Charakterisierungen originärer IgE-Epitope der Majorallergene Bet v 1 und Phl p 5 durch Interaktionsanalysen mit rekombinanten humanen Antikörpern

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der
Naturwissenschaften
der Fakultät für
Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaf-
ten der Universität
Hamburg

vorgelegt von
Julia Hecker
aus Lingen

Hamburg 2011

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von März 2008 bis Juni 2011 am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg im Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Hahn

   Tag der Disputation: 07.10.2011

meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Allergie 2

1.1.1 Pathophysiologie der allergischen Soforttypreaktion 2

1.1.2 Allergiediagnostik und -therapie 9

1.1.3 Spezifische Immuntherapie 11

1.2 Allergene 14

1.2.1 Kreuzreaktivität 15

1.2.2 Bet v 1, Majorallergen des Birkenpollen 17

1.2.3 Phl p 5, Majorallergen des Wiesenlieschgrases 18

1.2.4 Allergenmodifikationen als neue Strategien der SIT 19

1.3 Kombinatorische Antikörperbibliotheken 23

1.4 Zielsetzung 25

2 MATERIAL 26

2.1 Enzyme und Standards 26

2.2 Antikörper 26

2.3 Chemikalien und Bioreagenzien 27

2.4 Affinitätsmatrizes 27

2.5 Bakterienstämme und Zelllinien 27

2.6 Vektoren 28

2.7 Oligonukleotide 28

2.8 Puffer und Lösungen 28

2.9 Medien 31

2.10 Verwendete Kits 32

2.11 Verbrauchsmaterialien 32

2.12 Geräte 32

3 METHODEN 34

3.1 Molekularbiologische Methoden 34

3.1.1 cDNA-Synthese 34

3.1.2 PCR 35

3.1.3 Ortsgerichtete Punktmutagenese 37

3.1.4 Klonierungen von Expressionsvektoren 38

3.1.4.1 Klonierungen prokaryotischer Expressionsvektoren 38

3.1.4.2 Klonierungen eukaryotischer Expressionsvektoren 40
3.1.5 Sequenzierung 41
3.2 Zellbiologische Methoden 42
3.2.1 Kultivieren und Passagieren von HEK293-, U937- und RBL 2H3Zellen 42
3.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl 44
3.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen 44
3.2.2 Expression in pro- und eukaryotischen Systemen 45
3.2.2.1 Expression von MBP-Fusionsproteinen in E. coli 45
3.2.2.2 Expression von CBD-Fusionskonstrukten in E. coli 46
3.2.2.3 Expression von Antikörperkonstrukten in HEK293-Zellen 47
3.3 Proteinbiochemische Methoden 48
3.3.1 Affinitätschromatographische Verfahren 48
3.3.1.1 Affininitätschromatographie mittels Protein L 48
3.3.1.2 Affinitätschromatographie mittels Antigen-Matrix 48
3.3.1.3 IMAC 50
3.3.1.4 Affinitätschromatographie mittels Amylose-Matrix 51
3.4 Proteinchemische Methoden 51
3.4.1 Biosensormessungen 51
3.4.2 Auswahl eines geeigneten Bindungsmodells 52
3.4.2.1 Immobilisierung der Liganden 55
3.4.2.2 Bindungsanalysen mit Antikörperkonstrukten 56
3.4.3 Durchflusszytometrie 56
3.5 Chemische Methoden 57
3.5.1 Biotinylierung von Proteinen mittels TFPA-PEG3-Biotin 57
3.6 Immunologische Methoden 58
3.6.1 ELISA 58
3.6.2 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von Antikörpern 59
3.6.3 Immunblot 60
3.6.4 Degranulationsanalysen humanisierter RBL-Zellen 60
3.7 Bioinformatische Methoden 61
4 ERGEBNISSE 63
4.1 Darstellung monoklonaler Antikörperkonstrukte 63
4.1.1 Expression Bet v 1- und Phl p 5-spezifischer Antikörperkonstrukte 66
4.1.1.1 Expression von IgE-Konstrukten 66

4.1.1.2 Expression von IgA-Konstrukten 69
4.1.1.3 Expression von IgG-Konstrukten 71
4.1.2 Chromatographische Reinigungen der Antikörperkonstrukte 72
4.2 Analysen der Allergen-Antikörper-Interaktionen 78
4.2.1 SPR-spektroskopische Messungen zur Bestimmung der Affinität 79
4.2.1.1 SPR-Messungen Bet v 1a-spezifischer Antikörperkonstrukte 80
4.2.1.2 SPR-Messungen Phl p 5a-spezifischer Antikörperkonstrukte 83
4.2.2 Bindung von Fcα -und FcγI-Rezeptoren 84
4.2.3 Quervernetzung membranständiger FcεI-Rezeptoren 85
4.2.3.1 Degranulationsanalysen mit Bet v 1-spezifischen IgE-Konstrukten 86
4.2.3.2 Degranulationsanalysen mit Phl p 5-spezifschen IgE-Konstrukten 90
4.2.4 Selektive Reaktivitäten der Antikörper mit Allergenen 95
4.2.5 Epitopcharakterisierungen 96
4.2.5.1 Bet v 1a-Epitopcharakterisierung 96
4.2.6 Phl p 5a-Epitopcharakterisierung 102
5 DISKUSSION 108
5.1 Darstellung und Reinigung der Antikörperkonstrukte 109
5.2 Interaktionsanalysen der Antikörperkonstrukte 114
5.2.1 SPR-spektroskopische Messungen 114
5.2.2 Rezeptorbindungen und Degranulationsanalysen 118
5.3 Epitopcharakterisierungen 119
5.4 Ausblick 126
6 ZUSAMMENFASSUNG 127
7 ABSTRACT 129
8 LITERATUR 131
9 ANHANG 141
9.1 Oligonukleotide 141
9.2 Sequenzdaten 142
9.3 Verwendete Vektoren 152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha (Immunglobulin A betreffend)
αBetv1	Anti-Bet v 1 (monoklonaler Antikörper mit Spezifität für Bet v 1a)
α-Helix	alpha-Helix
αPhlp5	Anti-Phl p 5 (monoklonaler Antikörper mit Spezifität für Phl p 5a)
A	Adenin
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	*antigen presenting cell*
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
β-tum	beta-*turn*
BCIP	Brom-chlor-enoylphosphat
BDT	Basophilen-Degranulationstest
bp	Basenpaare
Bromphenolblau	3´,3´´,5´,5´´-Tetrabromphenolsulfonphthalein
BSA	*bovine serum albumin*
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CCD	c*ross-reactive carbohydrate determinants*
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	komplementäre DNA
CDR	*complementarity determining region*
C_H	*constant heavy*
C_L	*constant light*
CMV	Cytomegalovirus
CpG	C*ytosine-phosphate-Guanine*
DC	*Dendritic cell*
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSA	*Datura stramonium agglutinin*
dsDNA	doppelsträngige DNA

DTT	Dithiothreitol
ε	epsilon (Immunglobulin E betreffend)
E. coli	*Escherichia coli*
EBV	Ebstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDC	*N-Ethyl-N`-(Dimethylaminopropyl)-Carboimid*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	*et altera*
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
Fab	*fragment antigen binding*
Fc	*fragment crystallizable*
FcR	Fc-Rezeptor
Fitc	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
γ	gamma (Immunglobulin G betreffend)
G	Guanin
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEK	*human embryonic kidney*
His	Histidin
HRP	*horseradish peroxidase*
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMAC	*Immobilized metal ion affinity chromatography*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IUIS	*International Union of International Societies*
kDa	Kilodalton
Lys	Lysin
MBP	Maltose-Bindeprotein
mcs	*multiple cloning site*
Met	Methionin
MHC	m*ajor histocompatibility complex*
MPBS	Milchpulver-PBS
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NFAT	*nuclear factor of activated T-cells*
NF-κB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*

Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ori	*origin of replication*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
Pen	Penicillin
PE	Phycoerythrin
pNAG	4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy-b-D-glucosamid
PNPP	*para*-Nitrophenylphosphat
PIT	Peptid-basierte spezifische Immuntherapie
RAST	*radioallergosorbent test*
RBL	*rat basophilic leukaemia*
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	*revolutions per minute*
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
scFv	*single chain variable fragment*
SCIT	subkutane spezifische Immuntherapie
Ser	Serin
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	sublinguale spezifische Immuntherapie
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SPR	*surface plasmon resonance*
ssDNA	einzelsträngige DNA
STAT	*signal transduction and activator of transcribtion*
Strep	Streptomycin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	*Thermus aquaticus*
TCR	*T cell receptor*
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Saccharose-Puffer
TGF	*tumor growth factor*
Thr	Threonin
T_H-Zelle	T-Helferzelle
TLR	toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat
TPBS	Tween-PBS
T_{reg}	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	*transformation and storage solution*
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat

U	*Unit*
UV	Ultraviolett
V_H	*variable heavy*
Val	Valin
V_L	*variable light*
v/v	*volume per volume*
WHO	*world health organisation*
w/v	*weight per volume*
xg	Mehrfaches der Gravitation

1 EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden jene Moleküle, deren Interaktion eine allergische Signalkaskade auslösen, rekombinant dargestellt und ihre Wechselwirkungen in verschiedenen Bindungsanalysen untersucht. Hierbei handelt es sich zum einen um Allergene aus dem Pollen der Birke und des Wiesenlieschgrases, zum anderen um allergenspezifische IgE-Antikörper. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit monoklonaler IgE-Antikörper, konnten bislang nur wenig Informationen über die molekularen Interaktionen zwischen IgE-Antikörpern und ihren spezifischen Allergenen erhalten werden oder Strukturen der Allergene, die eine Antikörperbindung vermitteln, identifiziert werden. Neue Erkenntnisse der molekularen Wechselwirkungen zwischen Allergenen und Antikörpern könnten einen tieferen Einblick in die komplexen immunologischen Abläufe allergischer Reaktionen erlauben, und die Grundlage zur Entwicklung verbesserter Therapiestrategien darstellen.

Zur Klonierung und eukaryotischen Expression Allergie-relevanter Antikörper-Isotypen mit Spezfität für die Allergene Bet v 1 bzw. Phl p 5 wurden variable Domänen originärer, humaner IgE-Antikörper verwendet, die zuvor anhand ihrer Reaktivitäten mit den Allergenen aus kombinatorischen Antikörper-Bibliotheken selektiert worden waren. Dargestellte Antikörperkonstrukte wurden durch Bindung an die jeweiligen Fc-Rezeptoren auf ihre Funktionalität getestet. Durch prokaryotische Expressionen der spezifischen Allergene wurden Interaktionsanaysen ermöglicht, die Untersuchungen zur Affinität der Antikörper an die Allergene, die Induzierung allergischer Effektormechanismen und finale Epitopcharakterisierungen, in denen essentielle Strukturen für die Antigen-Antikörper-Bindung identifiziert werden konnten, beinhalteten.

In diesem Kapitel sollen einleitend der immunologische Mechanismus der Allergie dargestellt und die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien erläutert werden. Die verwendeten Allergene und kombinatorischen Antikörperbibliotheken, die auf dem Prinzip des Phagendisplays beruhen, werden ebenfalls kurz vorgestellt.

1.1 Allergie

Als Allergie wird die krankhafte Immunantwort auf ein ansonsten nicht pathogenes Antigen bezeichnet. Derartige hypersensible Reaktionen wurden nach Gell und Coombs 1963 in 4 Typen unterteilt, wobei die Allergie meist mit der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I, der so genannten IgE-vermittelten Hypersensitivität vom Soforttyp gleichgesetzt wird (Gell und Coombs 1963). Sie ist die am häufigsten diagnostizierte Allergie und betrifft laut Schätzungen zurzeit mehr als 500 Millionen Menschen weltweit und 20-25% der Bevölkerung in den USA und Nordeuropa (Vrtala 2008).

Ebenfalls zu den allergischen Erkrankungen werden die zytotoxische allergische Reaktion (Typ II) und die allergische Immunkomplexreaktionen (Typ III) gezählt, die durch IgG-Antikörper vermittelt werden. Zytotoxische Reaktionen richten sich gegen Zell-gebundene Antigene, wie z.B. Penicillin, das an der Oberfläche von Erythrozyten gebunden voliegt. Bei Immunkomplexreaktionen kommt es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, die Effektormechanismen wie eine Komplementaktivierung und somit Entzündungsreaktionen zur Folge haben. Die Hypersensibilitätsreaktion vom Typ IV, oder auch allergische Spättypreaktion, ist häufig die Ursache von Metall-, Duft-, oder Konservierungsstoffallergien. Hier tritt eine verzögerte Symptomatik auf, da die Reaktionen durch antigenspezifische T-Zellen vermittelt werden, die in Kontakt mit prozessierten Allergenen auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen kommen. Die niedermolekularen Substanzen werden durch Verbindungen mit körpereigenen Proteinen zu Vollantigenen.

1.1.1 Pathophysiologie der allergischen Soforttypreaktion

Symptom-auslösend wirken die Allergene, hierbei handelt es sich zum größten Teil um stark immunogene Proteine oder Glykoproteine (Valenta und Kraft, 2001). Neben dem exogenen Allergen müssen noch zwei weitere Komponenten für das Auslösen einer allergischen Signalkaskade vorhanden sein. Hierzu zählt ein endogener allergenreaktiver Serumfaktor, der 1966 als das humane Immunglobulin des Isotyps E identifiziert werden konnte (Ishizaka *et al.* 1966) und eine zelluläre Komponente, die Mastzellen, die einen membranständigen hoch-affinen Rezeptor (FcεRI) für IgE-Antikörper exprimieren und durch die Sezernierung von Mediatoren als Effektorzellen fungieren. Die beteiligten Zelltypen und Zytokine sind auch im Verlauf gesunder physiologischer Im-

munreaktionen gegen Parasiten wirksam. Im Rahmen einer allergischen Reaktion kommt es jedoch aufgrund der allergenspezifischen IgE-Antikörper zu einer verstärkten Querverneztung der Rezeptoren auf Mastzellen bei Kontakt mit dem ansonsten harmlosen Allergen (s. Abb. 1.1).

Die Signalkaskade führt zur sofortigen Exozytose sekretorischer Granula. Bei der Degranulation werden biologisch aktive Substanzen wie biogene Amine (Histamin), Proteoglykane (Heparin), Serinproteasen (Tryptase, Chymase, Carboxypeptidasen), sowie eine Reihe weiterer Zytokine und Enzyme, darunter TNFα (Tumornekrosefaktor), VEGFA (*vascular endothelial growth factor*), die Hydrolase Hexosaminidase, Lipidmetabolite wie Prostaglandine und Leukotriene freigesetzt. Diese verursachen innerhalb von Sekunden Symptome, die als Sofortreaktion bezeichnet werden. Es erfolgt eine Kontraktion der glatten Muskulatur die eine Bronchokonstriktion zur Folge hat und zu Atembehinderungen und Niesen führt. Vasodilationen führen zu Erythemem und Konjunktivitis. Die vaskuläre Permeabilität erhöht sich und Flüssigkeit gelangt in das Gewebe, es kommt zu lokalen Schwellungen und einer Tränenproduktion. Die Schleimproduktion wird ebenfalls angeregt, was mit Rötungen und Schwellungen der Nasenschleimhaut zusammenfassend als Rhinitis oder auch Heuschnupfen bezeichnet wird (Galli *et al.* 2008, s. Abb.1.1)

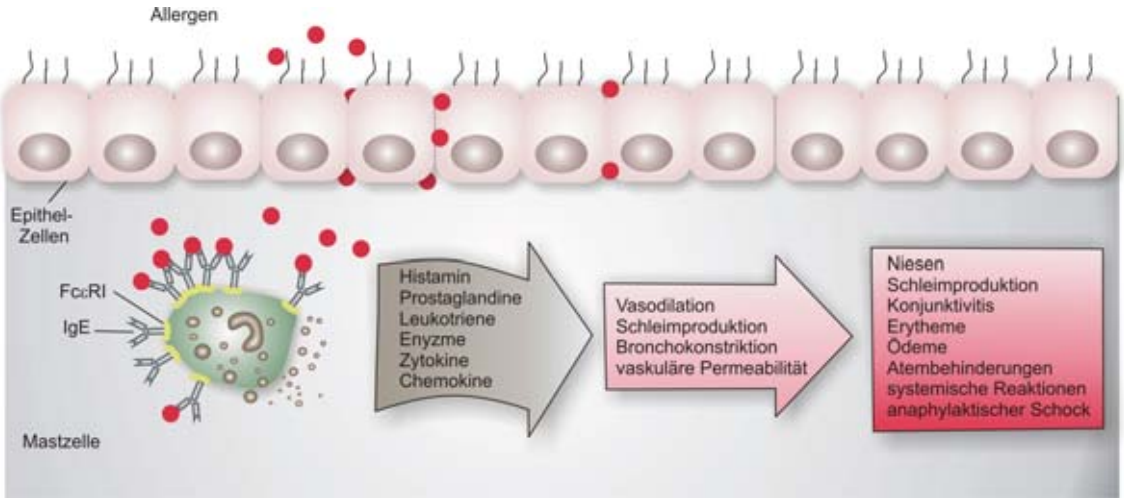


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der allergischen Sofortreaktion.
Die Allergenbindung an spezifische IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Mastzellen im Gewebe führt zu einer Signalkaskade, die eine Degranulation der Zellen durch Exocytose zytoplasmatischer sekretorischer Granula bewirkt. Die dadurch freigesetzten Mediatoren führen innerhalb von Sekunden zu den typischen Symptomen, deren Schweregrad von der Dosis und dem Eintrittsweg der Allergene abhängt.

Der Schweregrad und die Lokalisation der Symptome reicht je nach Dosis des Allergens sowie dessen Eintrittsweg von leichten über mittlere Beeinträchtigungen des Pati-

enten, bis hin zu einem lebensbedrohlichen oder letalen Verlauf, z.B. durch schweres Asthma oder Anaphylaxie infolge einer systemischen Mastzellaktivierung.

Die Bildung allergenspezifischer IgE-Antikörper kann als Schlüssel-Prozess für den Pathomechanismus einer Allergie angesehen werden und wird als Sensibilisierung bezeichnet. Sie erfolgt bei Erstkontakt mit dem Allergen, verläuft klinisch inapparent und wird hervorgerufen durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen den T-Helferzellinien T_H1 und T_H2, deren Effektoreigenschaften und Mediatoren antagonistisch wirken. Abbildung 1.2 zeigt schematisch den Mechanismus einer Sensibilisierung, der nachfolgend beschrieben ist.

Bei einer allergischen Immunantwort kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des T_H2-Subtyps, wobei die vermehrte T_H2-Differenzierung von unterschiedlichen Faktoren abhängig ist. Beide Subtypen entstehen im lymphatischen Gewebe aus einer gemeinsamen Vorläuferzelline, den naiven, antigenspezifischen $CD4^+$T-Zellen (CD, *cluster of differentiation*). Diese werden im Thymus gebildet und wandern in die Lymphknoten, nachdem sie einer positiven und negativen Selektion unterzogen wurden. Antigen-präsentierende, phagozytierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*) internalisieren kleinste Mengen von Antigenen, die z.B. von mukosalen Oberflächen resorbiert wurden und wandern zur Präsentation der prozessierten Antigene ebenfalls in die Lymphknoten. Hier erfolgt eine Aktivierung der naiven $CD4^+$T-Zellen sobald über den T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*) die Bindung eines MHCII-Peptidkomplexes (MHCII, m*ajor histocompatibility complex class* II *protein*) stattfindet.

Dadurch wird die Differenzierung zu antigenspezifischen T_H1- oder T_H2-Effektor-T-Zellen initiiert. Welcher T_H-Subtyp entsteht, hängt sowohl von zellintrinsischen Faktoren wie der Stimulation von Korezeptoren als auch dem exogenen lokalen Zytokinmikromilieu ab. Die Chemokine IL-12 (IL, Interleukin) und IFN-α (IFN, Interferon) fördern über STAT3 und STAT4 (STAT, s*ignal transduction and activator of transcription)* die Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet und somit die Entwicklung und Aufrechterhaltung von T_H1-Helferzellen. Bei Vorhandensein von IL-4 bindet dieses an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von $CD4^+$-Zellen und führt zu einer eine positiven Rückkopplung bei der STAT6 eine Aktivierung von NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells)* und somit eine IL-4-Expression zur Folge hat. Über den ebenfalls aktivierten Transkriptionsfaktor GATA3 erfolgt eine Entwicklung hin zum T_H2-Subtyp (Ansel *et al.* 2006; Jutel und Akdis

2008). Die Spezifität der Zelllinien wird unter anderem anhand von epigenetischen Modifikationen wie Histonmethylierungen durch die STAT-Proteine aufrechterhalten (O'Shea *et al.* 2011).

