aktivität.				
S100A8/ S100A9	Calprotectin	Monozyten, Neutrophile und dendritischen Zellen. Fibroblasten, reife Makrophagen, vaskuläre Endothelzellen und Keratinozyten durch Aktivierung	<p><u>Extrazellulär:</u> Antimikrobiotische Eigenschaften. Chemotaktisch für Neutrophile. Reguliert inflammatorische Zellproliferation Differenzierung und Tumor-Entwicklung durch NF-κB-vermittelte Zytokinproduktion in Monozyten und Makrophagen.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Hemmung myeloider Zelldifferenzierung. Cytoplasmatischer Ca²⁺-Sensor mit verknüpftem Ca²⁺-Einstrom verbunden mit phagosomaler ROS Produktion. Induzieren mikrotubuläre Polymerisation und F-aktin Crosslinking.</p>	<u>Extrazellulär:</u> RAGE, Scavenger Rezeptor	Überexpression führt zu Resistenz von TNF-α-induzierter Apoptosis und induziert maligne Progression durch ROS-Produktion. Vermittlung von Differenzierung von psoriatischen Keratinozyten. Überexpression in Atherosklerotischen Läsionen und kardiovaskulären Events.	Regulierung durch autoinhibitorische Prozesse und folgender Restriktion der Inflammation	[101]

S100A10	Calpactin-1 (CAL-1L)	Makrophagen	Regulierung von zellulärer Plasmin Produktion: Plasminogen-Rezeptor, Vermittlung von Makrophagen-Rekrutment in Tumoren als Reaktion von inflammatorischen Stimuli. Gebunden an Annexin 2, dienen als Bindungsstruktur für Pathogene und Wirtsproteine. Spielt entscheidene Rolle in Angiogenese und endothelialer Zellfunktion.	Annexin2, Serotonin 1B Rezeptor	Beteiligt in Wirkungen von antidepressiven Medikamenten und elektroconvulsive Krampfanfällen aufgrund der Interaktion mit Serotonin-Rezeptoren	Induziert durch EGF, TGF- α , IFN- γ , NGF, KGF, RA und Thrombin, und durch die Onkogene PML-RAR α und Kras.	[79]
S100A11	S100C, Calgizarin	Chondrozyten, Gelbkörperzelle, Eileiter-epithelzelle	<u>Extrazellulär:</u> Fördert Chondrozyten Differenzierung und stimuliert RAGE-abhängige Typ-X-Kollagene und IL-8 Produktion. <u>Intrazellulär:</u> Bei Phosphorylierung durch PKC- α , Ca ²⁺ -Bindung an S100A11 hemmt Zellwachstum durch Aktivierung von Zellzyklus Modulator p21WAF1/CIP1	<u>Extazellulär:</u> RAGE. <u>Intrazellulär:</u> Nucleolin, Rad54B	Signal durch RAGE um p38 MAPK zu aktivieren, Beschleunigung von chondrozyten Hypertrophie und Matrix Katabolismus zur Förderung von Osteoarthritis Progression	Induzieren/ Freisetzung von Chondrozyten zum IL-1 β , TNF- α , und CXCL8 Release	[102]

S100A1 2	Calgranulin-C (CAGC)	Exprimiert in Neutrophilen, Monozyten, und frühen Makrophagen. Induziert in Endothelzellen und epithelzellen und proinflammatorischen Makrophagen unter inflammatorischen Bedingungen	<u>Extrazellulär:</u> Aktiviert NF-κB, induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, TNF-α und Chemokinen für den Rekrutment von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten. <u>Intrazellulär:</u> Moduliert Interaktionen zwischen zytoskeletalen Elementen und Membranen. Hemmt die Aggregation von Aldolase und GAPDH.	<u>Extrazellulär:</u> RAGE, GPCR, Scavenger Rezeptor. <u>Intrazellulär:</u> Aldolase, Nox-1.	Expression in Epithelzellen ist assoziiert mit Wachstumstillstand. Überexpression verursacht VSMC Dysfunktion und Aortenaneurysma.	TNF-α, IL-6 und Endotoxin induziert die Expression in Monozyten/Makrophagen, LPS in glatten Muskelzellen	[79]
S100A1 3	–	Fibroblasten, Osteoblasten und Melanomzellen	Involviert in Stress-induziertem Release von FGF-1 und IL-1α von verschiedenen Zelltypen. Fördert die eigene intrazelluläre Translokation. Spielt eine Schlüsselrolle im Tumorwachstum, Angiogenese und Metastierung.	<u>Extrazellulär:</u> RAGE. <u>Intrazellulär:</u> FGF-1, p40 Syt1	Überexpression assoziiert mit hoher intratumoraler Angiogenese und schlechter Prognose in Patienten mit Stage 1 NSCLC. Overexpression associated with high intratumoral angiogenesis and poor prognosis in patients with stage I NSCLC.	Induziert durch FGF1 und IL-1α durch intrazellulären Stressbedingungen	[104]