Differenzierte T_H1- und T_H2-Zellen exprimieren ein jeweils charakteristisches Zytokinprofil, wobei das von T_H1-Zellen sezernierte Muster neben dem INF-γ, auch IL-2, TNF-α und Lymphotoxin umfasst und zelluläre sowie humorale Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Pathogene rekrutiert (Nakanishi *et al.* 1995; Pène *et al.* 1988). Es hat eine inhibierende Wirkung auf die B-Zell-Entwicklung und fördert die Entwicklung von $CD8^+$-T-Zellen. T_H2-Zellen sekretieren neben IL-4 und IL-5 auch IL-6, IL-9, IL-13 und GmCSF (g*ranulocyte macrophage colony-stimulating factor).* Dieses Profil besitzt stimulierende Wirkung auf B-Lymphozyten und scheint die Wirtsabwehr gegen große extrazelluläre Parasiten zu koordinieren (Fallon und Mangan 2007). Überwiegt der Einfluss der T_H2-Zellen auf aktivierte B-Zellen, reifen diese zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen heran. IL-4 und IL-13 initiieren bei Bindung einer B-Zelle an eine T_H2-Zelle über CD40 und CD40-Ligand, sowie CD80 oder CD86 und CD28 einen Klassenwechsel zum IgE-Isotyp in IgM- und IgD-positiven B-Lymphozyten (Galli *et al.* 2008).

B-Zellen sezernieren nachfolgend IgE, darunter auch allergenspezifische Antikörper (sIgE), welche durch das Lymph- und Blutgefäßsystem zur Schleimhaut gelangen und dort über den FcεRI an Mastzellen binden. Wird eine allergenspezifischen T_H2-Zelle durch Bindung des TCR an einen passenden MHCII-Peptidkomplex auf der Oberfläche einer APC aktiviert, kommt es zur klonalen Expansion der T_H2-Zelle. Die IgE-sezernierenden B-Zellen, die ebenfalls zu den APC gehören werden ihrerseits durch Bindung des MHCII-Peptidkomplexes an einen TCR aktiviert und durch klonale Expansion entsteht ein IgE-Gedächtnis, welches in weiterer Folge die Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper nachhaltig aufrechterhält. Eine Sensibilisierung ist somit erfolgt (s. Abb. 1.2).

Warum bei einer Sensibilisierung eine T_H2-Antwort favorisiert wird, ist nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die Präsentation geringer Mengen des Antigens im Komplex mit MHCII-Molekülen eine Differenzierung zu T_H2-Zellen unterstützt (Constant *et al.* 1995). Unterschiedliche genetische Prädispositionen, die einen atopischen Phänotyp fördern, wurden anhand von Nukleotidpolymorphismen in Genen der T_H2-Zytokin- und Signaltransduktionsproteinen in einigen Patientenkollektiven identifiziert (Georas *et al.* 2005).

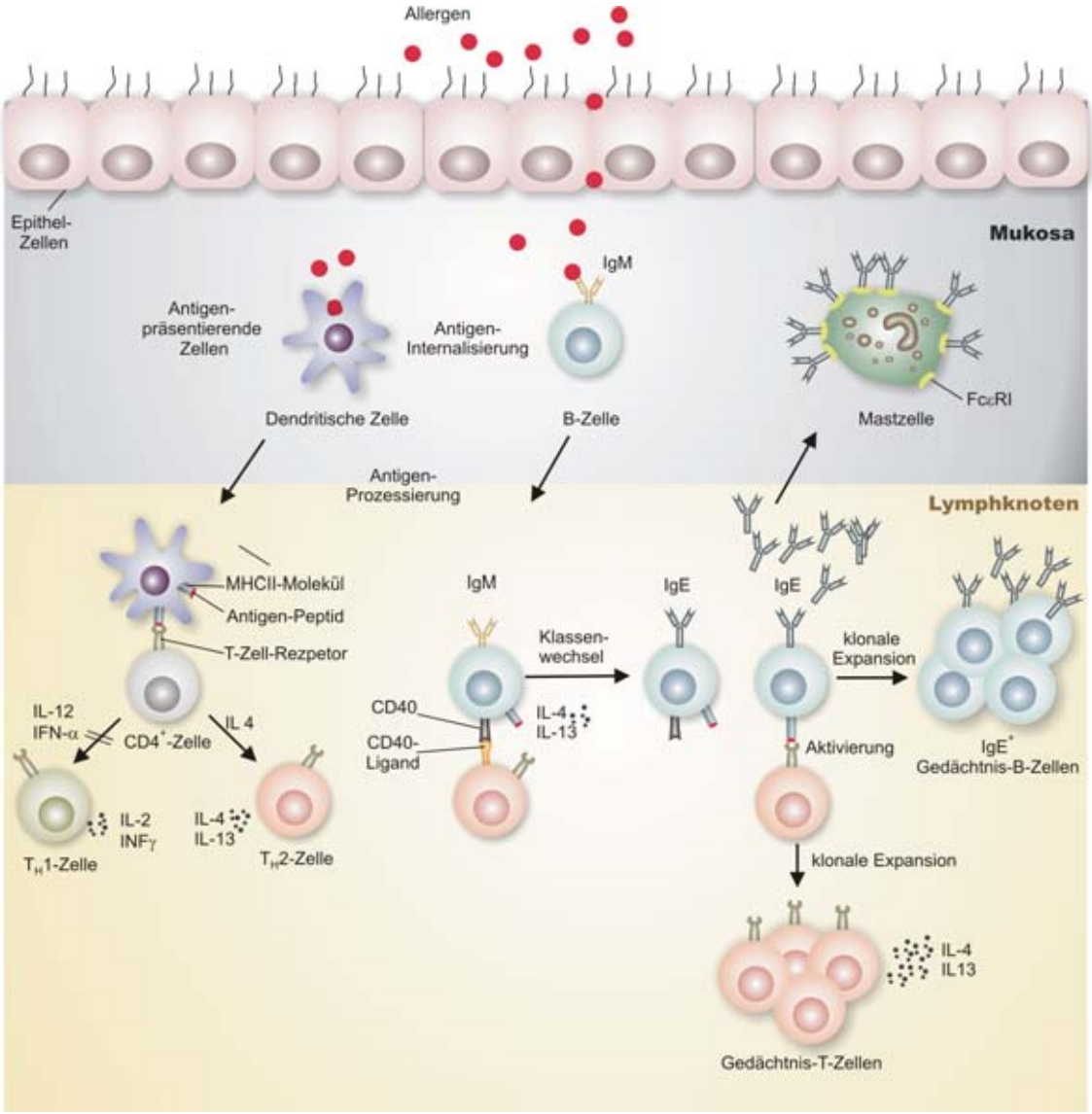


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Sensibilisierung.

Antigen-präsentierende phagozytierende Zellen, z.B. Dendritische Zellen internalisieren kleinste Mengen des Antigens, das von mukosalen Oberflächen resorbiert wurde. Während die Zellen in die regionalen Lymphknoten wandern, erfolgt die proteolytische Spaltung des Antigens und die Präsentation als Komplex mit MHCII-Molekülen auf der Zelloberfläche.

Im lymphatischen Gewebe erfolgt die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen ($CD4^+$ T-Zellen) zum T_H2-Typ, dessen Zytokine die Proliferation von B-Zellen und den Klassenwechsel zum IgE induzieren. Eine Aktivierung IgE-sezernierender Zellen durch T_H2-Zellen führt zu IgE^+ B-Gedächtniszellen sowie zur klonalen Expansion der T_H2-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen.

Weitere Faktoren, wie der Ort des Allergenkontaktes, die Art und Anzahl der APC, deren Zytokine und biologische Mediatoren beeinflussen die Differenzierung zum T_H2-Phänotyp additiv (Mazzoni *et al.* 2001; H. Tanaka *et al.* 2000). Es konnte gezeigt werden, dass ein industrialisierter westlicher Lebensstil die Ausbildung von Allergien fördert (Herrick und Kim Bottomly 2003). Die daraus abgeleitete Hygienehypothese geht davon aus, dass eine Vermeidungsstrategie gegenüber Krankheitserregen und eine

frühe wiederholte Antibiotika-Einnahme mit der Entwicklung einer Allergie assoziiert sind (Geha 2003). Dies konnte in Studien zum Einfluss der Stimulation von TLR (*Toll-like* Rezeptoren) auf APC, die natürlicherweise bei Bindung von Pathogenpartikeln induziert wird, untermauert werden. Anhand des TLR-4 und seines Agonisten, dem LPS (Lipopolysaccharid) bakterieller Zellwände, konnte während einer Sensibilisierung gezeigt werden, dass parallel applizierte hohe Dosen LPS eine T_H1-Antwort auslösen, wohingegen Dosen in mittleren Bereichen eine T_H2-Antwort zu unterstützen scheinen. Dies könnte ein Hinweis auf einen, der Hygienehypothese zugrundeliegenden, immunologischen Mechanismus sein. Hierbei wären wir durch erhöhte Hygiene einer verringerten Dosis bakterieller Bestandteile und somit auch LPS ausgesetzt, wodurch T_H2-Antworten favorisiert würden (Herrick und Kim Bottomly 2003; Karp 2010).

Andere Studien belegen, dass ein Zusammenhang zwischen gestiegener Allergie-Prävalenz und der veränderten Qualität von Nahrungsmitteln besteht, was zusammenfassend als Ernährungshypothese bezeichnet wird (Devereux 2006). Die molekulare Grundlage dieser Hypothese ist jedoch nicht belegt. Dem Zytokin TSLP (*thymic stromal lymphopoitein*) konnte eine T_H2-induzierende Eigenschaft nachgewiesen werden. Dieses 4-Helix-Bündel Protein wird von Lungenepithelzellen produziert, bindet an den IL-7-Rezeptor auf Dendritischen Zellen und führt so zur inflammatorischen T_H2-Zellstimulation (Hammad und Lambrecht 2008).

Nach der Sensibilisierung wird bei jedem erneuten Kontakt mit dem Antigen die allergische Reaktion ausgelöst. Diese beinhaltet neben der beschriebenen Sofort- auch eine Spätreaktion, die etwa zwei bis sechs Stunden nach Kontakt mit dem Allergen eintritt. Neben den erwähnten primären Effektoreingenschaften, besitzen einige der Mediatoren auch regulatorische sekundäre Effekte, indem sie weitere immunkompetente Zellen aktivieren und deren Rekrutierung in das Gewebe des Allergenkontaktes induzieren. Das von aktivierten T_H2-Helferzellen ausgeschüttete IL-5 bewirkt z.B. die Differenzierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten, die verstärkt in das entzündliche Gewebe einwandern. Ebenso werden neutrophile Granulozyten rekrutiert, die durch Elastase-Sekretion eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und eine Degradierung von Kollagen zur Folge haben. Basophile Granulozyten, die aus der Blutzirkulation in die Gewebe gelockt werden, exprimieren ebenfalls den FcεRI und sezernieren ähnliche Mediatoren wie die Mastzellen (Galli 2008). Auch der Einfluss der IgE-Antikörper auf die Spätreaktion wird diskutiert. Bei der so genannten IgE-erleichterten Antigen-Präsentation löst die Bindung von IgE an APC wie DC, Monozyten und B-Zellen

über den niedrig-affinen IgE-Rezeptor FcεRII (CD23) eine verstärkte Allergenaufnahme und -präsentation für naive CD4$^+$-Zellen aus (Mudde *et al.* 1990). Dies führt zur Gegenwart von T-Effektorzellen im Gewebe, die mit Zellen des innaten Immunsystems ein regulatorisches Netzwerk bilden (s. Abb. 1.3).

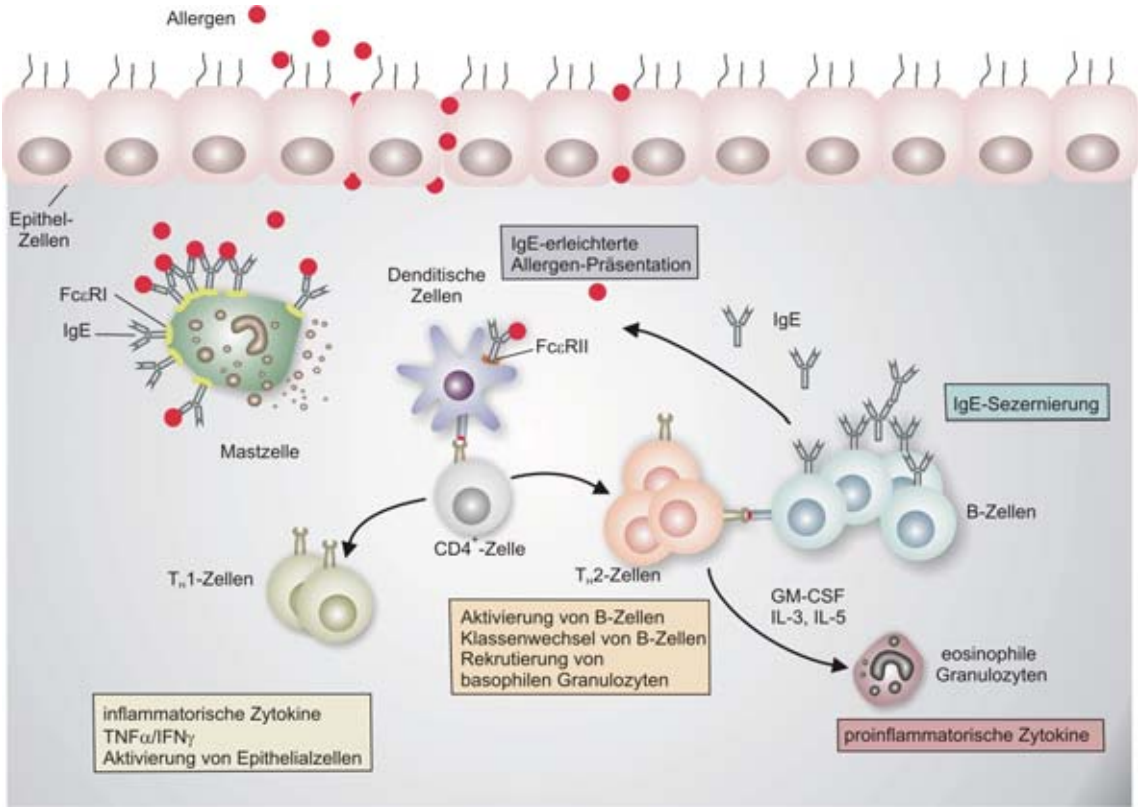


Abb. 1.3 Spätreaktion und Mechanismen für eine chronische Symptomatik.
Die IgE-erleichterte Allergen-Präsentation durch Bindung von IgE-Antikörpern an den niedrig-affinen FcεRII auf APC führt zur Differenzierung von T-Effektorzellen im Gewebe, die inflammatorische Prozesse induzieren.

Verlängert sich der Kontakt mit dem Allergen oder kommt es zu wiederholtem Allergen-Kontakt, werden chronisch inflammatorische Prozesse eingeleitet. Es kommt zu einem Influx von T-Effektorzellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen und Monozyten, sodass die betroffenen submukosalen endothelialen Gewebe dicht von Immunzellen besiedelt werden und es erneut zu Aktivierungen und positiven Rückkopplungen kommt (Verhagen *et al.* 2006). In der finalen Phase der Inflammation werden in den entzündlichen Geweben allergenspezifische IgE-Antikörper durch rekrutierte B-Zellen sezerniert. Durch die Aktvierung eingewanderter Immunzellen und Epithelial- und Strukturzellen, wie z.B. Fibroblasten kommt es zu zytotoxischen Effekten, die einen Funktionsverlust und die Apoptose von Gewebezellen zur Folge haben können (M. Akdis und C. Akdis 2009).

1.1.2 Allergiediagnostik und -therapie

Bei Verdacht auf eine IgE-vermittelte Hypersensitivität werden sowohl Hauttests als auch serologische Untersuchungen durchgeführt. Zu den Hauttests zählen der Reibetest, der Pricktest, der Scratchtest und der Intrakutantest, wobei der Pricktest die klinische Routine zur Abklärung von Sofottyp-Allergien darstellt. Der Nachweis allergenspezifischer IgE-Antikörper im Serum ist vor allem dann indiziert, wenn die Sensibilisierung unklar ist und das Allergenspektrum spezifiziert werden soll, eine Medikamenteneinnahme erfolgte, die eine Symptomatik im Hauttest unterdrücken würde, oder die *in vivo*-Testung sehr wahrscheinlich zu einem anaphylaktischen Schock führen würde. Allergenspezifische IgE-Antikörper können quantitativ ermittelt werden, jedoch lässt sich keine Aussage über die Symptomintensität treffen. Für serologische Untersuchungen werden standardmäßig Multitests eingesetzt, bei denen Mischungen der üblichen Allergene an einem Träger gebunden vorliegen und nach Inkubation mit dem Patientenserum mithilfe eines enzymmarkierten Anti-IgE Antikörpers messbare Chromogen- oder Fluoreszin-Komplexe entstehen. Eines der ersten *in vitro*-Testsysteme war der RAST (*radioallergosorbent test*) bei dem der detektierende Anti-IgE Antikörper radioaktiv markiert ist und eine Einteilung der Seren nach ihrem IgE-Spiegel in die so genannten RAST-Klassen ermöglicht. Weite Verbreitung hat das Phadia-ImmunoCAP-System. Mittlerweile gibt es Untersuchungsmöglichkeiten für bis zu 500 verschiedene Einzelallergene, für die der jeweilige Gehalt spezifischer IgE-Antikörper bestimmt werden kann. In Basophilen-Degranulationstests (BDT) und zellulären Allergen-Stimulationstests (CAST) werden zelluläre Bestandteile aus Vollblut des Patienten mit den Allergengemischen oder Einzelallergenen in Kontakt gebracht und eine Messung freigesetzter spezifischer Mediatoren, wie z.B. Histamin, durchgeführt.

Provokationstests können für die Evaluierung des Erfolgs einer spezifischen Immuntherapie (s.S.11) eingesetzt werden. Provokationen werden konjunktival, nasal, oral, intestinal, bronchial oder subkutan durchgeführt, je nach diagnostizierter Sensibilisierung. Besonders bei Bienen- oder Wespengiftallergien wird nach erfolgter Therapie häufig eine Stichprovokation durchgeführt, um das residuale Alltagsrisiko des Patienten abschätzen zu können. Die therapeutischen Konsequenzen eines möglichen anaphylaktischen Schocks müssen bedacht werden.

Präventionsmaßnahmen für die Ausbildung einer allergischen Erkrankung gelten vor allem der Vorbeugung einer Sensibilisierung. Generell sollte versucht werden die Allergenexposition selbst zu unterbinden (Karenz). Ein entzündliches Milieu in den Schleimhäuten, verursacht z.B. durch Zigarettenrauch oder Exposition gegenüber Stäuben, Abgaspartikeln und Lösungsmitteln begünstigt eine Sensibilisierung. Besteht bereits eine Sensibilisierung kann eine Allergen-Karenz die Entwicklung der krankhaften allergischen Reaktion unterbinden und erneute Krankheitsschübe verhindern. Dies ist jedoch, abhängig von der Verbreitung eines Allergens, nur zum Teil möglich und im Falle einer Pollen- oder Hausstaubmilben-Allergie nicht gänzlich durchführbar. Trotzdem sollte die Exposition reduziert und so die positive Rückkopplung der allergischen Reaktion und die damit einhergehende Verstärkung der Symptome minimiert werden.

Zur Behandlung starker allergischer Reaktionen sind eine Reihe symptomatischer Medikamente klinisch verfügbar. Antihistaminika binden kompetitiv an die Histaminrezeptoren, wobei hier vor allem die antagonistische Belegung des H_1-Rezeptors genutzt wird. Durch eine erhöhte Rezeptorspezifität und eine verringerte Lipophilie konnten sedierende Nebenwirkungen dieser Medikamente in den letzten Jahren stark verringert werden. Sie sind bei akuten oder chronischen Erkrankungen zur Verminderung von Hypersekretion, Juckreiz und Niesreiz lokal einsetzbar und werden zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen z.B. bei Insektenstichen intravenös appliziert. Glukokortikoide haben entzündungshemmende Wirkung und schützen die Integrität von Lysosomenmembranen in den Effektorzellen. Mastzellstabilisatoren hemmen die Degranulation durch die Inhibition membranständiger Ca^{2+}-Kanäle. Sie werden zur prophylaktischen Therapie einer diagnostizierten Allergie mit leichten Symptomen verwendet (Grevers *et al.* 2008). Seit 2005 ist der monoklonale anti-IgE-Antikörper Omalizumab, der unter dem Handelsnahmen Xolair$^{(R)}$ vertrieben wird, zur Behandlung von schwerem, persistierendem allergischem Asthma zugelassen. Der Antikörper bindet IgE-Antikörper an ihrem Fc-Teil und bildet biologisch inerte Komplexe, wodurch die Bindung an den FcεI-Rezeptor inhibiert wird (Chang 2000).

Die einzige kausale Therapieform einer Hypersensibilisierung ist die spezifische Immuntherapie (SIT, s*pecific immunotherapy*), auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt. Ihr Ziel ist es, durch wiederholte Applikationen einer stufenweise steigenden Dosis relevanter Allergene, die klinische Verträglichkeit, d.h. also die Toleranz des Patienten gegenüber den Allergenen zu induzieren. Erstmals beobachtet wurde die Desensibilisierung 1911 von Noon, der durch Inkubation mit Graspollenextrakten eine deutliche

Verminderung der Symptome von Heuschnupfen-Allergikern feststellen konnte (Noon 1911). Ein Zusammenhang der Desensibilisierung mit der T-Zell-Antwort konnte dann 1980 nachgewisen werden (Rocklin *et al.* 1980). Eine Reihe seitdem durchgeführter wissenschaftlicher Untersuchungen und klinischer Studien führte zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen, bei denen die krankhafte T_H2-basierte Zellantwort wieder ins Gleichgewicht gebracht wird. Diese sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.1.3 Spezifische Immuntherapie

In verschiedenen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die chronische Inflammation in der Spätphase einer Allergie durch periphere Allergen-tolerante T- Zellen überwunden werden kann (Akdis *et al.* 1996; Ling *et al.* 2004) Diese konnten als IL-10- und TGFβ– *(tumor growth factor)* sekretierende, so genannte regulatorische T-Zellen (T_{REG}-Zellen) identifiziert werden, deren Aktivierung und Vermehrung im Rahmen einer Immuntherapie eine immunsuppressive Modifikation der zellulären und humoralen Immunantwort nach sich zieht (Ozdemir *et al.* 2009; Meiler *et al.* 2008; Yamanaka *et al.* 2009). Die Sekretion der T_H2-Interleukine wird durch IL-10 gehemmt, was wiederum einen starken Rückgang der Rekrutierung basophiler und eosinophiler Granulozyten und der Mastzellen in die mukosalen Gewebe von Haut, Nase, Augen und Bronchien zur Folge hat. Dies reduziert die Konzentration inflammatorischer Mediatoren im entzündlichen Gewebe (M. Akdis und C. Akdis 2009). Eine direkte Hemmung der IgE-abhängigen Mastzelldegranulation durch T_{reg}-Zellen konnte in Mäusen gezeigt werden, ebenso wie eine IL-10-abhängige Herabregulierung des CD40-Liganden auf der Oberfläche humaner eosinophiler Granulozyten, der das Überleben dieser Zellen sowie weitere stimulierende Faktoren beeinflusst (Gri *et al.* 2008; Marshall *et al.* 1996; Ohkawara *et al.* 1996).

IL-10 und TGFβ supprimieren außerdem die Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper in B-Zellen, IL-10 bewirkt einen Klassenwechsel hin zu IgA- und IgG4-Antikörpern. Diese anti-inflammatorischen Isotypen üben einen blockierenden Effekt aus, indem sie Allergen-Epitope besetzen und mit verbleibenden IgE-Antikörpern um deren Bindung konkurrieren. Es konnte gezeigt werden, dass dem IgA2 ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung zukommt, indem es die Ausschüttung von IL-10 durch Monozyten fördert (Pilette *et al.* 2007). Die initiale Stimulation der T_{reg}-Zellen, die sich dann in einem autokrinen Mechanismus durch die TGFβ-Ausschüttung selbst anregen, ist nicht

gänzlich geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass DC hierbei eine wichtige Rolle spielen. Eine IL-10 Ausschüttung konnte 2001 in murinen DC induziert und die Bildung eines regulatorischen T-Zell-Phänotyps beobachtet werden (Akbari *et al.* 2001). T_H1- Zellen werden ebenso durch T_{reg}-Zellen gehemmt, wodurch akute IFNγ und TNFα-gesteuerte Prozesse vermindert werden, die Verletzungen im peripheren entzündlichen Gewebe auslösen (Larché *et al.* 2006). Nach weiteren Erkenntnissen wird im Laufe einer Immuntherapie über einen längeren Zeitraum die T_H-Zellantwort in Richtung T_H1 verschoben, wodurch das T_H1-T_H2-Gleichgewicht regeneriert wird (Till *et al.* 2004; Durham *et al.*1996).

Der starke Einfluss der T_{reg}-Zellen hat neues Licht auf das Zusammenspiel der Effektor-T-Zellen gesunder Immunantworten geworfen und man geht heute davon aus, dass T_H1-, T_H2-, T_{reg}-, sowie eine vierte Sublinie, die T_H17-Zellen, mithilfe ihres spezifischen Zytokinprofils nicht nur weitere Zellen rekrutieren und Immunantworten auslösen, sondern sich auch gegenseitig regulieren. Das antagonistische Prinzip von T_H1- und T_H2-Zellen wurde durch den generell suppressiven Typ der toleranzinduzierenden T_{reg}-Zellen erweitert.

Zwei Darreichungsformen der spezifischen Immuntherapie haben sich etabliert, zum einen die subkutane spezifische Immuntherapie (*Subcutanous Immunotherapy*, SCIT), bei der Allergenextrakte in die Unterhaut injiziert werden und die sublinguale Therapie (SLIT, s*ublingual immunotherapy*), bei der eine Resorption der Allergene über die oralen Langerhanszellen, eine spezialisierte Form epithelialer DC, erfolgt (Larché 2010). Aufgrund der einfacheren Applikation geht die SLIT meist mit einer erhöhten Zustimmung des Patienten einher. Die erste klinische Studie, die eine erfolgreiche SLIT verzeichnen konnte, wurde 1986 durchgeführt (Scadding und Brostoff 1986). Seitdem konnte beispielweise ein sicherer therapeutischer Effekt durch die Applikation von Graspollentabletten sowohl für Erwachsene als auch für Kinder mehrfach belegt werden (Bufe *et al.* 2009; Wahn *et al.* 2009; Didier *et al.* 2007). Eine Anwendung fand SLIT bislang lediglich bei allergischer Rhinitis als Reaktion auf Pollen- oder Hausstaubmilbenallergene, jedoch nicht zur Behandlung allergischen Asthmas.

Aufgrund des Risikos zahlreicher Nebenwirkungen, die einen anaphylaktischen Schock nicht ausschließen, muss bei der Durchführung einer subkutan applizierten SCIT stets die Möglichkeit zur Schockbehandlung gegeben sein. Dies führt zu einer kosten- und zeitintensiven Therapie, sodass eine Immuntherapie oft erst spät, bei Versagen ande-

rer symptomatischer Therapieformen verordnet wird. Indikationen einer SCIT sind die Hyposensibilisierungen gegen Pollen-, Hausstaumilben- und Hymenopterengift- Allergene. Es konnte gezeigt werden, dass SCIT eine präventive Wirkung auf die Ausbildung allergischen Asthmas und neuer Sensibilisierungen hat (Des Roches *et al.* 1997; Jacobsen *et al.* 2007). Die Welt-Allergie-Organisation (WAO) empfiehlt daher Immuntherapien zu früheren Zeitpunkten der Pathophysiologie durchzuführen (Durham und Leung 2011). Eine Langzeitwirkung der SCIT mit Pollen- und Hausstaubmilben-Allergenen ist bei Verabreichung von Erhaltungsdosen alle vier bis sechs Wochen über einen Zeitraum von drei bis fünf Jahren gegeben (Marogna *et al.* 2010). Die erfolgreiche Behandlung einer Hymenopterengift-Allergie führt zur Eliminierung des Risikos eines anaphylaktischen Schocks bei Provokation eines Feldstichs, und der Patient kann als desensibilisiert betrachtet werden (Casale und Stokes 2011).

Trotz der nachgewiesenen Effizienz der spezifischen Immuntherapie zur Behandlung IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen, stellten sich auch Defizite dieser Therpieform heraus. Unterschiedliche Allergenextrakt-Präparate variieren in ihrer Allergenzusammensetzung und -konzentration (Akkerdaas *et al.* 2003). Sie enthalten aufgrund ihres nativen Ursprungs oft Nicht-Allergene, außerdem sind klinisch relevante Allergene in einigen Präparaten unterrepräsentiert (Blank *et al.* 2011; Movérare *et al.* 2002). Dies kann zu einem Versagen der Therapie führen und Neusensibilisierungen mit sich führen. Eine Komponenten-aufgelöste Diagnostik, die ein individuelles Sensibilisierungsprofil des Patienten erstellt und eine, dem Allergenspektrum angepasste, Therapie erlaubt, würde diese Defizite umgehen. Klonierungen und rekombinante Expressionen erlaubten die Identifizierung mehrerer hundert relevanter Allergene neben den bislang charakterisierten Majorallergenen und zeigten die Entwicklung auf diesem Gebiet (Cromwell *et al.* 2011).

Aufgrund des Risikos lokaler und systemischer Nebenwirkungen kann eine SCIT bei stark ausgeprägter oder fortgeschrittener Allergie nur unter klinischer Beobachtung durchgeführt werden und ist für den Patienten zumindest bei Therapiebeginn häufig mit störenden Symptomen verbunden. Innovative Ansätze, in denen unterschiedliche Vakzinierungsstrategien mit modifizierten Allergenen verfolgt werden, werden in Kapitel 1.2.4 vorgestellt.

1.2 Allergene

Als Allergene werden Antigene bezeichnet, die in Allergikern hypersensible Immunreaktionen auslösen. Die meisten Allergene sind harmlose Umweltantigene. Charakteristisch für die Allergene einer Soforttyprektion ist die Fähigkeit zur Quervernetzung Rezeptor-gebundener IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen. Bei den meisten Allergenen handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine mit einer Molekülmasse zwischen 8 und 50 kDa (Valenta und Kraft 2001). Wie auch bei einem nicht-allergenen Antigen, wird die Antikörperbindungsstelle als Epitop bezeichnet. Damit Allergene eine Quervernetzung von zwei Rezeptormolekülen induzieren können, müssen mindestens zwei IgE-Epitope auf dem Molekül vorhanden sein. Kleinere Moleküle, die nur eine Antikörper-Bindungsstelle besitzen, sogenannte Haptene, können nur dann eine Allergie auslösen, wenn sie an einem Trägermolekül gebunden vorliegen. Werden in mehr als 50 % eines Patientenkollektivs, das eine Allergie gegen eine bestimmte Spezies aufweist, spezifische IgE-Antikörper für das gleiche Allergen nachgewiesen, besitzt dieses eine hohe klinische Relevanz und wird als Majorallergen bezeichnet. Liegt dieser Wert unter 50 % handelt es sich um ein Minorallergen.

Allergene, die eine Soforttypreaktion auslösen, lassen sich ihrer Exposition nach in drei große Gruppen einteilen, die Inhalations-, die Ingestitions- und die Injektionsallergene. Zu den Inhalationsallergenen gehören Allergene, die über den Respirationstrakt aufgenommen werden, wie Pflanzenpollen, Schimmelpilzbestandteile, Haut-, Speichel-, Kot-, und Urinkomponenten von Tieren sowie Vogelfedern, Milbenkomponenten und Insektenbestandteile. Zu den über den Gastrointestinaltrakt aufgenommenen Ingestionsallergenen gehören vorrangig Nahrungsmittelallergene. Injektionsallergene befinden sich in Arzneistoffen und Insektengiften. Die Bezeichnung der Allergene erfolgt taxonomisch nach Gattung und Art ihres Herkunftsorganismus sowie einer arabischen Zahl, welche die Reihenfolge der Isolierung anzeigt. Bet v 1 ist dem nach das erste identifizierte Allergen der Weißbirke *Betula verrucosa*. Diese Nomenklatur wurde von der IUIS (*International Union of International Societies*) festgelegt, die ebenso Regeln definiert hat, wann ein Protein als Allergen einzustufen ist (www. Allergen.org). Sind zwei Allergene zu 67 % oder mehr ihrer Aminosäuresequenz identisch, stellen sie Isoformen bzw. Isoallergene des gleichen Allergens dar. Diese wurden alphabetisch nach der Reihenfolge ihrer Identifikation mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet, werden jedoch der neusten Regelung nach, durch arabische Ziffern, die durch einen Punkt von der ersten

Ziffer getrennt werden, gekennzeichnet. Stimmen zwei Varianten zu 97 % oder mehr ihrer Aminosäuresequenz überein, stellen sie keine weitere Isoform, sondern eine Untergruppe der gleichen Isoform dar. Diese werden durch eine dritte und vierte Ziffer nach dem Punkt dargestellt (z.B. Bet v 1.0401 und Bet v 1.0402) (Ring 2003). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die verwendeten Isoformen jedoch nach der alten Methode mit kleinen arabischen Buchstaben gekennzeichnet (Vgl. S. 61).

Es gibt keine grundsätzlichen Eigenschaften, die ein Protein aufweisen muss, um eine allergische Reaktion zu induzieren, allerdings scheinen eine große Anzahl von IgE-Epitopen pro Molekül, deren Ausrichtung, die Stabilität gegenüber Proteolyse, das Vorhandensein von Kavitäten in der dreidimensionalen Struktur und die Höhe der zugeführten Dosis sowie ein geringes Molekulargewicht und eine hohe Löslichkeit die Allergenität eines Proteins zu erhöhen. Vielen Allergenen konnte auch eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden, diese scheint ein Vorteil zur Überwindung epithelialer Barrieren zu sein (Hammad und Lambrecht 2008). Definierte sterische Strukturen, die eine verlässliche Vorhersage der Allergenität eines Proteins erlauben, konnten noch nicht gefunden werden. Die Charakterisierung humaner IgE-Epitope könnte neue Erkenntnisse zur Allergenität von Antigenen liefern.

1.2.1 Kreuzreaktivität

Zu Kreuzreaktivitäten kommt es, wenn sich die Oberflächenstruktur von Allergenen unterschiedlicher Quellen ähnelt, sodass Epitope nicht nur auf dem, für die Sensibilisierung verantwortlichen Allergen, sondern auch auf vergleichbaren Allergenen durch spezifische IgE-Antikörper erkannt werden. Kreuzreaktivitäten können über homologe dreidimensionale Proteinstrukturen vermittelt werden. Auslöser sind konservierte Proteinfamilien in der Pflanzenwelt, die sowohl in Pollen als auch z.B. Früchten und Wurzelbestandteilen unterschiedlicher Pflanzen vorkommen. Allergiker, die durch Inhalation des Pollens einer Spezies sensibilisiert wurden, leiden oft während der gesamten Pollensaison an allergischen Symptomen und entwickeln häufig eine pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie, auch orales Allergie-Syndrom (OAS) genannt. Dies führt zu allergischen Reaktionen beim Verzehr roher Früchte oder roher Gemüsesorten. Diese beschränken sich meist auf die Mund- und Rachenregion, da die Epitope durch die Verdauungsprozesse im Magen-Darmtrakt zerstört werden. Es kommt dabei nur selten zu systemischen Reaktionen (Breiteneder und Mills 2005). Davon abzugrenzen ist eine direkte Nahrungsmittelallergie, bei der die Sensibilisierung durch Proteine entsteht, die

in Verdauungsprozessen degradiert wurden und ihre Allergenität durch Behandlungen wie Erhitzen oder Säureeinwirkung beibehalten. Mehrere Proteinfamilien, die zu Kreuzreaktionen führen, konnten identifiziert werden. Am besten untersucht ist die Familie der PR-10 Proteine (PR, *pathogenesis related*) höherer Pflanzen. Diese Proteine werden bei bakteriellen Infektionen oder Stress vermehrt exprimiert. Homologe finden sich in Baumpollen der Ordnung Fagales (Eiche, Erle, Buche, Haselnuss) sowie Früchten oder Samen der Ordnungen Rosaceae (Pfirsich, Aprikose, Kirsche, Pflaume, Apfel Birne), Fabacea (Mungobohne, Erdnuss, Sojabohne), Apaceae (Karotte, Sellerie, Petersilie) und anderen Ordungen (Spargel, Paprika, Kartoffel, Mango, Melone) (Midoro-Horiuti *et al.* 2001).

Profiline stellen eine weitere Proteinfamilie, die zu Kreuzreaktivitäten führt, dar. Es handelt sich hierbei um monomere Aktin-Bindeproteine, die von eukaryotischen Zellen synthetisiert werden und sich daher ubiquitär in einer großen Bandbreite inhalativer und ingestiver Allergenquellen befinden (Ebo *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass viele Sensibilisierungen mit Gräserpollen oder Pflanzenpollen der Ordnung Asteraceae durch homologe Profiline in Nahrungsmitteln zu Kreuzreaktionen führen (Egger *et al.* 2006). Genau wie bei den PR-10 Proteinen werden auch die meisten Profiline durch Erhitzen oder Verdauungsenzyme degradiert. Weitere identifizierte Kreuzreaktivitäten-auslösende Proteinfamilien sind PR-5-Proteine und Lipid-Transferproteine (LTP) (Webber und England 2010).

Neben Proteinstrukturen können auch Kohlenhydratstrukturen, sogenannte CCDs (*carbohydrate cross-reaktive determinants*) zu Kreuzreaktivitäten führen. Dass bei Bienen- und Wespengiftallergikern oft keine Doppelsensibilisierung, sondern eine Kreuzreaktivität gegenüber hymenopterenspezifischer α-1,3-Fucosylierung vorliegt, konnte erst vor kurzem aufgezeigt werden (Seismann *et al.* 2010). Inwieweit die Zuckerstrukturen IgE-Epitope darstellen oder ob sie nur in Verbindung mit Proteinstrukturen erkannt werden, wird kontrovers betrachtet (Altmann 2007). Bei allergischen Reaktionen auf mehrere Allergenquellen ist eine Unterscheidung, ob kreuzreaktive IgE-Antikörper vorhanden sind oder der Patient mehrfach sensibilisiert wurde, für die Auswahl der Allergene, die während einer SIT appliziert werden, entscheidend. Werden zusätzlich unspezifische Allergene eingesetzt, kann es zu Neusensibilisierungen kommen.

1.2.2 Bet v 1, Majorallergen des Birkenpollen

Allergische Rhinitis (Heuschnupfen) und allergisches Asthma besitzen eine Prävalenz von 15-20 %, abhängig von Alter und geografischer Lage (Bousquet *et al.* 2001). In etwa 50 % der Fälle liegt eine Sensibilisierung durch Pollen-Allergene vor, wodurch die Pollen-Allergie (Pollinosis) die bedeutendste Allergie ist (Bartra *et al.* 2009). Als Pollen werden die männliche Gametophyten von Pflanzen bezeichnet. Zu den Pflanzen, die häufig eine Pollinosis auslösen gehören Bäume, Sträucher, Gräser- und Getreidesorten. Je nach Art kann eine einzelne Pflanze bis zu 10^8 Pollen pro Jahr verbreiten. Windbestäubende Pflanzen produzieren dabei die meisten Pollen mit guten Schwebeeigenschaften, die teilweise kilometerweit transportiert werden. In Nordeuropa, Asien und Nordamerika ist die Birke der bedeutendste Verursacher einer Pollinosis. Bislang konnten 6 Allergene in Birkenpollenextrakten identifiziert werden. 97 % der Birkenpollenallergikern besitzen spezifisches IgE für das Allergen Bet v 1, 57 % sind ausschließlich gegen Bet v 1 sensibilisiert (Jarolim *et al.* 1989). Es handelt sich hierbei um ein kleines acides Protein mit einer Molekülmasse von 17,5 kDa, das sich im Pollen in der Nähe ER-gebundener Ribosomen befindet und keine Glykosylierungen besitzt (Grote 1991). Bisher konnten 30 Isoallergene identifiziert werden, von denen einige noch unterschiedliche Unterformen aufweisen (Swoboda *et al.* 1995; IUIS*)*. Bet v 1 gehört der Proteinfamilie der PR-10 Proteine an und verfügt über deren typische Faltungstopologie (s. Abb. 1.4).

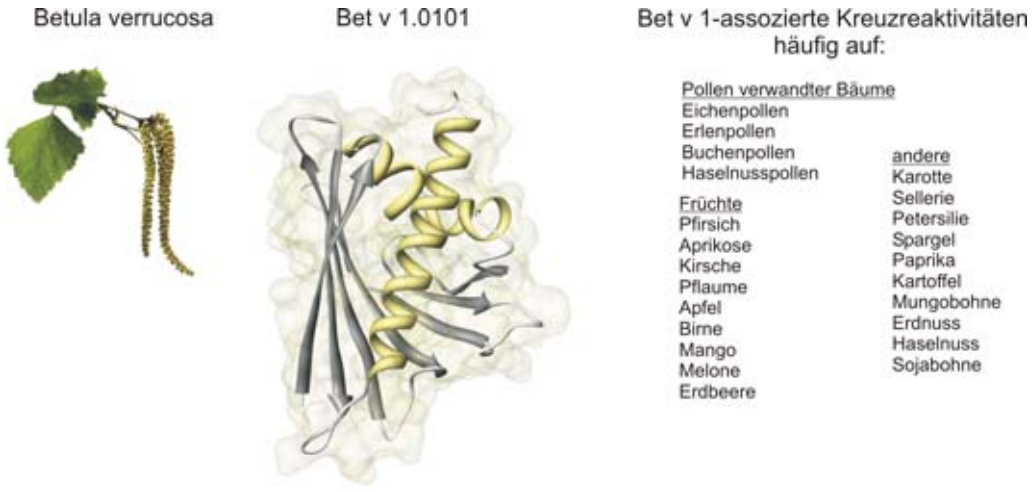


Abb. 1.4 Bet v 1, Majorallergen der Weißbirke *Betula verrucosa*.
Dargestellt ist der Pollen-enthaltende männliche Blütenstand einer Weißbirke sowie die Proteinstruktur des Bet v 1a (PDB 1BV1). Rechts sind weitere Baumarten der Familie Fagales sowie Obst- und Gemüsesorten und weitere Pflanzenbestandteile aufgelistet, die häufig nach einer Bet v 1 Sensibilisierung durch kreuzreaktive spezifische IgE bei Kontakt zu allergischen Symptomen führen.