S100A1 4	–	Lymphozyten, Epithelzellen	<p><u>Extrazellulär:</u> in niedrigen Konzentrationen Proliferationsstimulierend, in hohen Konzentrationen Apoptose stimulierend in ESCC-Zellen durch den RAGE-Signalweg.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Vermutlich Tumorsuppressor-Wirkung über p53 Signalweg und Modulation der Expression von MMP1, MMP2 und MMP9</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> RAGE.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> p53</p>	Ektopische Überexpression fördert Beweglichkeit und Invasivität von ESCC Zellen.	Induziert durch EGF durch den p-ERK Signalweg in Brustkrebs Zellen	[79]
S100A1 5	S100A 7A	Keratinozyten in entzündeter Haut	<p>Rein funktionelle Rolle im angeborenen Immunsystem, epidermaler Zellreifung und epithelialer Tumorgenese. Wirkt als chemotaktischer Faktor für Monozyten und Granulozyten. Wirkt synergistisch mit S100A7 in Leukozyten in vitro und in vivo.</p>	GPCR	Potentielles therapeutisches Ziel für verschiedene menschliche Erkrankungen wie Arthritis und Krebs	Induziert durch LPS, IL-1 β und Th-1 Cytokine	[79]

S100A16	S100F	Astrozyten, Pre-adipocyten	Wirkt als neuer Adipogenese Promoter-Faktor, negative Effekte auf die Insulin Sensitivität	p53	Hochregulierung von verschiedenen Tumoren	Gesteigerte Expression in diät-induzierte übergewichtige Mäusen	[79]
S100B	–	Astrozyten, Schwann-Zellen, Melanozyten, Chondrozyten, Adipozyten, skeletale Muskelfaser, bestimmte dendritische Zellen und Lymphozyten Populationen	<p><u>Extrazellulär:</u> Freisetzung von Astrozyten, Signalweg über RAGE. In niedrigen Konzentrationen stimuliert Proliferation über ERK1/2 und NF-κB-vermittelte Hochregulierung von Bcl-2. In hohen Konzentrationen fördert es inflammatorische Aktivität und tötet Neuronen durch die ROS Produktion.</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Interagiert mit NDR-Kinasen und blockiert das Recruitment von den NDR-Kinase Produkten. Vermutlich Erhalt der Zellproliferation mit nützlichen Effekten während der Entwicklung und Gewebsregeneration sowie schädigenden Effekten während der Tumorgenese.</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> RAGE FGFR</p> <p><u>Intrazellulär:</u> Tubulin, Aktin-bindende Proteine, Annexin 6, Rac1, SRC Kinase, NDR Kinase, p53</p>	Involviert in Brain, Knorpel und Muskelregeneration, Aktivierung von Astrozyten in Gehirnschädigungen und neurodegenerativen Prozessen, Kardiomyozyten Remodelling nach Infarkten und in Melanom-Genese und Gliom-Genese	NF-κB, EGF and IFN-γ regulate S100B expression in several cell types.	[79]

S100xg	Calbindin-D9K (CABP 9K)	Epithelzellen	Modulation der Ca ²⁺ Adsorption in verschiedenen Geweben	–	–	–	[79]
S100P	S100E	Lymphozyten, Epithelzellen	<p><u>Extrazellulär:</u> Vermittelt Tumorwachstum und Medikamenten-Resistenzen von Tumoren über den RAGE-Signalweg</p> <p><u>Intrazellulär:</u> fördert transendotheliale Migration von Tumorzellen durch Reduktion von fokaler Adhäsion</p>	<p><u>Extrazellulär:</u> RAGE</p> <p><u>Intrazellulär:</u> ezrin/radixin /moesin, IQGAP1</p>	Überexpression in isolierten Tumoren, assoziiert mit Metastasierung, Medikamenten Resistenz und schlechtem klinischem Outcome.	–	
S100Z	–	Lymphozyten	–	–	Runterregulierung in verschiedenen Tumoren.	–	[79]

Quelle der Tabelle:

“Role of S100 proteins in health and disease” von Laura L.Gonzalez, June 2020 (79)