Die Sequenzhomologie zu anderen Allergenen dieser Familie beträgt 35-69 %. Spezifische Antikörper zeigen ein hohes Maß an Kreuzreaktivitäten zu anderen PR-10 Proteinen, sodass 50-93 % der Birkenpollen-Allergiker Nahrungsmittelallergien entwickeln (Vieths *et al.* 2002). Aufgrund dieser hohen klinischen Relevanz stellt es ein ideales Modellprotein für neue therapeutische Strategien dar und konnte bereits kristallisiert werden (Gajhede 1996; Pomés 2010). Dies gelang sogar für den Komplex mit einem murinen monoklonalem Antikörperfragment (Spangfort *et al.* 1999).

Auch die erfolgreiche Verwendung rekombinanten Allergens in der SIT wurde mehrfach klinisch belegt (Grönlund und Gafvelin 2010). Aktueller Bestandteil von Forschungen ist die Suche nach natürlichen hypoallergenen Isoformen, bzw. die rekombinante Generierung modifizierter Moleküle mit reduzierter Allergenität für eine verbesserte Immuntherapie mit geringeren Nebenwirkungen (Marković-Housley *et al.* 2003).

1.2.3 Phl p 5, Majorallergen des Wiesenlieschgrases

Die Hauptquelle von Graspollen-Allergenen bildet die Familie der Süßgräser (Pocaceae), zu denen auch fast alle Getreide- und Nutzpflanzen gehören. Sie kommen aber auch im Grün-und Grasland weltweit vor und besitzten eine hohe Pollenverbreitungskapazität, sodass weltweit etwa 50 % aller Allergiker Reaktionen auf Gräserpollen zeigen (Andersson 2003). Nach ihren strukturellen und immunologischen Eigenschaften wurden Gräserpollen-Allergene in 13 Gruppen klassifiziert (Taketomi *et al.* 2006). Das größte allergene Potential weisen Allergene der Gruppen 1 und 5 auf. In 95 % der GräserspollenAllergiker konnten spezifische IgE-Antikörper für Gruppe 1-Allergene, saure Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 31 und 35 kDa, nachgewiesen werden (Ball *et al.* 2009). 85 % der Graspollenallergiker weisen spezifische IgE-Antikörper für Graspollen-Allergene der Gruppe 5 auf, die eine Masse von 27-33 kDa besitzen (Weber 2003).

Für das Gräserpollen-Allergen 5 des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*) konnten in 95 % der Gräserpollen-Allergiker spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden (Valenta 1992). Das Allergen kommt natürlicherweise in zwei Isoformen vor, Phl p 5a und Phl p 5b, von denen jeweils mehrere Unterformen identifiziert werden konnten (IUIS). Phl p 5a und Phl p 5b zeigen eine hohe Sequenzhomologie und unterscheiden sich kaum in ihrem Molekulargewicht und ihren biochemischen Eigenschaften (Neerven und Bufe 1999).

2002 gelang es, die Kristallstruktur eines proteolysierten C-terminalen Fragments des Phl p 5 b zu erhalten. Die Proteinfaltung entspricht einem 4-Helix-Bündel, welches aus vier α-Helices besteht, die dicht nebeneinander um einen hydrophoben Kern angeordnet sind. Für das N-terminale Fragment konnte dieses Motiv aufgrund der homologen und ebenfalls Alanin-reichen Sequenz vorhergesagt werden (Rajashankar *et al.* 2002; Bufe *et al.* 1996). Eine ganz ähnliche Proteinfaltung konnte für das Allergen Phl p 6 beobachtet werden und wurde im Rahmen dieser Arbeit als Matrize für Strukturmodellierungen des noch nicht kristallisierten N-terminalen Phl p 5-Fragementes verwendet (Vrtala *et al.* 1999, Abb.1.6) Es bleibt unklar, ob die α-Helices beider Fragmente vor der Proteolyse nebeneinander angeordnet sind oder ob sie ineinandergreifen und ein Multi-Helix-Bündel formen. Die biologische Funktion des Allergens ist ebenfalls unklar, dem Phl p 5b konnte eine Ribonukleaseaktivität nachgewiesen werden (Bufe *et al.* 1995) .

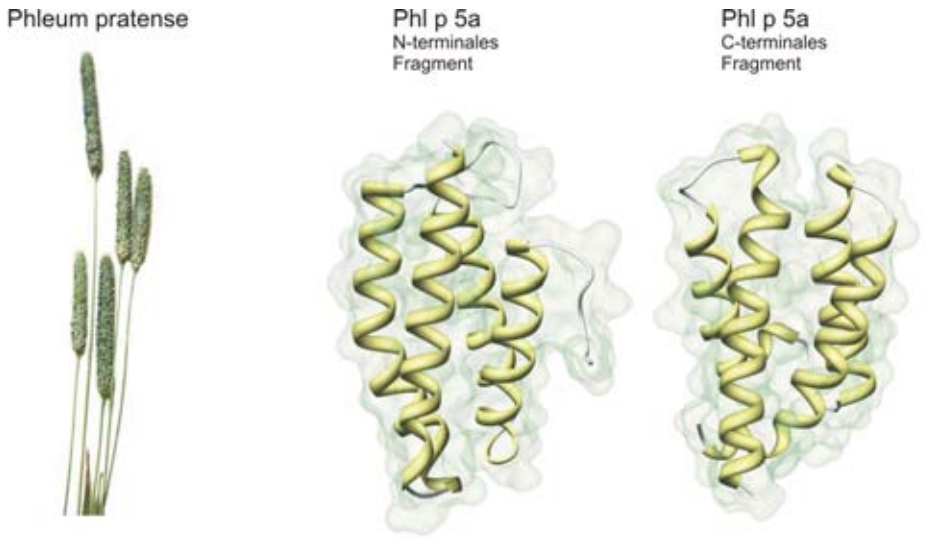


Abb. 1.5 Phl p 5 , Majorallergene des Wiesenlieschgrases *Phleum pratense.*
Dargestellt sind Rispenähren des Wiesenlieschgrases und Strukturmodellierungen der N- und C-terminalen Fragmente des, durch Proteolyse gespaltenen, Phl p 5a-Allergens.

1.2.4 Allergenmodifikationen als neue Strategien der SIT

Allergenmodifikationen oder additiv verabreichte Substanzen zielen darauf ab, Nebenwirkungen der SIT zu verringern, den Therapieverlauf zu beschleunigen und/oder die Effizienz zu erhöhen. Ein durch unterschiedliche Methoden verwirklichtes Prinzip ist hierbei die Reduzierung konformationeller, sogenannter B-Zell- oder auch IgE-Epitope auf der Oberfläche der Allergene. Gleichzeitig soll die Anzahl der T-Zell-Epitope, also

linearer Peptide, die als Komplex mit MHC-II-Molekülen präsentiert werden und die T-Zell-abhängigen immunmodifizierenden Eigenschaften der Moleküle aulösen, erhalten bleiben. Diese Derivate können nicht mehr an allergenspezifsche IgE-Antikörper binden, ihre Allergenität wurde verringert. Die IgE-erleichterte Aufnahme und Präsentation von Allergenen durch DC und B-Zellen soll dadurch ebenfalls unterbunden werden.

Als Allergoide werden mittels Glutardialdehyd oder Formaldehyd modifizierte Allergenextrakte bezeichnet, die eine deutlich verminderte Anzahl von IgE-Epitopen besitzen (Henmar *et al.* 2008). Die Aufdosierungsphase einer SCIT wird deutlich verkürzt, da höhere Extraktdosen verabreicht werden können, ohne gleichzeitig eine Verstärkung der Nebenwirkungen zu bewirken. Die Anwendung ist in Europa als sogenannte Kurzzeittherapie etabliert (Corrigan *et al.* 2005; Williams *et al.* 2007; Zielen *et al.* 2010).

In der Peptid-basierten Immuntherapie (PIT, *Peptide Immunotherapy*) werden stark verkürzte Peptide des Allergens injiziert. Diese enthalten keine konformationellen B-Zell-Epitope und sind nicht in der Lage Rezeptor-gebundene IgE-Antikörper querzuvernetzen. Eine erste Patientenapplikation wurde 1996 mit Peptiden des Katzenallergens Fel d 1 durchgeführt (Norman *et al.* 1996). Dieser und darauf aufbauende Versuche mit synthetischen Fel d 1- und Api m 1-Peptiden konnten *in vivo* die Induktion einer humanen T-Zell-Toleranz gegenüber dem Vollallergen demonstrieren (Oldfield *et al.*2002; Müller *et al.*1998). Eine optimale Dosis eingesetzter Peptide konnte sicher und effektiv eingesetzt werden guten, höhere Dosen wurden jedoch in einem inflammatorischen Kontext erkannt (Larche *et al.*2007).

Die Darstellung von Allergenen mithilfe rekombinanter DNA-Technologien erlaubt eine exakte Zusammensetzung und Konzentration der Allergene für die Verabreichung einer Patienten-angepassten Allergen-Komposition. In diesem Zusammenhang muss jedoch beachtet werden, dass die Wahl des Expressionssystems, als auch Puffer- und Lagerungsbedingungen bei der „Produktion“ erwiesenermaßen Einfluss auf die Allergenität der Proteine haben, da sie veränderte posttranslationalen Modifikationen oder Faltungstopologien verursachen können (Wallner *et al.* 2009; Seismann und Blank 2010).

Mehrere klinische Studien konnten die Effizienz einer SCIT, die mit rekombinanten Allergenen durchgeführt wurde, nachweisen. Eine Applikation von fünf rekombinanten Wildtyp-Allergenen des Wiesenlieschgrases zeigte die gewünschte Effizienz (Jutel *et al.* 2005). In einer 2008 veröffentlichten klinischen Studie wurde ein direkter Vergleich für die Verwendung rekombinant dargestellter und extrahierter Bet v 1-Allergene des

Birkenpollen für eine Desensiblilsierung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass mithilfe rekombinanter Proteine nahezu identische Effekte erzielt werden konnten (Pauli et al 2008). Noch nicht gänzlich geklärt ist die Frage, wieviele rekombinante Allergene einer Quelle in kommerziellen Präparaten enthalten sein müssen und inwieweit unterschiedliche Isoformen eines Allergens berücksichtigt werden müssen.

Rekombinante Allergene bieten zudem den Vorteil, dass sie durch Mutagenese verändert und B-Zell-Epitope auf der Oberfläche eliminiert werden können. Es entstehen sogenannte hypoallergene Varianten mit reduziertem Potential zur Rezeptor-Quervernetzung. Um die dreidimensionale Struktur von Allergenen zu verändern, werden unterschiedliche Strategien verfolgt. Neben der Mutation oder Deletion einzelner Aminosäuren wurden auch Konzepte der Oligomerisierung und Entwicklung von Allergenhybrideen verwirklicht (Linhart *et al.* 2008). Durch *in vitro*-Analysen werden die modifizierten Proteine Immuninhibitionstests und Analysen zur Aktivierung und Degranulation von Basophilen unterzogen, um sie auf ihre verbleibende IgE-Reaktiviät hin zu testen. Zur Evaluierung der Immunogenität, also des Potentials eine Immunantwort auszulösen, werden T-Zellen allergischer Patienten kultiviert und ihre Aktivierung bei Zugabe des modifizierten Allergens untersucht. Eine umfassende Evaluierung impliziert auch *in vivo*-Studien, die zunächst als Haut- und Provokationstests am Patienten durchgeführt werden (Cromwell *et al.* 2011). Ebenfalls anhand des Bet v -Allergens wurde der Ansatz eines rekombinanten hypoallergenen Vakzins bis zur klinischen Anwendung realisiert. Dies führte 2004 zur Veröffentlichung der Ergebnisse der ersten und bislang einzig vollendeten klinischen Studie zur Immunisierung von Patienten mit einem hypoallergenen Allergenderivat im Rahmen einer SCIT. Verabreicht wurden zwei verkürzte Fragmente des Bet v 1-Allergens sowie ein artifizielles Allergen-Trimer (Niederberger *et al.* 2004). Obwohl das hypoallergene Potential dieser Allergenderivate zuvor belegt werden konnte, wurde lediglich eine verringerte Effizienz bei einem erhöhten Risiko systemischer Reaktionen im Vergleich zur gewöhnlichen SCIT dokumentiert. Mausmodelle mit dem Katzen-Allergen Fel d 1 und weitere noch laufende Studien zeigen vielversprechendere Resultate (Saarne *et al.* 2011; Pree *et al.* 2007; Kahlert *et al.* 2008).

Neben der Veränderung von Allergenen ist eine weitere Strategie die, vor oder während der SIT durchgeführte, parallele Applikation immunmodulierender Therapeutika oder Adjuvantien. Hier konnten für die Verabreichung des humanisierten Anti-IgE-Antikörpers Omalizumab vor einer SCIT ein verringertes Therapierisiko anaphylaktischer Reaktionen und reduzierte Symptome allergischer Rhinitis erreicht werden (Casale *et*

al. 2006). Ob dieser Effekt bei Absetztung des Omalizumab und einer Fortführung der SCIT andauert, wird derzeit untersucht.

In einer Reihe weiterer Ansätze wird versucht durch zusätzliche Stimulation von TLR auf APC, die natürlicherweise T_{REG}- sowie T_H1-Zell-Antworten auslösen, die Effekte einer traditionellen SCIT zu verstärken. Agonisten des TLR-4 sind Endotoxine, wie LPS, der TLR-9 erkennt hingegen unmethylierte Nukleotidsequenzen mit benachbarten Cytosin- und Guanin-Nukleotiden (CpG, *Cytosine-phosphate-Guanine*), ein Motiv, welches in eukaryotischen Organismen methyliert vorliegt. Eine positive Wirkung dieser Substanzen konnte bei Pollenallergikern *in vivo*, besonders bei SCIT-additiver Verabreichung vor der Pollensaison, beobachtet werden (Casale *et al.* 2011). Die CpGs wirken effizienter, wenn sie an ein unspezifisches Allergen gekoppelt werden (Creticos *et al.*2006; Casale *et al.* 2011).

Die Fusionierung von Allergenen mit humanen IgG-Fc-Domänen soll eine Allergen-induzierte Quervernetzung von IgE-Rezeptoren auf Mastzellen verhindern, indem ebenfalls auf den Zellen befindliche FcγII- mit den FcεI-Rezeptoren quervernetzt werden. Hierfür wurde bereits ein Mausmodell etabliert (Zhu *et al.* 2005). Das Gebiet neuer oder modifizierter Therapien wird durch Studien mit intralymphatischen Injektionen, an Viruspartikel fusionierten Allergenen und Molekülen, die eine Verstärkung der Allergen-Präsentation als MHC-II-Peptidkomplexe auslösen, erweitert (Akdis *et al.* 2009).

Da viele Ansätze für Verbesserungen der SIT auf der Zerstörung der B-Zell-Epitope der Allergene beruhen, könnte eine Charakterisierung originärer humaner IgE-Epitope zu gezielten Strategien mit exakt definierten Allergen-Modifikationen führen. Die Verfügbarkeit monoklonaler, allergenspezifischer Antikörper bietet die Möglichkeit, solche Epitopcharakterisierungen durchzuführen. Mithilfe rekombinante DNA-Technologien lassen sich variable Antikörper-Domönen in Form kombinatorischer Bibliotheken in geeignete Vektoren insertieren, und durch Selektionsstrategien können allergenspezifische Antikörperfragmente erhalten werden. Für eine nachfolgende Analyse müssen diese dann in geeignete Formate übertragen werden. Im letzten Teil dieser Einleitung sollen kurz die Erstellung und Verwendung kombinatorischer Antikörperbibliotheken erläutert werden.

1.3 Kombinatorische Antikörperbibliotheken

Die Anwendung monoklonaler Antikörper reicht von Forschungszwecken und dem Einsatz für diagnostische Zwecke bis hin zu therapeutischen oder Therapie-begleitenden Applikation z.B. in der Onkologie.

Die Darstellung monoklonaler Antikörper gelang Köhler und Milstein durch Fusionierung Antikörper-sezernierender muriner Milzzellen mit Myelomzellen (Köhler und Milstein 1975). Eine so erhaltene immortalisierte hybride Myelomzelllinie sezerniert monoklonale Antikörper. Durch vorhergehende Immunisierung der Maus mit einem Antigen kann die Spezifität der Antikörper definiert werden. In Bindungsanalysen werden dann nur solche Zelllinien selektiert, deren Antikörper das Zielmolekül binden. Die Technologie ist zeitaufwendig, kostenintensiv und konnte bislang nicht für die Generierung monoklonaler IgE-Antikörper erweitert werden. Die Verfügbarkeit von IgE-Antikörpern ist jedoch durch die geringe Konzentration im Serum stark begrenzt.

Seit einiger Zeit haben sich rekombinante Verfahren etabliert, die eine relativ einfache Erstellung, Selektion und Manipulation von Antikörper-Bibliotheken erlauben. Die bekanntesten Verfahren sind das Ribosomendisplay und das Phagendisplay, wobei letzteres am häufigsten zum Einsatz kommt. Hierbei werden variable Antikörperdomänen auf genetischer Ebene randomisiert verknüpft und in ein Phagemid eingebracht. Bei Infektion eines geeigneten Wirtsstammes mit dem Phagemid erfolgt die fusionierte Expression eines Antikörperfragmentes mit einem Phagenprotein. Diese phänotypische Phagenbibliothek kann dann einer Festphasen-Selektion mit dem Zielprotein unterzogen werden. Der Erhalt eines spezifisch bindenen Phagens liefert einem dann, nach Amplifikation des Phagemids in dem Wirtsorganismus, das isolierte Phagemid und somit die Sequenzinformationen der variablen Antikörperdomänen. Diese können dann für die Darstellung gewünschter Antikörperformate verwendet werden.

Durch die Darstellung des naiven Immunrepertoires aus Wirbeltieren sowie durch synthetisch randomisierte Bibliotheken kann eine hohe Diversität generiert werden. Beide Ansätze lassen die Selektion gegen diverse Antigene zu. Antikörper aus synthetischen Bibliotheken erkennen jedoch auch nichtimmunogene Epitope und sind für die Analyse der originären Allergen-IgE-Interaktion weniger geeignet. Immunbibliotheken, bei denen eine Immunisierung mit dem Zielantigen erfolgt, liefern hochspezifische Antikörper, die eine Affinitätsreifung vollzogen haben. Die Verwendung einer Bibliothek, die das

Immunrepertoire eines allergischen Patienten beinhaltet, eine so genannte Patientenbibliothek, erlaubt die Selektion und anschließende Analyse orginärer IgE-Antikörper, die in direktem Kontext zur Allergie stehen. IgE-Bibliotheken zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur solche V_H-Domänen eines allergischen Patienten beinhalten, die auf mRNA-Ebene durch Isotypenwechsel mit den konstanten Regionen eines IgE-Antikörpers verknüpft waren (s. Abb. 1.6).

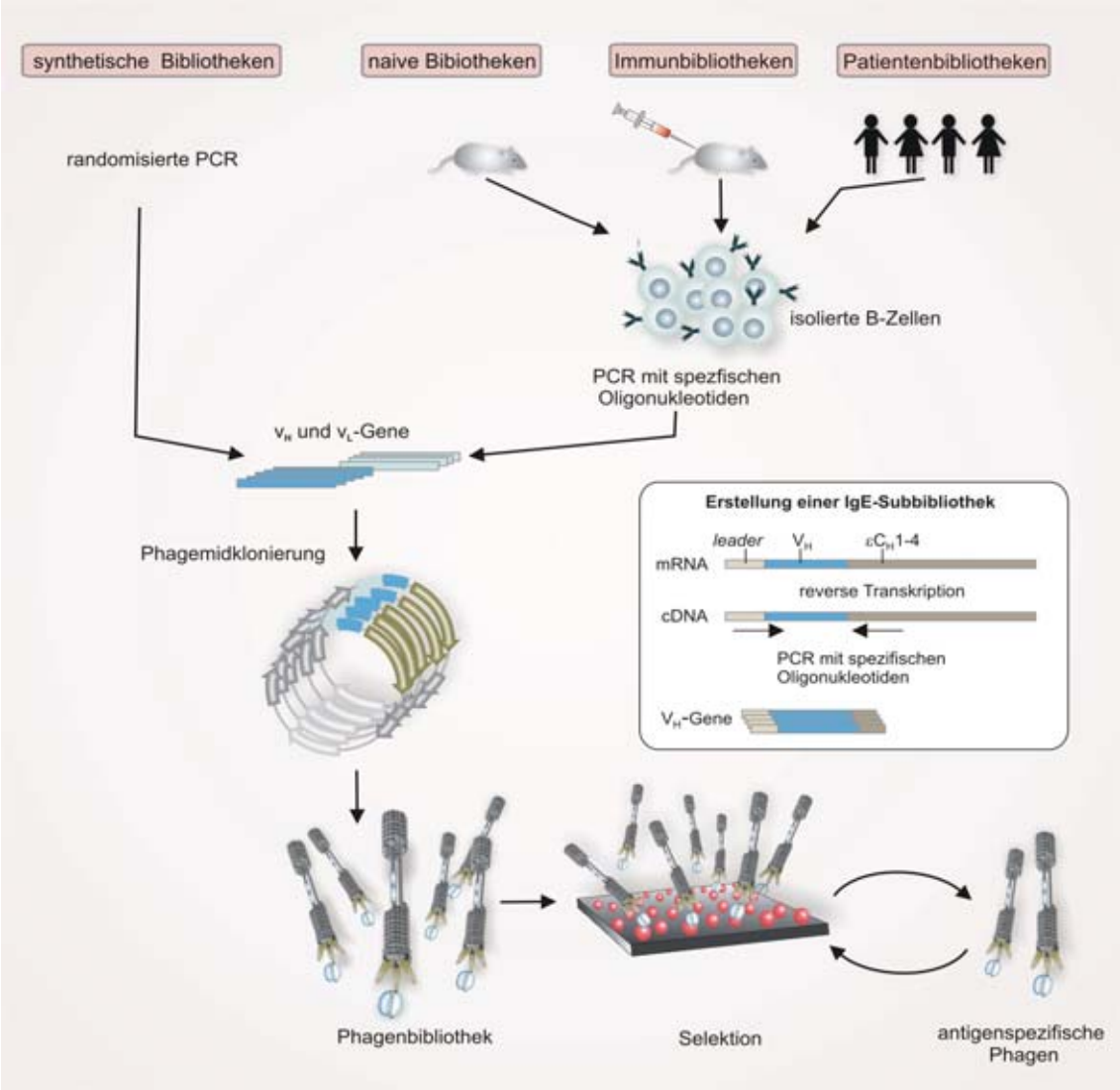


Abb. 1.6 Phagendisplay-Antikörperbibliotheken

Die Gene von V_H und V_L-Domänen werden in ein Phagemid insertiert. Sie können synthetischen Ursprungs oder dem Immunrepertoir von Wirbeltieren entnommen sein. Aus der Phagenbibliothek können dann durch Festphasenselektion bindende Phagen isoliert werden. Im Falle einer IgE-Bibliothek werden durch die Oligonukleotide nur V_H-Domänen verwendet, die auf mRNA-Ebene mit der Sequenz von εC_H-Genen verknüpft waren.

Als Grundlage dieser Arbeit diente, zur Darstellung einer Bibliothek diente die mRNA von $CD^{+}19$ B-Zellen dreier Birkenpollen-Allergiker, die dann in einer reversen Transkription IgE-spezifisch umgeschrieben wurde. Die V_H-Regionen wurden mit Oligonukleotiden amplifiziert, welche das gesamte Repertoire humaner V_H-Sequenzen abgedeckten und die *pool*-Bibliothek dieser V_H-Sequenzen wurde in das Phagemid pHEN2 insertiert, in dem humane V_L Regionen mit synthetisch-randomisierten CDR-Regionen der Griffin 1- Bibliothek vorhanden waren (Griffin und Ouwehand 1995). Diese Bibliothek konnte erfolgreich einer Selektion gegen Bet v 1 unterworfen werden und ein bindendes scFv für weitere Analysen zugänglich gemacht werden.

Das Phl p 5a-spezifische scFv (*single chain fragment variable*), welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, entstammte einer Phagen-Bibliothek bei der Fab (*fragment antigen binding*) auf der Oberfläche filamentöser Phagen einer Allergenselektion unterzogen wurden (Steinberger *et al.* 1996; Flicker *et al.* 2000).

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine molekulare Analyse der spezifischen Interaktion von Allergenen mit monoklonalen Antikörpern ermöglicht werden. Die aus dieser Analyse gewonnenen Erkenntnisse könnten herangezogen werden, um verbesserte Wirkstoffe im Rahmen einer Immuntherapie allergischer Erkrankungen zu generieren. Selektanden in Form eines Bet v 1a- und eines Phl p 5a-spezifischen scFv sollten in bivalente Formate der Allergie-relevanten Antikörper-Isotypen IgE, IgA und IgG überführt werden. Neben der Eigenschaft der Bivalenz sollten die generierten Antikörperkonstrukte über das Potential zur Bindung ihrer spezifischen Fc-Rezeptoren und natürliche humane posttranslationale Modifikationen verfügen, um im weiteren Verlauf zelluläre Funktionsanalysen zu ermöglichen. Bei einer erfolgreichen Darstellung der Antikörper sollten diese mithilfe geeigneter Reinigungsmethoden isoliert und Interaktionsanalysen zur Charakterisierung ihrer Bindungseigenschaften unterzogen werden. Es sollte sowohl die Allergen-Antikörper-Interaktion als auch die Bindung an Rezeptoren sowie die Induktion von Effektoreigenschaften betrachtet werden. Durch eine rekombinante Darstellung der Allergene, die eine gezielte Veränderung definierter Teilbereiche erlaubt, sollte dann versucht werden, essentielle Strukturen für die Allergen-Antikörper-Wechselwirkung zu identifizieren.

2 MATERIAL

2.1 Enzyme und Standards

Die folgenden Enzyme und Standards wurden üblicherweise bezogen von:

MBI Fermentas (St. Leon-Rot):	Restriktionsenzyme
	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
	Shrimp Antarctic Phosphatase
	T4-DNA-Ligase
	PageRuler™ Prestained Protein Ladder,
	PageRuler™ Unstained Protein Ladder
	λ-DNA/Eco130I (421-7743 bp)
	λ-DNA/Eco47I (308-8126 bp)
	pUC19 DNA/MspI (67-501 bp)
	DreamTaq™ DNA-Polymerase
Invitrogen (Karlsruhe):	SuperScrip™ III *Reverse Transcriptase*
	Accuprime™ Pfx-Polymerase

2.2 Antikörper

Das verwendete Bet v 1a-spezifische Antikörperfragment wurde im Arbeitskreis durch Amir Sabri aus einer, ebenfalls von ihm generierten, scFv-Bibliothek selektiert. Das verwendete Phl p 5a-spezifische Antikörperfragment wurde als Fab-Fragment selektiert (Steinberger *et al.*1996) und Sequenzinformationen der variablen Ketten verwendet, um im Arbeitskreis durch Mutation eines anderen scFv diese scFv zu generieren. Die verwendeten allergenspezifischen Hybridom-Zell-Antikörper wurden durch die Hybridomtechnolgoie generiert (Köhler und Milstein,1975) und und eine Umklonierung in humane Antikörperkonstrukte erfolgte durch Stefanie Etzold und Ingke Braren. Als primäre Antikörper, Direkt-Konjugate oder sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Sigma-Aldrich (Taufkirchen):	Anti-murin IgG AP-Konjugat
	Anti-human IgG (γ-Kette) AP-Konjugat
	Anti-human IgA AP-Konjugat
BD Biosciences (Heidelberg)	Anti-human IgE AP-Kongugat (monoklonal)
	Anti-human CD89 PE-Konjugat
	Anti-human IgE
YO Proteins (Huddinge)	Anti-human IgA FITC-Konjugat
NEB	Anti-CBD (monoklonal)
5Prime (VWR, Darmstadt)	Anti-Penta His

2.3 Chemikalien und Bioreagenzien

Standard-Chemikalien, Salze, etc. wurden üblicherweise von Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), PeqLab (Erlangen), AppliChem (Darmstadt) oder Calbiochem (Schwalbach), Millipore (Eschborn) bezogen.

Pierce, Thermo Scientific (Bonn)	EZ-Link TFPA-PEG^3-Biotin
AppliChem (Darmstadt)	pNAG
Carl Roth GmbH (Karlsruhe)	*Roti^R-MagBeads Streptavidin*

2.4 Affinitätsmatrizes

Folgende Affinitätsmatrices wurden bezogen von:

QIAGEN (Hilden):	Ni-NTA-Agarose
Sigma-Aldrich (Taufkirchen):	Protein L-Agarose
NEB:	Chitin-Beads
	Amylose- Resin

2.5 Bakterienstämme und Zelllinien

Bei den eingesetzten Bakterienstämmen handelte es sich um verschiedene *E. coli* K12-Stämme. Für Klonierungen und Standard-Anwendungen molekularbiologischer Arbeiten sowie zur Expression von MBP-Fusionskonstrukten wurden XL1blue-Zellen eingesetzt. Für Expressionen von Intein-CBD-Fusionskonstrukten wurde der Expressionsstamm BL21(DE3) genutzt (Clontech, Palo Alto, Ca). Zur rekombinanten Expression von Antikörpern wurde die humane Zelllinie HEK293 verwendet (Invitrogen life techno-

logies, Karlsruhe). Für die FACS-Analysen hinsichtlich der Rezeptorbindung von IgA-Antikörpern wurden U937-Zellen verwendet (Invitrogenlife technologies, Karlsruhe). Degranulationsanalysen wurden mit RBL-2H3-SX38-Zellen durchgeführt, die freundlicherweise durch JP Kinet vom *Department of Pathology* des *Beth Israel Deaconess Medical Center*, Boston zur Verfügung gestellt wurden.

2.6 Vektoren

Die Vektoren pMAL-c2X und pTXB1 für die prokaryotische Expression der Allergen-Fusionskonstrukte wurden von NEB (Frankfurt am Main) bezogen. Die Vektor-Systeme pcDNA3.1$^+$/Zeo und pBudCE4.1 zur eukaryotischen Expression in HEK293-Zellen wurden von Invitrogen life technologies (Karlsruhe) bezogen. Die Vektoren pMal-Phlp5a und pMal-Phlp5b wurden freundlicherweise von Arnd Petersen aus dem Forschungzentrum Borstel zur Verfügung gestellt.

2.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der *metabion*-Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Die Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt.

2.8 Puffer und Lösungen

Die benutzten Puffer, Lösungen sowie ihre Zusammensetzungen sind nachfolgend aufgeführt.

Agarosegel-Auftragspuffer (6x):	0,09 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,09 % (w/v)	Xylen Cyanol FF
	60 % (w/v)	Glycerol
	60 mM	EDTA
Ampicillin-Stocklösung:	20 mg/ml	Ampicillin
	70 % (v/v)	Ethanol
	30 % (v/v)	ddH_2O
Amylose-Säulenpuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,40
	200 mM	NaCl
	1 mM	EDTA, 45 µm filtrieren
Amylose-Elutionspuffer:	10 mM	Maltose in Amylose-Säulenpuffer lösen, 45µm filtrieren

APS-Stocklösung:	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat in ddH_2O lösen Lagerung bei +4 °C
Carbonatpuffer:	100 mM	Carbonat
(für Degranulationsanalysen)	0,53 g	Natriumcarbonat
	0,42 g	Natriumhydrogencarbonat
Chitin-Säulenpuffer:	20 mM	Tris-HCL, pH 8,5
	500 mM	NaCl
	1 mM	EDTA , 45 µm filtrieren
Citratpuffer (für HRP):	50 mM	Zitronensäure, pH 4,0
Citratpuffer (für pNAG):	53 mM	Zitronensäure
	47 mM	tri-Natriumcitrat x H_2O, pH 4,5 einstellen
Coomassie-Färbelösung:	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250
	1 % (v/v)	Eisessig
	40 % (v/v)	Methanol
Coomassie-Entfärbelösung:	20 % (v/v)	Eisessig
	80 % (v/v)	Wasser
Detektionspuffer (für AP):	0,1 M	Tris-HCl, pH 9,5
	1 M	$MgCl_2$ x $6H_2O$
	0,1 M	NaCl,
EDC-Lösung:	400 mM	EDC, in ddH_2O lösen, Lagerung in 180 µl Aliquots bei -20°C
Detektionspuffer (für HRP im ELISA):	3,3 mg	ABTS
	15 ml	Citratpuffer, pH 4,0
	30 µl	H_2O_2 (30 %)
FKS:		30 min bei 56 °C hitzeinaktivieren, Lagerung in 50 ml Aliquots bei -20 °C
Glucose-Stocklösung:	20 % (w/v)	α-D-Glucose (wasserfrei) in ddH_2O lösen, steril filtrieren
Kanamycin-Stocklösung:	20 mg/ml	Kanamycin in ddH_2O lösen, steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C
NaAc-Lösung:	3 M	Natriumacetat, pH 5,2
Neutralisierungspuffer	1 M	Tris pH 7,4
NBT-Stocklösung:	0,1 % (w/v)	NBT in 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, Lagerung bei -20 °C
NHS-Lösung:	100 mM	NHS in ddH_2O lösen, Lagerung in 180 µl Aliquots bei -20°C

Ni-NTA Puffer (10 X):	500 mM	NaH_2PO_4
	3 M	NaCl
	100 mM	Imidazol, 10 fach verdünnen, pH 7,8
PAGE-Probenpuffer (3x):	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	40 % (v/v)	Glycerol
	8 % (w/v)	SDS
	0,004 % (w/v)	Bromphenolblau
reduzierend:	100 mM	DTT zusätzlich
PAGE-Sammelgel-Puffer (4x):	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS, Lagerung bei +4 °C
PAGE-Tankpuffer (5x):	0,125 M	Tris-HCl, pH 8,3
	0,96 M	Glycin
	0,5 % (w/v)	SDS
PAGE-Trenngel-Puffer (4x):	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 % (w/v)	SDS, Lagerung bei +4 °C
PBS :	100 mM	NaCl
	33 mM	Na_2HPO_4 wasserfrei
	17 mM	NaH_2PO_4-Monohydrat, pH 7,4 einstellen
PEG/NaCl-Lösung:	20 % (w/v)	Polyethylenglycol-6000
	2,5 M	NaCl, autoklavieren
Phenol/Chloroform:	50 % (v/v)	Phenol (Tris-gesättigt)
	50 % (v/v)	Chloroform
pNAG-Substratlösung:	8 mM	pNAG in Citratpuffer lösen, Lagerung in 2 ml Aiquots bei -20 °C
Protein L Elutionspuffer:	100 mM	Zitronensäure pH 3
Quantifizierungs-Blockierlösung:	50 mM	Tris
	140 mM	NaCl
	1% (w/v)	BSA, pH 8 einstellen
Quantifizierungs-Verdünnungslösung:	50 mM	Tris, pH 8
	140 mM	NaCl
	1% (w/v)	BSA
	0,05% (v/v)	Tween 20
Quantifizierungs-Waschlösung:	50 mM	Tris, pH 8
	140 mM	NaCl
	0,05% (v/v)	Tween 20
SDS-Stocklösung:	10 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat in ddH_2O
SDS-PAGE Anodenpuffer:	40 mM	Tris, pH 8,9
SDS-PAGE Kathodenpuffer:	100 mM	Tris, pH 8,6
	100 mM	Tricin

	0,1 % (w/v)	SDS
TAE (50x):	2 M	Tris-Acetat,
	50 mM	EDTA, pH 8,5 mit Essigsäure einstellen
TBS	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
TPBS (für SPR):	0,01 % (v/v)	Tween 20 in PBS
Transferpuffer:	25 mM	Tris, pH 8,3
	19,2 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Isopropanol
Tris-Puffer:	1 M	Tris-HCl, pH 7,5
Tris-Tricin Gelpuffer:	3 M	Tris, pH 8,45
	0,3 % (w/v)	SDS
Tyrodes-Puffer	7,6 g	NaCl
	0,4 g	Kcl
	0,2 g	$CaCl_2$ x $2H_2O$
	0,2 g	$MgCl_2$ x $6H_2O$
	2,4 g	HEPES, ad 1L ddH2O, pH 7,4
vor Gebrauch hinzugeben:	0,1 % (w/v)	BSA
	0,1 %(w/v)	Glucose

2.9 Medien

Das Gewebekulturmedium DMEM, Trypsin-EDTA und die Antibiotika Zeocin, Penicillin G und Streptomycin wurden von Invitrogen life technologies (Karlsruhe) geliefert, FKS von BIOCHROM AG (Berlin) und das Transfektionsreagenz jetPEI™ von Qbiogene GmbH (Heidelberg). Gewebekulturflaschen und Gewebekulturplatten wurden von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) sowie Sarstedt AG und Co. (Nümbrecht) bezogen.

Einfriermedium für HEK293:	90 % (v/v)	FKS
	10 % (v/v)	DMSO (für die Zellkultur)
Medium für HEK293-Zellen	10 % (v/v)	FKS
	1 % (v/v)	Pen/Strep, in DMEM
Medium für RBL-2H3-SX38-Zellen:	15 % (v/v)	FKS
	1 % (v/v)	Pen/Strep,
	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyrovat, in MEM

Medium für U937-Zellen:	10 % (v/v)	FKS
	1 % (v/v)	Pen/Strep, in RPMI-1640
TYE-Medium-Platten:	10 g/l	Trypton
	8 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	15 g/l	Agar, autoklavieren
2YT-Medium:	16 g/l	Trypton
	5 g/l	NaCl
	10 g/l	Hefeextrakt

2.10 Verwendete Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden bezogen von:

MBI Fermentas (St. Leon-Rot)	*GeneJET™Plasmid Miniprep Kit*
	GeneJET™Gel Extraction Kit
Applied Biosystems (Darmstadt):	*Big Dye-Terminator Ready Reaction Kit*
Stratagene, La Jolla, CA:	*Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit*
Bethyl Lab. In. (Montgomery):	Human IgE, IgG, IgA *ELISAQuantitationSets*
	Huhn IgY *ELISAQuantitation Set*

2.11 Verbrauchsmaterialien

Sämtliches Material sowie Plastikware für den Laborbedarf wurden bezogen von Sarstedt AG und Co. (Nümbrecht), Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Eppendorf AG (Hamburg), Renner GmbH (Dannstadt), Millipore GmbH (Schwalbach), Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH (Hamburg), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg).

2.12 Geräte

Eppendorf AG (Hamburg):	BioPhotometer
	Centrifuge 5417 C
	Centrifuge 5417 R

	Mastercycler gradient
	Mastercycler personal
Heraeus Sepatech GmbH (Osterode/Harz):	Heraeus Megafuge 1.0
PEQLAB Biotechnolgie GmbH (Erlangen):	Horizontal-Gelelektrophoresesystem
New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen):	innova™ 4300 incubator shaker
SANYO Electric Co., Ltd. (Japan):	SANYO CO_2-Inkubator MCO-17AI
Kendro Laboratory Products GmbH:	CO_2-Begasungsinkubator
(Langenselbold)	HERAsafe HS 18 Sicherheitswerkbank
Intas GmbH (Göttingen):	Gel-Dokumentations-System
TECAN Deutschland GmbH (Crailsheim):	GENIOS Multi-Detektions-Reader
Hoefer Scientific Instruments:	Minigel-Apparatur-SDS-PAGE
(San Francisco, CA; USA)	
Branson Utrasonics (Shanghai)	250-240 Sonifier Analog Cell Dispuptor
Sierrasensors (Hamburg)	SPR-2 Biosensor
GE Healthcare (München)	Biacore-T00 *Biosensor*
Amersham Biosciences Europe GmbH	Electrophoresis power supply EPS 3500XL
(Freiburg):	
bioStep GmbH (Jahnsdorf):	20 x 20 Semi Dry Blotter Unit
Systec GmbH (Wettenberg) :	Laborautoklav Systec V120
Millipore GmH (Schwalbach):	Milli-Q Academic, Laborwasser-System
Sartorius AG (Göttingen):	Waagen
Otto Steiner GmbH und Co KG (Hamburg):	UV-Transilluminator (302 nm, 90 W)

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben nach (Sambrook *et al.* 1989) durchgeführt. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde hochreines Wasser aus der Filteranlage Milli-Q Academic verwendet. Einige Puffer, Lösungen und alle Medien wurden in einem Autoklav durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf 20 min bei 120 °C sterilisiert.

3.1.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des *First Strand cDNA Synthesis Kit* durchgeführt. Das *First Strand cDNA Synthesis Kit* beruht auf der Verwendung einer klonierten Reversen Transkriptase des Moloney murinen Leukämie Virus (M-MuLV RT), die in der Lage ist, bei gleichzeitiger Zugabe eines Oligonukleotides die mRNA in ihre stabilere Form, die cDNA umzuschreiben. Diese kann dann in einer PCR als Matrize zur Amplifikaiton benötigter DNA-Sequenzen verwendet werden. Mithilfe des Kits wurde eine Reverse Transkription durchgeführt, bei der zwei unterschiedliche Oligonukleotide (Primer) verwendet wurden. Es wurden Oligo-(dT)-Nukleotide verwendet, die mit mRNA, die über einen Poly(A)-Schwanz am 3´-Ende verfügt, hybridisieren. Bei der Reversen Transkription entsteht zunächst ein RNA-DNA-Hybrid, das für weitere Anwendungen, wie z.B. für eine PCR zugänglich ist.

Es wurden 200-500 ng isolierter m-RNA, die im Arbeitskreis mithilfe des TRIzol™-Reagenzes aus B-Lymphozyten isoliert wurde mit 50 pmol des oligo(dT)-Primers, bzw. des spezifischen Primers und 5 µl dd-H_2O versetzt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 4 µl des Reaktionspuffers, 2 µl dNTP-Mix, 0,5 µl Ribolock™ und 1,5 µl dd-H_2O versetzt und nach Inkubation bei 37 °C für einen Zeitraum von 5 min mit 1 µl M-MuLV RT supplementiert. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 50 °C für den Ansatz mit dem oligo (dT)-Primer und bei 55 °C für den Ansatz mit genspezifischem Primer inkubiert und die Reaktion durch eine Inkubation bei 70 °C für 10 min gestoppt.

Jeweils 3 µl der so erhaltenen cDNA wurde für die nachfolgenden PCR-Reaktionen eingesetzt.

3.1.2 PCR

Die PCR wird zur *in vitro*-Amplifikation kleinster DNA-Mengen unter Einsatz von Oligonukleotiden bekannter Sequenz verwendet (Mullis *et al.* 1986). Diese Primer werden so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Die Enden des Amplifikates können auf diese Weise mit Modifikationen, wie z.B. den Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen oder kleinen Fusionspeptiden wie einem Histidintag versehen werden. Die PCR lässt sich grundsätzlich in drei Reaktionsschritte unterteilen. Zunächst erfolgt eine Denaturierung des vorgelegten DNA-Doppelstrangs, der als Matrize dienen soll bei 94 °C denaturiert. Im nächsten Schritt (*annealing*) wird die Temperatur erniedrigt sodass die spezifischen Oligonukleotide entsprechend ihrer Sequenz an die komplementäre Sequenz auf dem DNA-Strang, binden. Daraufhin beginnt die Synthese der Komplementärstränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von freien dNTP (Elongationsphase). Durch eine zyklische Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes. Als DNA-Polymerase wurde für Klonierungen der Antikörper-Expressionvektoren die thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq) bewährt, die ihr Temperatur-Optimum bei 72 °C besitzt. Sie besitzt eine hohe 5´-3´-Polymeraseaktivität, aber keine 3´-5´-Exonukleaseaktivität. Für Amplifikationen der DNA-Sequenzen die zur Klonierung von Expressionvektoren der rekombinanten Allergene verwendet wurden, wurde meist eine ebenfalls thermostabile Vent- oder Pfu-DNA-Polymerase verwendet, die beide über eine 3´-5´-Exonukleaseaktivität verfügen, wodurch Mutationen in den DNA-Strängen von $1x10^{-3}$ auf bis zu $1x10^{-6}$ pro Base minimiert werden können.

Als Elongationsgeschwindigkeit für die Taq- und Vent-Polymerase werden 1000 bp min^{-1} zugrunde gelegt, für die Pfu-Polymerase jedoch nur 500 bp, sodass die Länge der Elongationsphase entsprechend der Länge der Matrize gewählt wurde. Für PCR-Reaktionen wurden üblicherweise 2-50 pg Plasmid-DNA, bzw. 2 µl des cDNA-Synthese-Ansatzes mit 5 µl Reaktionspuffer (10x), der $MgCl_2$ in einer Endkonzentration von 2 mM, enthielt, 1 µl dNTP-Mix und jeweils 25 pmol des *sense*- und des *antisense*-Primers versetzt, mit ddH_2O auf 50 µl aufgefüllt und mit 1 µl der Polymerase (1 U/µl)

supplementiert. Anschließend wurde folgendes Standard-Programm durchgeführt (s. Tab. 3.1).

Tabelle 3.1 Standard-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Primärdenaturierung	94°C	1,5 Min	1
Denaturierung	94°C	1 Min	30-35
annealing	48-65°C	1-1,5 Min	30-35
Elongation Taq/Vent Pfu	72°C 72°C	1 Min/1000 bp 2 Min/1000 bp	30-35
Endelongation	72°C/	5 Min	1

Um DNA-Fragmente mit überlappenden Enden zu einem einzigen Strang zusammenzufügen, z.B. für die Amplifikation der kompletten konstanten Region der IgA1 und IgA2 C_H1-3-Ketten oder für die Verknüpfung einzelner Sequenzabschnitte bei der Mutation von Bet v 1iso zu Bet v 1a wurden Hybridisierungs-PCR-Analysen durchgeführt. Dieser PCR folgt nach sieben Zyklen ohne die Zugabe von Primern, in denen die beiden überlappenden Fragmente hybridisieren und durch die DNA-Polymerase aufgefüllt werden, eine Standard-PCR mit Primern, die am 5'-Ende des ersten Fragmentes und am 3'-Ende des zweiten Fragmentes hybridisieren, wodurch das komplette Amplifikat entsteht.

Tabelle 3.2 Hybridisierungs-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Primärdenaturierung	94°C	1,5-2 Min	1
Denaturierung	94°C	1 Min	7
annealing	48-65°C	1-1,5 Min	7
Elongation Taq/Vent Pfu	72°C 72°C	1 Min/1000 bp 2 Min/1000 bp	7
Primerzugabe			
Denaturierung	94°C	0,5-1 Min	29
annealing	48-65°C	1-1,5 Min	29
Elongation Taq/Vent Pfu	72°C 72°C	1 Min/1000 bp 2 Min/1000 bp	29
Endelongation	72°C/	5 Min	1

3.1.3 Ortsgerichtete Punktmutagenese

Wenn für eine gewünschte Mutation lediglich wenige definierte Punktmutationen vorgenommen werden mussten, z.B. für einen einzelnen Aminosäure-Austausch wurde das *Quick Change*® *Site-Directed Mutagenesis Kit* verwendet. Dieses System bietet die Möglichkeit *in vitro* Punktmutationen oder Aminosäureaustausche in den vorliegenden Expressionvektor einzuführen oder einzelne oder mehrere Aminosäuren zu deletieren, bzw. zu insertieren ohne die Notwendigkeit einer erneuten Klonierung. Grundlage dieses Kits ist die PfuTurbo® DNA-Polymerase, die eine sechsfach höhere Genauigkeit als die herkömmliche Taq-Poylmerase aufweist. Unter Verwendung von zwei Primern welche die gewünschte Mutation einführen werden mithilfe dieser Polymerase beide Stränge eines Plasmids, welches das zu mutierende Gen enthält, amplifiziert. Nach der Amplifikation wird das Reaktionsgemisch mit der Restriktionsendonuklease *Dpn*I, welche spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA erkennt, verdaut. Dadurch wird der parentale DNA-Strang verdaut, während der neusynthetisierte Strang zurückbleibt und anschließend für eine Transformation von *E. coli*-Zellen zur Verfügung steht. Für die Konzeption der Oligonukleotide muss bedacht werden, dass beide Primer die gewünschte Mutation enthalten und an den jeweils komplementären Bereich des anderen Plasmidstranges binden. Die Primer sollten eine Schmelztemperatur von über 78 °C aufweisen und zwischen 25 und 45 bp lang sein. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Primersequenz liegen und jeweils von ungefähr 10-15 Basen korrekter Sequenz flankiert sein. Da sich in der konstanten schweren Kette der IgA-Sequenzen eine interne *Xho*I-Erkennungssequenz befand, dieses Restriktionsenzym jedoch nicht ersetzt werden konnte, wurde diese mithilfe der Oligonukleotide IgAQC Xho for und IgAQC Xho back in den Vektoren pBud-αBetv1-IgA1, pBud-αBetv1-IgA2, pBud-αPhlp5-IgA1 und pBud-αPhlp5-IgA2 so ausgetauscht, dass eine stille Mutation stattfand.

Für die Reaktion wurden 5-50 ng des jeweiligen doppelsträngigen DNA-Templates mit 5 µl des Reaktionspuffers (10x), 13 pmol beider Primer und 1 µl eines 12,5 mM dNTP-Mixes vermischt, auf 50 µl mit ddH_2O aufgefüllt und mit 2,5 U der PfuTurbo® DNA-Polymerase versetzt. Das PCR-Programm wurde mit einem Zyklus von 30 s bei 95 °C begonnen für eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Es folgten 12 Zyklen mit drei Schritten: 30 bei 95 °C, 1 min bei 55 °C, 4,5 min bei 68 °C. Aus dem PCR-Ansatz wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion die DNA isoliert und diese mittels Alkohol-Präzipitation gefällt. Die DNA wurde in 20 µl ddH_2O aufgenommen,

10 U der Restriktionsendonuklease *Dpn*I hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung erneut einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Alkohol-Präzipitation unterzogen, um dann für eine Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen zur Verfügung zu stehen. Die resultierenden Klone wurden mittels Sequenzierungen auf die korrekte Einführung der Mutation hin überprüft.

3.1.4 Klonierungen von Expressionsvektoren

3.1.4.1 Klonierungen prokaryotischer Expressionsvektoren

Die für die Epitopanalyse des Bet v 1a benötigten, rekombinanten Isoformen, Fragmente und Mutanten des Bet v 1 wurden durch Insertion in den Vektor pMAL-c2X, der eine N-terminal fusionierte Expression mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) erlaubt, dargestellt. Hierdurch konnte die Löslichkeit des Bet v 1 erhöht werden, so dass eine Reinigung des nativ gefalteten Proteins möglich war. Der Vektor lag im Arbeitskreis bereits mit der insertierten Sequenz der Bet v 1 Isoform Bet v 1iso welche aus Birkenblättern isoliert wurde, vor. Er diente als Ausgangsvektor für die durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen zur Erstellung der Expressionvektoren von Bet v 1-Konstrukte. Die folgende Tabelle zeigt, welche Oligonukleotide und Matrizen in PCR-Ansätzen für die Erstellung der pMAl-Expressionsvektoren verwendet wurden. Klonierungsschemata für die Mutagenese oder den Aufbau einzelner Allergene sind ebenso gezeigt.

Tabelle 3.3 Verwendete Oligonukleotide und Matrizen für Bet v 1-Expressionsvektoren

Epressionsvektor	Primer	Matrize	Teilstück	Hybridisierung
pMal-Betv1a-His	39 for 43 back	pMal-Betv1-iso	1	Teilstück 1 mit Teilstück 2
	4 aufbauende PCRs: 44 for 40 back / 37 for 38 back / 41 for 45 back / 42 for 46 back	pMal-Betv1iso, PCR-Produkt	2	
pMal-Bev1a ad58-His	42 for 46 back	pMal-Betv1a-His		
pMal-Bev1a ad91-His	60 for 46 back	pMal-Betv1a-His		
pMal-Bev1a ad110-His	61 for 46 back	pMal-Betv1a-His		
pMal-Bev1a ad124-His	63 for 46 back	pMal-Betv1a-His		
pMal-Betv1a E/G149-His	2 aufbauende PCRs: 39 for 59 back / 39 for 46 back	pMal-Betv1a-His, PCR-Produkt		
pMal-Betv1a ad124 E/G149-His	63 for 46 back	pMal-Betv1a E/G149-His		
pMal-Mald1ad125 Betv1a-His	4 aufbauende PCRs: 67 for 40 back / 67 for 38 back / 67 for 45 back / 67 for 46 back	pMal-Mald1-His, PCR-Produkt		

Für die Amplifikation verwendete N-und C-termini-flankierende Oligonukleotide fügten am 5`-Ende des *sense*-Stranges eine *EcoR*I-Erkennungssequenz und am 3`-Ende des *antisense*-Stranges eine *Hind*III- Erkennungssequenz sowie ein Histidin-*tag* ein.

Das Prinzip einer aufbauenden PCR beruht auf dem schrittweisen Anfügen von DNA-Sequenzen an das 3`- oder 5`-Ende der Matrize durch konzipierte Überhänge in den Oligonukleotiden. Durch aufeinanderfolgende Reaktionen bei denen das jeweils vorherige Amplifikat als Matrize verwendet wird, kann so eine Verlängerung der Sequenz erfolgen. DNA-Sequenzen der Oligonukleotide sind dem Anhang zu entnehmen.

Für die Epitopanalyse des Phl p 5a wurden die vollständigen Allergen-Isoformen Phl p 5a und Phl p 5b ebenfalls mithilfe von pMAL-c2X-Expressionvektoren dargestellt. Die Vektoren pMal-Phlp5a und pMal-Phlp5b dienten als Matrize zur Amplifikation der DNA-Sequenzen aller dargestellten verkürzten Phl p 5-Fragmente, die in den Vektor pTXB1 insertiert wurden. Durch diesen Vektor erfolgt eine Expression als Intein-CBD-Fusionsprotein, wodurch eine Detektion mit einem Anti-CBD-Antikörper möglich war. Mithilfe der gezeigten Oligonukleotide und Matrizen wurden mittels PCR DNA-Sequenzen amplifiziert, die anschließend jeweils in den Vektor pTXB1 insertiert wurden und dadurch die folgenden Expressionsvektoren dargestellt werden konnten.

Dabei wurden die Oligonukeleotide so konzipiert, dass N-terminal eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Nde*I und C-terminal für die Restriktionsendonukleas *Sap*I eingefügt wurde.

Tabelle 3.4 Verwendete Oligonukleotide und Matrizen für Phl p 5-Expressionsvektoren

Epressionsvektor	Primer	Matrize	Teilstück	Hybridisierung
pTXB1-Phlp5a Fragment 1	18 for 19 back	pMal-Phlp5a		
pTXB1-Phlp5a Fragment 2	20 for 19 back	pMal-Phlp5a		
pTXB1-Phlp5a Fragment 3	18 for 21 back	pMal-Phlp5a		
pTXB1-Phlp5a Fragment 4	20 for 21 back	pMal-Phlp5a		
pTXB1-Phlp5b Fragment1	18 for 66 back	pMal-Phlp5b		
pTXB1-Phlp5 Fragment1chi	18 for 64 back	pMal-Phlp5b	1	Teilstück 1 mit Teilstück 2
	65 for 66 back	pMal-Phlp5b	2	

3.1.4.2 Klonierungen eukaryotischer Expressionsvektoren

Die beiden für die eukaryotische HEK293-Zell-basierte Expression verwendeten Vektorsysteme waren zum einen der monocistronische Expressionsvektor pcDNA3.1$^+$/Zeo, der durch den CMV-Promotor reguliert wird. Das Polyadenylierungssignal sowie die Transkriptions-Terminations-Sequenzen entstammen dem Rinderwachstumshormon BGH. Durch eine rodente Signalsequenz wird die Sekretion der Konstrukte in den Kulturüberstand induziert. Das Stopkodon muss durch das Insert beigesteuert werden.

Als Vektorsystem für die Expression der heterotetrameren Antikörperkonstrukte wurde der Expressionsvektor pBudCE4.1 gewählt, bei dem die Expression der schweren Kette durch den EF-1α-Promotor und die Expression der leichten Kette durch den CMV-Promotor reguliert wird. Die Sekretion in den Kulturüberstand wird hier ebenfalls durch rodente Signalsequenzen erzielt. In beiden Fällen dient das Sh ble-Gen (*Streptoalloteichus hindustanus* Bleomycin-Gen) als Selektionsmarker, denn durch die Bindung des Sh ble-Proteins an das Antibiotikum Zeocin wird dieses inaktiviert, so dass eine Resistenz gegenüber Zeocin vermittelt wird.

Die Abbildung 4.1 auf S. 65 zeigt beide Vektoren sowie die Expressionskassetten mit den verwendeten Restriktionsenzymen für die Insertionen von DNA-Sequenzen einzelner Immunglobulindomänen. Für die Konierungen von pBud-Expressionsvektoren wurden zunächst die variablen Ketten, die in dem Bibliotheks-Phagemid pHEN2 vorlagen, in die Vektoren eingefügt, wobei die Klonierungen von V_H und V_L-Domänen nacheinander erfolgten. Anschließend konnten die Ketten der konstanten schweren Domänen ausgetauscht werden um andere Isotypen bei gleichbleibender Spezifität zu genererieren. Ein pcDNA-basierter Expressionsvektor für die Darstellung von scFv-basierten IgE-Konstrukten lag bereits im Arbeitskreis vor und konnte verwendet werden um den Bereich der schweren konstanten Kette auszutauschen und dadurch Vektoren für andere Isotypen zu generieren.

Die Amplifikation der DNA-Sequenzen variabler und konstanter Ketten für anschließende Vektor-Insertionen wurde mit den in Tabelle 3.04 aufgelisteten Oligonukleotiden durchgeführt, die jeweils N- und C-terminal die entsprechenden Restriktionsschnittstellen einfügten. Oligonukleotide konstanter schwerer Ketten fügten ausserdem C-terminal ein Histidin-*tag* ein für eine Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA.

Tabelle 3.5 Verwendete Oligonukleotide, Ausgangsvektoren und Matrizen für Antikörper-Expressionsvektoren.

Expressionvektor	Insertion	Primer	Matrize	Destinationsvektor
pcDNA-αBetv1-scFv/IgA1C_H2-3 α1C_H2-3	α1C_H2-3	IgA1 Sgs for IgA His Xba back	oligo-dT-spezifsch-umgeschr.cDNA	pcDNA-αBetv1-scFv/IgEC_H2-4
pcDNA-αBetv1-scFv/IgA2C_H2-3	α2C_H2-3	IgA2 hinge sgs for IgA His Xba back	oligo-dT-spezifsch-umgeschr.cDNA	pcDNA-αBetv1-scFv/IgEC_H2-4
pcDNA-αPhlp5-scFv/IgA1C_H2-3	α1C_H2-3	IgA1 Sgs for IgA His Xba back	oligo-dT-spezifsch-umgeschr.cDNA	pcDNA-αPhlp5-scFv/IgEC_H2-4
pcDNA-αPhlp5-scFv/IgA2C_H2-3	α2C_H2-3	IgA2 hinge sgs for IgA His Xba back	oligo-dT-spezifsch-umgeschr.cDNA	pcDNA-αPhlp5-scFv/IgEC_H2-4
pBud-αBetv1-IgE	V_H	V_H SmiEVQLVES for V_H B1-2-xho-back	pHen-αBetv1-scFv	pBud-IgE
	V_L	V_L sbf QSVLT for V_L v375 Asis back	pHen-αBetv1-scFv	pBud-αBetv1V_H-IgE
pBud-αBetv1-IgE-λC_L	λC_L	C_L lambda AsiSI for C_L Xba lambda back	oligo-dT-spezifsch-umgeschr.cDNA	pBud-αBetv1-IgE
pBud-αBetv1-IgA1	α1C_H1-3	IgA xho for IgA Sfi His back	Hybridisierungs-PCR der C_H1 und C_H2-3 cDNA	pBud-αBetv1-IgE
pBud-αBetv1-IgA2	α2C_H1-3	IgA xho for IgA Sfi His back	Hybridisierungs-PCR der C_H1 und C_H2-3 cDNA	pBud-αBetv1-IgE
pBud-αBetv1-IgG1	γ1C_H1-3	IgG xho for IgG1Sfi His back	pBud-IgG1	pBud-αBetv1-IgE
pBud-αBetv1-IgG4	γ4C_H1-3	IgG xho for IgG4 Sfi His back	pBud-IgG4	pBud-αBetv1-IgE
pBud-αPhlp5-IgE	V_H	V_H SmiEVQLVES for V_H Valenta xho back	pcDNA-αBetv1-scFv/IgEC_H2-4	pBud-IgE
	V_L	V_L val-sda-for V_L AsiSI back	pcDNA-αBetv1-scFv/IgEC_H2-4	pBud-αPhlp5V_H-IgE
pBud-αPhlp5-IgE-λC_L	λC_L	C_L lambda AsiSI for C_L Xba lambda back	oligo-dT-spezifsch-umgeschr.cDNA	pBud-αPhlp5-IgE
pBud-αPhlp5-IgA1	α1C_H1-3	IgA xho for IgA Sfi His back	Hybridisierungs-PCR der C_H1 und C_H2-3 cDNA	pBud-αPhlp5-IgE-λC_L
pBud-αPhlp5-IgA2	α2C_H1-3	IgA xho for IgA Sfi His back	Hybridisierungs-PCR der C_H1 und C_H2-3 cDNA	pBud-αPhlp5-IgE-λC_L
pBud-αPhlp5-IgG1	γ1C_H1-3	IgG xho for IgG1Sfi His back	pBud-IgG1	pBud-αPhlp5-IgE-λC_L
pBud-αPhlp5-IgG4	γ4C_H1-3	IgG xho for IgG4 sfi His back	pBud-IgG4	pBud-αPhlp5-IgE-λC_L

3.1.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). In neueren modifizierten Ansätzen wird jede DNA-Probe jedoch nur einer einzigen Sequenzierungsreaktion unterworfen, in welcher alle vier dNTP unmarkiert vorhanden sind. Durch den Einbau eines der vier ddNTP, die unterschiedlich markiert sind, z.B. durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, erfolgt der Abbruch der enzymatischen Synthese und in einem Sequenziergel können alle so entstandenen

Oligonukleotide anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz identifiziert und die DNA-Sequenz direkt abgelesen werden.

Sequenzierreaktionen wurden mithilfe zweier unterschiedlicher Systeme durchgeführt. Zum Einen wurden *Big-Dye*-Terminatoren verwendet. Hierfür wurden in einer Sequenzierreaktion 500 ng gereinigte Plasmid-DNA mit 2 µl *Big-Dye*-Puffer (2,5x) und 2 µl *Big-dye*-PCR-Reaktionsmix, in dem Puffer, Polymerase, dNTP und ddNTP enthalten sind, sowie 10 pmol des entsprechenden Oligonukleotides in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH_2O auf 10 µl aufgefüllt und gut vermischt. Für die Amplifikation wurde ein Programm gewählt, das 25 Zyklen mit einer Denaturierung von 10 s bei 96 °C, einem *annealing* von 5 s bei der dem Oligonukleotid entsprechenden Temperatur und einer Elongation von 4 min bei 60 °C umfasst. Nach der PCR wurde der Ansatz einer Alkoholpräzipitation unterzogen und das Sediment an der Luft getrocknet. Das Aufnehmen des DNA-Sedimentes in eine geeignete Menge Puffer sowie die Prozessierung der Daten wurden im Arbeitskreis Richter am Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE, Hamburg) unter Verwendung des ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer und der ABI PRISMTM3.3-Software durchgeführt. Ein Teil der Sequenzierungen wurde auch durch die Firma Eurofins durchgeführt. Hier wurde lediglich 1 µl des zu sequenzierenden Plasmids mit 15 pmol des Oligonukleotids versehen, der Ansatz auf 15µl aufgefüllt und das Reaktionsgefäß mit einem Aufkleber versehen, der eine laufende Nummer für die Zuordnung besaß. Das Gefäß wurde dann verschickt ohne den Reaktionsansatz zu kühlen und das Ergebnis der Sequenzierung konnte in Form einer Textdatei digital erhalten werden.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivieren und Passagieren von HEK293-, U937- und RBL 2H3-Zellen

Bei HEK-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen. Bei der hiervon abgeleiteten Zelllinie HEK293 wurde eine Transformaton mit dem humanen Adenovirus Serotyp 5E1A durchgeführt wodurch eine Immortalisierung der Zellen induziert werden konnte. Die Zellen wachsen adhärent.

HEK293-Zellen wurden in einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in, mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, supplimentiertem DMEM-Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml (75 cm²) Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter. Für eine expandierte Kultivierung wurden die Zellen aus fünf Gewebekulturflaschen (etwa $1x10^7$ Zellen) abgelöst, in einer 1 L-Rollerflasche 500 ml des supplimentiertem DMEM-Mediums vorgelegt und die Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für 3-4 Wochen mit einer Rollvorrichtung in einem CO_2-Inkubator unter 5% CO2-Begasung bei der langsamsten Geschwindigkeit rollen gelassen, dabei wurde der Deckel der Flasche nicht ganz fest angezogen, sodass eine Luftversorgung der Zellen gewährleistet war. Das Passagieren der Zellen erfolgte mit einer Lösung aus Trypsin/EDTA, von der 1/5 Volumenanteil des ursprünglichen Kulturmediums nach dessen Entfernung auf die adhärenten Zellen gegeben wurde, durch zehnminütige Inkubation bei 37 °C. Das EDTA komplexiert Calcium und Magnesium, so dass die Verbindung zum Gefäßboden geschwächt wird, und das Trypsin spaltet Adhäsionsproteine. Da EDTA in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt, und Trypsin die Zellmembranen auflösen kann, wird die Zellsuspension sofort nach dem Ablösen mit FKS-haltigem Medium versetzt, dass Calcium- und Magnesiumionen, sowie trypsininhibierende Serumproteine enthält. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank durchgeführt.

U937-Zellen wurden aus dem histiozytischen Lymphom eines 37-Jahre alten Patienten isoliert. Sie stellen eine Zelllinie mononukleärer Zellen dar, die bei Zugabe löslicher Stimuli wie z.B. TPA *in vitro* eine Reifung zu Makrophagen mit den morphologischen und charakteristischen Merkmalen durchführen. Es handelt sich hierbei um eine nicht-adhärente Zelllinie.

U937-Zellen wurden in einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplimentiertem RPMI-Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml (75 cm²) Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Austausch zwei Drittel des Zellkulturmediums durch frisches Medium unter einer sterilen Laminarströmungsbank.

RBL-2H3 Zellen finden als Modell für Mastzellen weite Verbreitung. Die adhärente Zelllinie entstand durch Behandlung von basophilen Ratten-Leukämie-Zellen (*rat basophilic leucemia*) mit dem Carcinogen β-Chlorethylamin und der Selektion einer Hista-

min-ausschüttenden Sublinie. Zellen der RBL-2H3-SX38-Sublinie, kurz: RBL-SX38 wurden durch Transfektion mit dem humanen FcεRI humanisiert und, wodurch sie humane IgE-Antikörper auf ihrer Oberfläche binden. Bei einer Quervernetzung der Rezeptoren erfolgt eine Signalkaskade in das Zellinnere was eine Degranulation und die Ausschüttung charakteristischer Mediatoren, wie Histamin, Leukotrienen und der Hydrolase Hexosaminidase zur Folge hat.

RBL-SX38Zellen wurden in MEM-Medium, welches mit 15 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyrvat supplimentiertem MEM-Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml (75 cm²) Polystyrol-Kulturflaschen in einem einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Passagieren der Zellen erfolgte in Analogie zu den HEK293-Zellen wobei jedoch vor der Zugabe von Trypsin-EDTA zwei Waschschritte mit je 5 ml PBS erfolgten.

3.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Trypsinierte Zellen wurden für eine Bestimmung der Zellzahl in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und anschließend für 5 min bei 200 xg pelettiert. Das Sediment wurde in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und 10 µl mit einer äquivalenten Menge Trypanblau durch Auf- und Abpipettieren vermengt. Dieser Farbstoff ist nicht in der Lage intakte Cytoplasmamembranen zu passieren und dient somit dem Ausschluss der toten und geschädigten Zellen, die blau angefärbt werden. Zur Auszählung der vitalen, hellen, Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension/Trypanblau-Mischung in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die nicht gefärbten Zellen in 16 Kleinquadraten unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich aus der gezählten Zellzahl durch Multiplikation mit dem Faktor $2x10^4$. Anschließend konnten die Zellen auf die gewünschte Zellzahl pro Milliliter verdünnt werden.

3.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Nach Trypsinierung der Zellen und Aufnahme in 10 ml Kulturmedium wurden sie für 5 min bei 200 xg sedimentiert und in der gewünschten Menge Einfriermedium (FKS mit 10 % DMSO) resuspendiert. Da DMSO toxisch auf die Zellen wirkt, wurden diese sofort in Kryoröhrchen überführt auf -20° C und nach 2 h auf -80 °C abgekühlt. Längerfristige Lagerungen kryokonservierter Zellen erfolgten dann in flüssigem Stickstoff.

Zum Revitalisieren der Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und so schnell wie möglich in 10 ml Kulturmedium überführt, um eine Verdünnung des DMSO zu erreichen. Die Zellen wurden für 5 min bei 200 xg pelletiert und dann in frischem Kulturmedium mit den ensprechenden Supplementen resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

3.2.2 Expression in pro- und eukaryotischen Systemen

3.2.2.1 Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E. coli*

Der Vektor pMAL-c2X erlaubt die Klonierung eines gewünschten DNA-Fragmentes hinter das *malE*-Gen aus *E. coli*, was in der Expression eines Fusionsproteins aus dem *maltose-binding protein* (MBP) und dem gewünschten Protein resultiert. Der starke tac-Promotor und das *malE*-Translations-Initiationssignal regulieren die Expression, die Fusion mit dem löslichen MBP führt ebenfalls oft zu einer verbesserten Löslichkeit des Proteins, sodass gute Ausbeuten des Proteins gewährleistet sind. Die hohe Affinität des MBP für Maltose kann genutzt werden, um die exprimierten Proteine in einer Ein-Schritt-Reinigung mittels einer Amylose-Affinitätschromatographie zu isolieren. Zwar verfügt der Vektor pMAL-c2X über eine Signalsequenz, die den Export der rekombinanten Proteine in das Periplasma gewährleisten soll, es hat sich allerdings gezeigt, dass die Ausbeuten bei der Isolierung des Proteins aus dem Gesamtzellextrakt deutlich größer waren als nach Reinigung aus dem Periplasma. Zwischen dem MBP und dem fusioniertem Peptid befindet sich eine Faktor Xa-Schnittstelle, die eine Abspaltung des Fusionspartners nach der Reinigung ermöglicht.

Für die Expression der Fusionsproteine wurden *E.coli*-XL1-Blue-Zellen verwendet. Ein gewünschtes Expressionvolumen, meist 200 ml, 2YT-Medium mit einer Ampicillin-Konzentration von 100µg/ml und 0,2 % Glucose wurde mit einer Vorkultur des zu exprimierenden Klones mit einer OD_{600} von 0,1 inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG in einer finalen Konzentration von 0,3 mM die Proteinexpression induziert und die Kultur für 2 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Der Expressionsansatz wurde für 30 min bei 3300 xg zentrifugiert und der Zellüberstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen auf Eis in einem Zwanzigstel des Expressionsvolumens Säulenpuffer resuspendiert. Für Immunblot-Analysen wurden die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt bevor sie für die SDS-PAGE-Analy-

sen vorbereitet wurde. Für eine Reinigung des Proteins wurde die Zellsuspension zum Erhalt des löslichen Zellextraktes für 10 min auf Eis und bei einer Stärke von 3-4 und einem Puls von 40% sonifiziert. Der Zellextrakt wurde für 20 min bei 20000 xg zentrifugiert, abgenommen und stand anschließend für eine Reinigung mittels einer Amylose-Matrix zur Verfügung.

3.2.2.2 Expression von CBD-Fusionskonstrukten in *E. coli*

Der Vektor pTXB1, Bestandteil des IMPACT™-Systems (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)* erlaubt die Klonierung des gewünschten Proteins vor das fusioniertes Gen eines Inteins mit einer Chitin-bindenden Domäne (CBD). Das Gen *Mxe GyrA Intein* des, aus dem Mycobacterium xenopi stammenden, Inteins wurde dahingehend modifiziert, dass es eine Thiol-induzierte reduktive Abspaltung eines N-terminalen Cysteins durchführt. Somit können exprimierte Fusionproteine zunächst durch die Affinität der Chitin-bindenden-Domäne gereinigt werden, und durch Zugabe eines reduzierenden Reagenzes kann anschließend die Abspaltung des gewünschten Proteins von den fusionierten Domänen erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch lediglich die fusionierte Expression der Konstrukte durchgeführt und induzierte Zellen für Immunblot-Analysen verwendet. Die Proteinexpression in *E. coli*-Zellen mithilfe des pTXB1-Vektors unterliegt der stringenten Kontrolle des T7-Promotors. Daher müssen *E. coli*-DE3-Stämme verwendet werden, die eine T7-RNA-Polymerase unter Steuerung durch ein lac-Operon exprimieren, woraufhin dann die Expression des gewünschten Zielproteins erfolgen kann.

Zunächst erfolgte eine Transformation generierter und durch Sequenzierung verifizierter pTXB1-Expressionvektoren in *E.coli*-BL21(DE3). Einzelne Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze in 4 ml 2YT mit 100µg/ml Ampicillin überführt und die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37 °C und 220rpm wachsen gelassen. Mit 50 µl dieser Kultur wurden weitere 4 ml 2YT mit 100 µg/ml 2YT inokuliert, die ÜN bei 37 °C und 220 rpm inkubiert wurden, um sie am nächsten Tag durch die Zugabe von Glycerol auf eine Endkonzentration von 15 % und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff auf die Lagerung bei -80 °C vorzubereiten. In den restlichen Zellen wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer finalen Endkonzentration von 0,4 mM induziert und die Zellen für weitere 3h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 3300 xg zentrifugiert und das Sediment in einem Zehntel des Expres-

sionsvolumens PBS resuspendiert. Die Suspension konnte dann für Immunblot-Analysen verwendet werden.

3.2.2.3 Expression von Antikörperkonstrukten in HEK293-Zellen

Für die Expression der Antikörperkonstrukte in Säugerzellen wurden eine stabile Expression in HEK293-Zellen angestrebt. Säugerzellen sind für die homologe Expression rekombinanter Proteine der geeignetste Ansatz, da Probleme mit der posttranslationalen Modifikation und Prozessierung nahezu ausgeschlossen sind. Die Konversion von Antikörper-Fragmenten in vollständige Immunglobuline unterschiedlichen Isotyps und deren Expression in Säugerzellen konnte unter Erhalt der Bindungseigenschaften mehrfach demonstriert werden (Boel *et al.* 2000).

Das lineare Polyethlenimin (PEI) ist ein stark basisches, verzweigtes synthetisches Polymer, dessen Aminogruppen bei Zugabe von Wasser protoniert werden. Diese stark positive Ladung führt zur Komplexbildung mit negativ-geladenen DNA-Molekülen. Durch Endozytose erfolgt eine Aufnahme dieser Komplexe durch die HEK293-Zellen wodurch eine Transfektion der Zellen mit rekombinanten Plasmiden möglich wird.

Einen Tag vor der Transfektion wurden frisch passagierte HEK293-Zellen mit 2 ml Kulturmedium in sterilen 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Transfektion sollte die Konfluenz der Zellen 80-90 % betragen. Die Transfektionen erfolgten unter der Zuhilfenahme des jetPEI™-Transfektions-Reagenzes. Hierbei wurden für die Transfektion 2 µg DNA mit 100 µl steriler NaCl-Lösung (150 mM) gemischt, ebenso wurden 4 µl der jetPEI-Lösung (7,5 mM) mit 100 µl NaCl-Lösung gemischt. Beide Ansätze wurden vereinigt und für 10 s gevortext, um eine Komplex-Ausbildung zu begünstigen. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei RT wurde der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert. Die transiente Expression wurde nach 48 h mithilfe einer ELISA-Analyse nachgewiesen. Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen nach 48 h aus den 6-Well-Platten mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit dem zur Selektion verwendeten Antibiotikum in Kulturflaschen überführt, um eine stabil exprimierende Zelllinie zu generieren.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

Proteinbiochemischen Standardtechniken wurden nach den etablierten Verfahren durchgeführt (Ausubel 1994).

3.3.1 Affinitätschromatographische Verfahren

3.3.1.1 Affininitätschromatographie mittels Protein L

Der Antikörper-haltige HEK293-Zellkulturüberstand wurde für 30 min bei 3300 xg zentrifugiert um zelluläre Bestandteile zu sedimentieren. Anschließend wurde der Überstand mithilfe einer Vakuumpumpe und einem Filter mit einer Porengröße von 0,8 µm filtriert. Das Filtrat wurde durch eine Aufkonzentriereinheit auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Volumens konzentriert. Das Konzentrat wurde durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,2 µm an der Flamme sterilfiltriert und in einem sterilen Gefäß aufgefangen, um sowohl alle Schwebstoffe zu entfernen, als auch eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten. Anschließend wurde 1 ml einer Protein L-Agarose-Matrix in eine Durchflusssäule mit ca 0,5 cm Durchmesser pipettiert und sedimentieren gelassen. Die Matrix wurde mit 10 ml PBS äquilibriert und anschließend das Konzentrat des Kulturüberstandes über die Säule gegeben. Dabei wurde eine Fließgeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/ min eingestellt. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 15 Volumenanteilen PBS entfernt und die Antikörper durch Erniedrigung des pH-Wertes mithilfe eines Citratpuffers (100 mM, pH 3) in 1 ml-Schritten eluiert. Zur Neutralisation wurde in die Elutionsgefäße ein Trispuffer (1 M, pH 7,4) vorgelegt. Zur Regeneration der Protein L-Matrix wurden 20 Volumenanteile des Citratpuffers und 5 ml PBS über die Matrix gegeben. Anschließend wurden 5 ml PBS, mit 0,02 % Natriumazid, über die Säule gegeben und die Matrix in diesem Puffer bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2 Affinitätschromatographie mittels Antigen-Matrix

Die hochspezifische Antigen-Antikörper-Bindung wurde für die Herstellung einer Affinitätsmatrix verwendet. Hierfür wurde eine Expression des Fragments Phl p 5a-Fragment 1 in Form eines Intein-CBD-Fusionskonstruktes mit einem Kulturvolumen von 100 ml wie Kapitel 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden für 30 min bei 3300 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment ÜN bei -20 °C

eingefroren und am nächsten Tag auf Eis aufgetaut und in 5 ml Chitin-Säulenpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Herstellung des Zellextraktes für 10 min bei einer Stärke von 4 und einer Impulslänge von 40 % auf Eis sonifiziert. Anschließend wurde die Zelldebris für 30 min bei 10000 xg abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mithilfe eines Spritzenfilters der Porengröße 0,45 µm filtriert. Eine Durchflusssäule wurde mit 1 ml einer Matrix bestehend aus Chitin *Beads* befüllt und mit 10 Volumenanteilen Chitin-Säulenpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Zellextrakt 2 x über die Säule gegeben und ungebundene Proteine durch Waschen mit 20 Volumenanteilen Chitin-Säulenpuffer entfernt. Zur Überprüfung wurden von der so hergestellten Matrix ca. 40 µl Partikel entnommen und für die SDS-PAGE-Analyse vorbereitet.

Antikörper-enthaltender HEK293-Zellkulturüberstand wurde wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben behandelt und dann über die Antigen-Chitin-Matrix gegeben. Unspezifische Proteine wurden durch Waschen mit 50 ml Chitin-Säulenpuffer entfernt und erneut 40 µl der Matrix für eine Analyse mittels SDS-PAGE und nachfolgenden Färbungen entnommen. Die Elution der Antikörper vom Antigen erfolgte mittels pH-shift. Da der pH-Wert, bei dem eine Elution erfolgt, nicht bekannt war, wurde eine schrittweise Erniedrigung beginnend bei pH 5 durchgeführt, indem jeweils 1 ml Citratpuffer (100 mM) des entsprechenden pH-Wertes auf das Säulenbett pipettiert und gesondert aufgefangen wurden. Um eine schnelle Neutralisation der Lösung zu gewährleisten wurde in die Reaktionsgefäße eine ausreichende Menge eines Trispuffers (1 M, pH 7,4) vorgelegt. Diese musste zuvor für jeden pH-Wert titriert werden. Die Fraktionen wurden in einer analytischen SDS-PAGE mit anschließenden Färbungen durch Coomassie-Brilliantblau und einem Immunblot auf Proteingehalt und Reinheitsgrad hin untersucht. So wurde der pH-Bereich, bei dem eine Elution erfolgt ermittelt. Die Antigen-Chitin-Partikel wurden durch Waschen mit 10 ml Citratpuffer (pH 2) regeneriert und für eine Überprüfung erneut Partikel aus dem Säulenbett abgenommen. Die Säule wurde mit Chitin-Säulenpuffer äquilibiriert und in Chitin-Säulenpuffer mit 0,02 % Natriumazid bei 4 °C gelagert. In Abbildung 3.1 ist das Prinzip dieser Reinigungsmethode vereinfacht dargestellt.

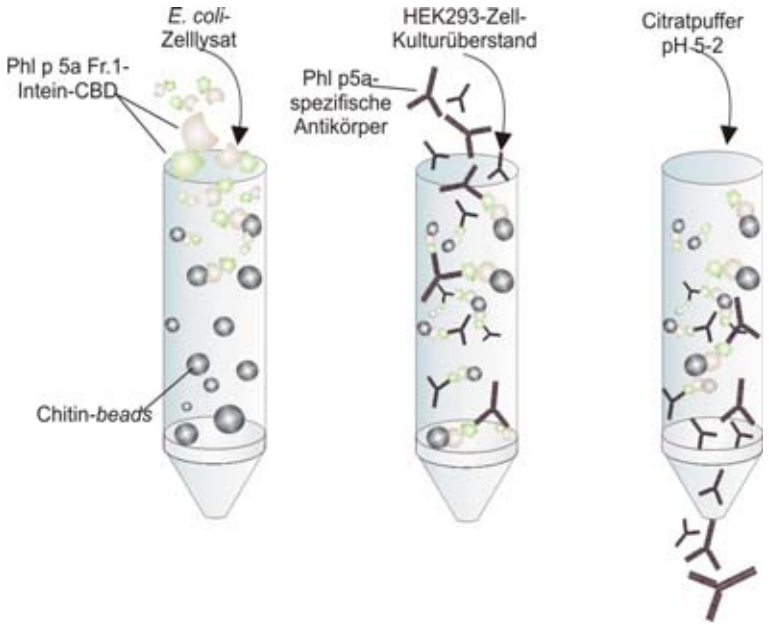


Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer Antigen-Affinitätsmatrix.
Das Antigen, in diesem Falle das N-terminale Fragment des Allergens Phl p 5a wurde als Intein-CBD-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Die Proteine binden an Chitin-Partikel und bilden so eine feste Phase mit der sich nun die Antikörper aus dem Zellkulturüberstand reinigen lassen. Die Elution erfolgt durch Erniedrigung des pH-Wertes, wodurch die Antigen-Antikörper-spezifischen Wechselwirkungen sich nicht mehr ausbilden können.

3.3.1.3 IMAC

Expressionsüberstände der HEK293-Zellen wurden wie beschrieben konzentriert. Anschließend wurde unter Rühren ein Zehntel des Volumens eines 10 x Ni-NTA-Säulenpuffers zugegeben, der pH-Wert überprüft und wenn nötig auf pH 7,8 eingestellt. Durch Zugabe des Puffers war in dem Kulturüberstand eine finale Konzentration von 10mM Imidazol vorhanden. Der Kulturüberstand wurde mithilfe eines Spritzenfilters der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. In eine Durchflusssäule mit etwa 0,5 cm Durchmesser wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und sedimentieren gelassen. Die Ni-NTA-Agarose wurde mit 10 Volumenanteilen 1 x Ni-NTA-Säulenpuffer äqulibriert und anschließend der vorbereitete Kulturüberstand darüber gegeben. Ungebundene Proteine wurden zunächst mit 50 Volumenanteilen 1x Ni-NTA-Säulenpuffer entfernt. Um die Stringenz des Waschvorgangs zu erhöhen wurden 3 Schritte mit steigenden Imidazolkonzentrationen von 15 mM, 20 mM und 25 mM Imidazol, welches in 1x Ni-NTA-Säulenpuffer angesetzt wurde, mit je 1 ml durchgeführt und gesondert in Reatkionsgefäßen aufgefangen. Die eigentliche Elution wurde dann mit Elutionspuffer, bestehend aus dem 1x Ni-NTA-Säulenpuffer mit einer finalen Imidazolkonzentration von 250 mM Imi-

dazol durchgeführt. Die Fraktionen der Reinigung wurden mithilfe einer analytischen SDS-PAGE mit anschließenden Färbungen durch Coomassie-Brilliantblau oder einem Immunblot unterzogen. Anhand dieser konnten sie auf Proteingehalt und Reinheitsgrad hin analysiert werden.

Die Ni-NTA-Agarose-Matrix wurde regeneriert indem 2 Volumenanteile Natronlauge (0,5 M) darüber laufen gelassen und diese für 30 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurden 5 Volumenanteile ddH_2O sowie 2 Volumenanteile Nickelsulfat (100 mM) über das Säulenbett gegeben. Die Matrix wurde verschlossen und 30 min mit dem Nickelsulfat inkubiert. Anschließend wurde mit 5 Säulenvolumen ddH_2O gewaschen und die Ni-NTA-Matrix bei 4 °C in 20 % Ethanol gelagert.

3.3.1.4 Affinitätschromatographie mittels Amylose-Matrix

Die für die Expression verwendeten *E.coli*-Zellen wurden wie beschrieben aufgearbeitet um den Zellextrakt zu erhalten. Für die Resuspension der Zellen wurde hierbei anstelle des Chitin-Säulenpuffers Amylose-Säulenpuffer verwendet. In eine Durchflusssäule von ca. 1 cm Durchmesser wurden 2 ml Amylose-Matrix pipettiert und mit 10 Volumenanteilen Amylose-Säulenpuffer äquilibriert. Der filtrierte Zellextrakt wurde langsam über die Säule gegeben und ungebundene Proteine mit 25 Volumenanteilen Amylose-Säulenpuffer entfernt. Die Elution der MBP-Fusionsproteine erfolgte sukzessiv mit Elutionspuffer, der aus Amylose-Säulenpuffer mit 10 mM Maltose bestand, in Fraktionen von 1 ml. Diese wurden anschließend einer SDS-PAGE-Analyse und nachfolgenden Färbungen unterzogen.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Biosensormessungen

Die Oberflächenplasmonenresonanz- oder SPR-Spektroskopie (s*urface plasmon resonance*) ist eine Biosensortechnik bei der Biomoleküle wie z.B. Proteine auf der Goldoberfläche einer Miniaturflusszelle eines Sensorchips immobilisiert werden. Dies erfolgt meist durch eine Schicht von Carboxymethlydextrangruppen, deren Carboxylgruppen durch EDC/NHS (N-Ethyl-N`-(Dimethylaminopropyl)-Carboimid/N-Hydroxysuccinimid) aktviert werden können und dann mit den freien Aminogruppen der Lysinreste eines Proteins durch eine stabile Amidbindung kovalent verknüpft werden. Immobilisierte Mo-

leküle werden hierbei als Liganden bezeichnet. In einem evanszentem Feld erfolgt die sogenannte Oberflächenplasmonenresonanz, bei der die freien Gold-Elektronen oszillieren und einfallendes Licht vollständig adsorbieren. Das Licht muss hierfür in einem bestimmten Winkel, dem SPR-Winkel einfallen. Anhand der Menge reflektierten Lichts wird detektiert, ob eine Oberflächenplasmonenresonanz stattfindet. Bei Bindung von Biomolekülen an die Goldoberfläche ändert sich der Brechungsindex der Oberfläche und somit auch der SPR-Winkel linear zur gebundenen Masse. Bei Bindung eines Nanogramms Protein auf einer Fläche von einem Quadratmillimeter ändert sich der SPR-Winkel um etwa 100 m°, was als 1000 RU (*Response Units)* detektiert wird. Interaktionspartner für das Molekül werden als mobile Phase, auch Analyt, über den Chip geleitet. Durch eine zeitabhängige Registrierung der Änderung des SPR-Winkels kann das Bindungsverhalten des Analyten zum Liganden in Echtzeit beobachtet und somit kinetische Parameter der Bindung ermittelt werden. Bei dieser Methode zur Bindungsanalyse ist eine Markierung der Interaktionspartner nicht nötig.

3.4.2 Auswahl eines geeigneten Bindungsmodells

Die Bindung eines Analyten an einen immobilisierten Liganden lässt sich darstellen durch:

Abb. 3.2 Reaktion eines in Lösung befindlichen Analyten mit einem auf der Chipoberfläche immobilisierten Liganden.

A bezeichnet den Analyten und L den Liganden. Die Bindung ergibt den Komplex AL. Der Asterisk (*) kennzeichnet immobilisierte Verbindungen.

Wenn sich die Konzentration des Analyten [A] erhöht, nimmt auch die Menge an Komplex [AL] zu. Bei genügend hohen Konzentrationen von [A] erfährt die gemessene Veränderung jedoch keine weitere Steigerung mehr, weil L* dann fast vollständig zu AL* umgesetzt ist bzw. die Bindung gesättigt ist. Dieses Erreichen eines dynamischen Gleichgewichts, bei der die Anzahl assoziierender und dissoziierender Analyten gleich ist, ist im Sensorgramm gekennzeichnet durch das Erreichen eines Plateaus aller Kurven. Im diesem Fall ergibt sich zwischen der Konzentration des Komplexes [AL] und der Konzentration an freiem Analyten [A] die Beziehung einer Langmuirschen Adsorptionsisotherme. Für die Bindungskurve der RU-Werte zu diesem Zeitpunkt

gegen [A] aufgetragen kann eine Kurvenanpassung nach: $RU_{eq}= RU_{max}$ [A]/ (K_D [A]) erfolgen und die Gleichgewichtsdissoziations- oder auch Bindungskonstante K_D (M) der Bindung ermittelt werden. Diese so genannte *steady state*-Berechnung des K_D-Wertes erfordert jedoch das Erreichen des Gleichgewichtszustandes und erfolgt ohne Einbeziehung kinetischer, also zeitabhängiger Parameter.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Affinität kann durch eine Verfolgung der Bindungskinetik und der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation erfolgen (k_a und k_d oder k_{on} und k_{off}). Deren Quotient k_d/k_a liefert ebenfalls die Bindungskonstante K_D. In den Sensorgrammen der Echtzeitmessungen sind die zeitlichen Parameter von Assoziation und Dissoziation enthalten. Für eine kinetische Analyse werden Messungen unterschiedlicher Konzentrationen des Analyten durchgeführt. Anhand von Kurvenanpassungen an die Langmuirsche Adsorptionsisotherme können dann k_a und k_d und somit K_D erhalten werden. Hier ist außerdem eine Charakterisierung des Assoziations- und Dissoziationsverhaltens möglich.

Beide beschriebenen Berechnungen der Affinität, sowohl unter Annahme eines Gleichgewichtzustandes als auch anhand kinetischer Messungen erfolgen unter der Annahme einer monovalenten 1:1 Bindung zwischen immobilisiertem Liganden und frei beweglichem Analyten. Besitzt der, sich in Lösung befindende, Analyt jedoch mehr als eine Bindungsstelle für den Liganden, wie im Falle eines bivalenten Antikörpers, unterliegt dem Sensorgramm eine weitaus komplexere Kinetik und eine Kurvenanpassung nach einem 1:1-Bindungsmodell ist nicht mehr möglich (Dmitriev *et al.* 2002). Formal kann eine bivalente Bindung in zwei monovalente Bindungen zerlegt werden, deren Bindungsstärke jeweils der eines monovalenten Analyten entspricht. Jedoch kann daraus nicht ohne weiteres die Bindungsstärke der bivalenten Bindung abgeleitet werden.

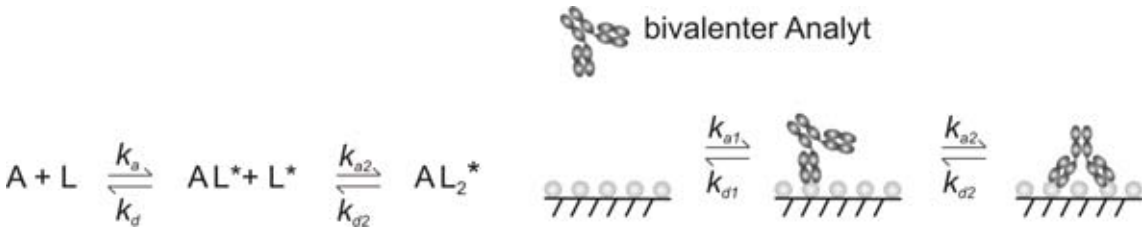


Abb. 3.3 Reaktion eines in Lösung befindlichen bivalenten Analyten mit einem auf der Chipoberfläche immobilisierten Liganden.

A bezeichnet den Analyten und L den Liganden. Die Bindung der ersten Bindungsstelle des Analyten ergibt den Komplex AL. Die Bindung eines zweiten immobilisierten Liganden mit der zweiten Bindungsstelle ist von der Dichte immobilisierter Liganden sowie der sterischen Ausrichtung und Flexibilität der beiden Bindungsstellen des Analyten abhängig. Der Asterisk (*) kennzeichnet immobilisierte Verbindungen.

Eher gleicht die Wechselwirkung zwei aufeinanderfolgenden Bindungen, wobei zunächst die monovalente Knüpfung erfolgt (s. Abb. 3.3).

Die darauffolgende Bindung der zweiten Bindungsstelle an einen weiteren Liganden ist nun abhängig von vielen Faktoren. So ist der Entropieverlust der zweiten Bindung geringer, da die zweite Bindungsstelle durch die erste Bindung bereits in räumlicher Nähe zum Liganden arrangiert ist und somit mit einer höheren Wahrscheinlichkeit stattfindet. Andererseits muss berücksichtigt werden, ob und wie viele Bindungsstellen für den einfach gebundenen Analyten überhaupt erreichbar sind. Kriterien hierfür sind sowohl die Flexibilität des Analyten als auch die sterische Ausrichtung seiner Bindungsstellen sowie die Anordnung und der Abstand von Ligandenmolekülen auf der Chipoberfläche (Crothers und Metzger 1972; Plückthun und Pack 1997). Da durch die Echtzeitmessungen mithilfe eines SPR-Biosensors auch die zeitlichen Parameter von Assoziation und Dissoziation ermittelt werden können, ist es durch Kurvenanpassung an ein bivalentes Bindungsmodell möglich die Geschwindigkeitskonstanten beider aufeinanderfolgenden Bindungen zu erhalten. Die Dissoziationskonstante der ersten, also der monovalenten Bindung, entspricht K_D1. Die Bindungskonstante für die nachfolgende Knüpfung zur bivalenten Bindung entspricht K_D2, wobei diese wie beschrieben von vielen Faktoren abhängig ist und die Einheit mol/m^2 besitzt. Eine funktionelle Dissoziationskonstante K_Dbi beider Bindungen lässt sich berechnen, indem die Dichte des immobilisierten Liganden einbezogen wird (Yang *et al.* 2003):

$$K_Dbi = K_D1 \times K_D2 / (K_D2 + 2\,[L^*])$$

Wobei [L*] in diesem Fall die Einheit mol/m^2 besitzt. Bei SPR-spektroskopischen Messungen kann anhand des direkt proportionalen Verhältnisses von RU zu immobilisierter Masse von einer Ligandendichte von etwa 1 pg/mm² pro RU immobilisiertem Liganden ausgegangen werden (Schuck 1997). Die Berechnung der K_Dbi, der funktionellen Affinität des Antikörpers, wird für den Fall, dass $2\,[L]^* << K_D2$ ähnlich der K_D1. Der Quotient K_Dbi/K_D1 wird auch als Steigerungsfaktor bezeichnet, da er angibt um welchen Faktor sich die Affinität der monovalenten Bindung im Falle eines bivalenten Moleküls steigert. Dieser Faktor kann jedoch je nach Experiment durch die starke Abhängigkeit der K_D2 von zusätzlichen Faktoren abweichen (Plückthun und Pack, 1997). Bei der Auswertung aller durchgeführten SPR-spektroskopischen Messungen wurde eine bivalente Kurvenanpassung durchgeführt und die beschriebenen Bindungskonstanten berechnet.

3.4.2.1 Immobilisierung der Liganden

Für die Bindungsanalysen wurde auf einer Messflusszelle das, an MBP-fusionierte Allergen immobilsiert während zur Detektion der unspezifischen Bindung auf einer Referenzflusszelle MBP gekoppelt wurde. Die Aktivierung beider Flusszellen erfolgte gleichzeitig, die Kopplung der Allergene nacheinander.

Für Messungen mit einem *Biacore-T100*-Biosensor wurde eine Fließgeschwindigkeit von 10 µl/s eingestellt. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet, dieser und alle weiteren Flüssigkeiten wurden mit einem Filter der Porengröße 0,2 µm durch Benuntzung eines Filteraufsatzes und einer Vakuumpumpe filtriert. Die Carboxylgruppen der Oberfläche eines CM5-Chips wurden durch Injektion von EDC/NHS während 480 s aktiviert. Eingefrorene Aliquots EDC (0,4 M) und NHS (0,1 M) wurden dafür bei RT aufgetaut und erst kurz vor der Injektion vermischt. Anschließend wurde das zu immobilisierende Protein in Natriumacetatpuffer (10mM), dessen pH-Wert etwa 0,5 unter dem PI des Proteins liegen sollte auf eine finale Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Bet v 1a-MBP und Phl p 5a-MBP besitzen beide einen PI von 5,4, der des exprimierten MBP liegt dagegen bei 5,1. Die Proteine wurden in diesem Fall mit Natriumacetatpuffer pH 4,5 verdünnt. Die Lösung wurde für 120 s über den Chip geleitet. Um die Menge an immobilisiertem Protein zu erhöhen, wurde die Injektion bis zu 3 mal wiederholt, insofern das RU-Signal den Wert 1000 nicht überstiegen hatte. Anschließend wurde ein *Cappen* durchgeführt, indem Ethanolamin für 600 s injiziert wurde wodurch die restlichen aktivierten Carboxylgruppen mit den Aminogruppen reagieren.

Für Bindungsanalysen mit einem S*ierrasensors* SPR-Biosensor wurden verwendete Flüssigkeiten ebenfalls mit einem Filter der Porengröße 0,2 µm, durch Benuntzung eines Filteraufsatzes und einer Vakuumpumpe filtriert. Hier wurde als Laufpuffer PBS mit 0.01 % Tween verwendet, der zuvor für 10 Min in einem Ultraschallbad entgast wurde. Die Fließgeschwindigkeit betrug hier 25 µl/min. Die Carboxylgruppen der Oberfläche eines *Amine*-Chips wurden durch Injektion von 200 µl EDC/NHS während 480 s aktiviert. Die Proteine Bet v 1-MBP und MBP wurden in Natriumacetatpuffer (10 mM) mit einem pH-Wert von 4,7 auf 100 µg/ml verdünnt und 150 µl für 360 s nacheinander über die jeweilige Flusszelle geleitet und die Injektionen bis zu drei mal wiederholt, insofern das RU-Signal den Wert 1000 nicht überstiegen hatte. 200 µl Ethanolamin wurden für 480 s über beide Flusszellen geleitet.

3.4.2.2 Bindungsanalysen mit Antikörperkonstrukten

Initiale Bindungsanalysen mit den Antikörpern wurden durchgeführt um den Konzentrationsbereich auszutesten. Bei geeigneten Konzentrationen sollte die Bindungskurve 100 RU nicht überschreiten jedoch auch nicht zu flach verlaufen. Die Antikörper wurden im Falle der Messung mit einem *Biacore-T00*-Biosensor in PBS verdünnt und die Lösung für 120 s injiziert, wobei beide Flusszellen angesteuert wurden. Es folgten Untersuchungen für die Auswahl eines geeigneten Regenerationspuffers, der eine sofortige Dissoziation des Antkörpers vom Liganden induzieren sollte. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass eine komplette Dissoziation des Antikörpers erfolgt, jedoch bei erneuter Injektion eine Reproduktion der Bindungskurve gewährleistet wird. Würde diese durch wiederholte Regeneration abflachen, ist mit einer Degradierung der Bindungsstellen des Liganden durch den Regenerationspuffer zu rechnen. Im Falle der Bindungsanalysen mit Bet v 1 und dem Bet v 1-spezifischen Hybridom-Antikörper wurde ein Puffer, der zu zwei Teilen aus dem basischen Puffer B und zu einem Teil aus Wasser bestand verwendet (Andersson *et al.* 1999). Der Puffer wurde für 50-80 s über den Chip geleitet. Für die Dissoziation des hoch-affinen αPhlp5-IgA2-Antikörpers vom Phl p 5a-MBP wurden aufeinanderfolgende Injektionen von Citratpuffer (50 mM) pH 1 und Tris-Base (50 mM) pH 11 benötigt um eine Regeneration des Antigens zu erreichen. Antikörper-Bindungsanlysen mit einem Sierrasensors SPR-2 Biosensor wurden durchgeführt, indem 50 µl oder mehr der Antikörperlösungen über den Chip gegeben wurden.

Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen mithilfe des Computerprogramms *TraceDrawer*. Hierfür mussten Sensorgramme, die durch die *Biacore T100*-Messungen enstanden waren zunächst als Textdateien exportiert werden. Da die Antikörper zwei funktionelle Bindungsstellen für die immobilisierten Allergene besitzten wurden ein bivalentes Bindungsmodell ausgewählt. Für die Kurvenanpassungen wurde eine lokale Berechnung des Ru_{max}-Wertes zugrunde gelegt und Iterationen durchgeführt bis keine Änderung des Chi^2-Wertes mehr erfolgte.

3.4.3 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können so genannte FACS-Analysen (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) durchgeführt werden. Sie erlauben quantitative Bestimmungen

von zellulären Oberflächenproteinen oder daran bindenden Molekülen, indem einzelne Zellen im Flüssigkeitsstrom auf der Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften hin analysiert werden. Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mittels eines FACS Calibur-Gerätes bei einer Anregungswellenlänge des luftgekühlten Argon-Lasers von 488 nm. Das Absorptions- bzw. Emissionsmaximum des FITC (Fluorescein-isothiocyanat) beträgt 495 nm bzw. 517 nm. Das Fluoreszenzmaximum für PE (Phycoerithrin) liegt bei 575 nm. Für jede Messung wurde mithilfe des Auswertprogramms *CellQuest* die Häufigkeit der Ereignisse im Kanal FL-1 bzw. FL-2 in Histogrammen dargestellt.

Sämtliche U937-Zellen einer 250 ml Kulturflasche wurden für 5 min bei 200 xg zentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml kaltem, mit 10% FKS supplementiertem PBS, resuspendiert. Die Zellen wurden gewaschen, indem ein weiteres mal für 2 min bei 4°C und 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml PBS-10%FKS resuspendiert wurde. Die Zellzahl wurde bestimmt und etwa 10^7 Zellen pro Messung in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden ein weiteres mal bei 4 °C und 200 xg für 2 min zentrifugiert, und in 100 µl PBS-10%FKS, in welchem der primäre Antikörper auf die gewünschte Konzentration verdünnt worden war, resuspendiert. Die Zellen wurden für 1 h bei 4 °C im Dunkeln auf einem Rollbrett inkubiert und anschließend für 2 min bei 200 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen 2 x mit 0,2 %TPBS und abschließend 1 x mit 1 ml PBS-10%FKS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl, den sekundären Antikörper in gewünschter Konzentration enthaltendem PBS-10%FKS resuspendiert und für 1 h bei 4 °C im Dunkeln auf einem Rollbrett inkubiert. Die Antikörperlösung wurde nach einem Zentrifugationsschritt von 2 min bei 200 xg und 4 °C entfernt und die Zellen 2 x mit 1 ml 0,2% TPBS und 1 x mit 1 ml PBS-10%FKS gewaschen und für die Messung in 500 µl PBS-10%FKS resuspendiert.

3.5 Chemische Methoden

3.5.1 Biotinylierung von Proteinen mittels TFPA-PEG_3-Biotin

TFPA-PEG_3-Biotin ist ein UV-aktivierbares Biotinylierungsreagenz, bestehend aus einem TFPA-Rest (Tetrafluorophenylazid), welcher über einen flexiblen PEG-Arm (Polyethylenglukol) an Biotin gekoppelt ist. Bei Einwirkung von UV-Licht bildet die TFPA-Ein-

heit eine hochreaktive Nitrengruppe, welche bevorzugt in C-H Bindungen oder ungesättigte Kohlenstoffketten insertiert. Der hydrophile PEG-Arm gewährleistet die Wasserlöslichkeit und verhindert eine Aggregation biotinylierter Proteine. Das Reagenz wurde verwendet, um die Allergene Bet v 1a und Phl p 5a, die in Form von MBP-Fusionskonstrukten vorlagen, zu biotinylieren und für Degranulationsanalysen über Streptavidin zu multimerisieren.

In