7.4. Konformationsänderung von S100A12

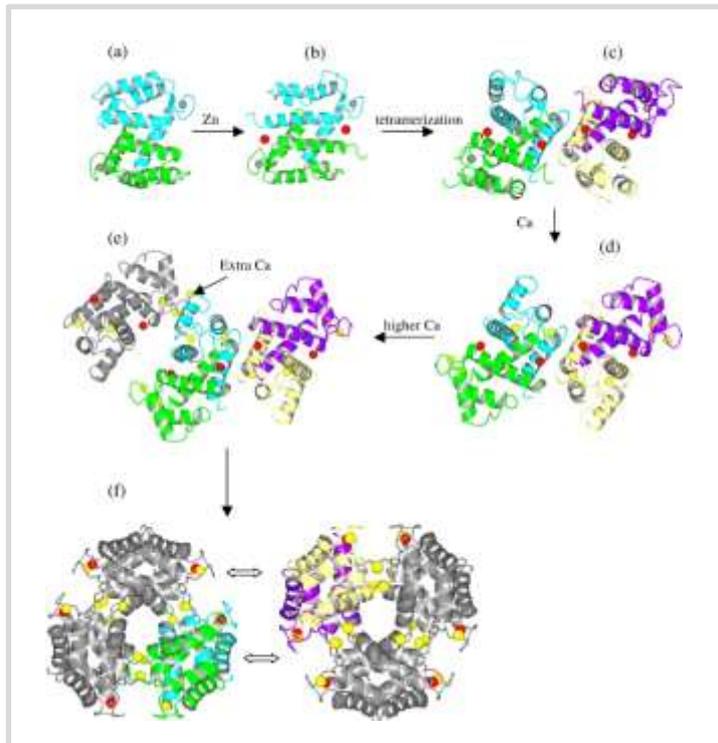


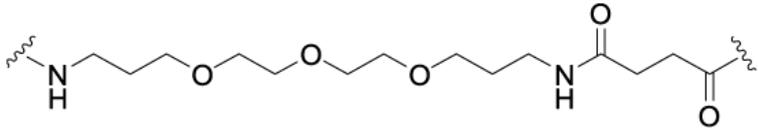
Abbildung 20: Konformationsänderung von S100A12

Konformationsänderung von zwei Dimeren (a,b) zur einer Tetramer Struktur (d) durch die Anwesenheit von Zink-Ionen. Durch Calcium-Ionen wird die Anlagerung von weiteren S100A12 Einheiten ermöglicht, sodass sich ein S100A12 Hexamer zusammenlagert (34).

7.5. Biotin-Struktur der Peptide

Peptide	Struktur	Bindungspartner
Biotin		Streptavidin, Avidin

7.6. Linker-Struktur der Peptide

Name	Anzahl an Aminosäuren	Struktur
Biotin	19	

7.7. Plasmidkarte eines pCMX2.5-mIgG2c-Fc-XP



Abbildung 21: Plasmidkarte eines pCMX2.5-mIgG2c-Fc-XP

Der Plasmidring codiert für eine Fc-Region eines IgG2c einer Maus. Die selektierten scFv-Sequenzen wurden zwischen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Nco1 und Not1 ligiert, so dass schließlich ein muriner Antikörper mit den selektierten Bindungsstellen geschaffen wurde

7.8. Chromatogramm aus Gelfiltration von S100A12 Hexamere, Tetramere und Dimere

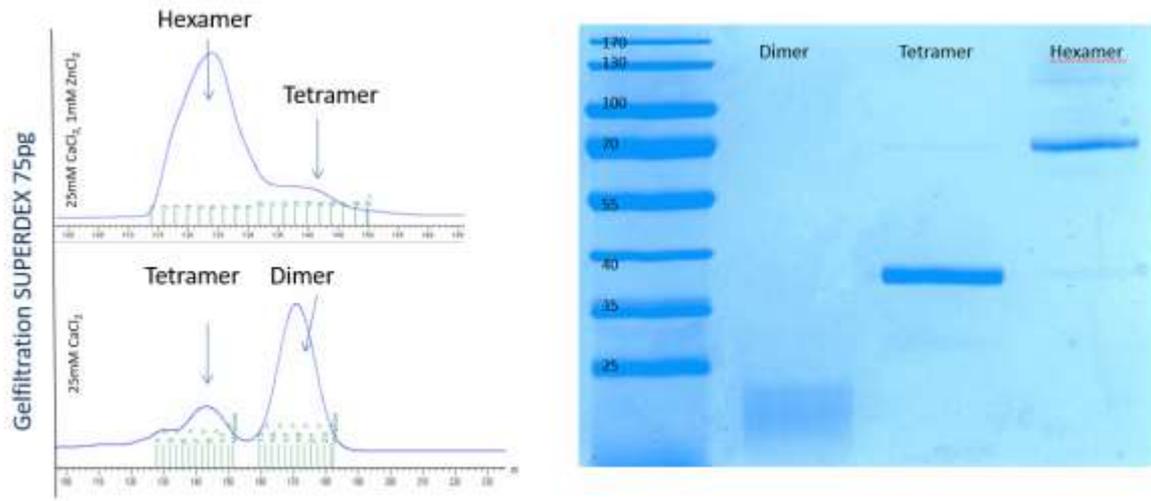


Abbildung 22: Chromatogramm aus Gelfiltration von S100A12 Hexamere, Tetramere und Dimere

7.8. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
AK	Antikörper
AMP	Ampicillin
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom; engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin; engl.: bovines serum albumin
Bzw.	Beziehungsweise
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein

dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Engl.	Englisch
FMF	Familiäres Mittelmeerfieber
GLU	Glukose
H	Stunde
HBS	HEPES gepufferte Saline
HEK	Engl.: Human Embryonic Kidney
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase; engl.: Horse raddish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
kDA	Kilodalton
Kan	Kanamycin
Min	Minute
MPBST	PBST mit 5% Milchpulver
MW	Molekulares Gewicht

NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NEB	Engl.: New England Biolabs
OD	optische Dichte (492-620 nm)
OPD	O-Phenylenediamin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit 0.05% Tween20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol/NaCl (1:1 Mischung von 25% Polyethylenglykol und 2,5M NaCl)
PEI	Polyethylenimine
PFU	plaquebildende Einheit; engl.: Plaque forming units
PTC	papillärer Schilddrüsenkrebs, <i>papillary thyroid cancer</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	Engl.: Rezeptor for advanced glycation end products
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rotationen per minute)
scFv	Engl.: single chain variable fragment
Tet	Tetracyclin
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
Vs.	Versus

7.9. Buchstabencode der Aminosäuren

Buchstaben	Abkürzung	Name
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asp	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Glu	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.10. Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Schema der Affinitätsselektion
- Abbildung 2: Bindung der Peptid präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Capture-ELISA)
- Abbildung 3: Bindung der scFv-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Capture-ELISA)
- Abbildung 4: Bindung der Peptid präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Bestätigungs-ELISA)
- Abbildung 5: Bindung der scFv-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer (Bestätigungs-ELISA)
- Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Bindungskurve der Peptid-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer
- Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Bindungskurve der scFv-präsentierenden Phagen an immobilisiertes S100A12 Hexamer
- Abbildung 8: Kompetitions-ELISA mit den Peptid-präsentierenden Phagen 4 und 10
- Abbildung 9: Kompetitions-ELISA mit den scFv-präsentierenden Phagen 4 und 10
- Abbildung 10: Bindung von synthetischen Peptiden an S100A12
- Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Bindung der Peptide an das Hexamer
- Abbildung 12: Peptid ELISA mit Tetramerüberschuss
- Abbildung 13: Aufreinigung von scFv-Fc-Konstrukt 41 über ÄKTATM
- Abbildung 14: Aufreinigung von scFv-Fc-Konstrukt 42 über ÄKTATM
- Abbildung 15: Bindung der scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 an S100A12 Hexamer
- Abbildung 16: Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42
- Abbildung 17: Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 mit Tetramerüberschuss
- Abbildung 18: Peptid 10 und scFv-Fc-Konstrukte 41 und 42 in gespiktem Plasma
- Abbildung 19: Peptid 4 mit crosslinked Hexamer versus „Wildtyp“ Hexamer
- Abbildung 20: Konformationsänderung von S100A12

Abbildung 21: Plasmidkarte eines pCMX2.5-mIgG2c-Fc-XP

Abbildung 22: Chromatogramm aus Gelfiltration von S100A12 Hexamere, Tetramere und Dimere

8. Schriftliche Erklärung

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

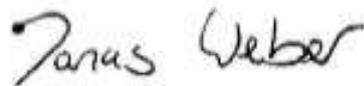
“Development of an ELISA specific for detection
of S100A12 hexamer“

in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der J.W.G.- Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von PD. Dr. Dr. med. C. Königs mit Unterstützung durch Prof. Dr. D. Schwabe ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

München, 22.08.2023

(Ort, Datum)



(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen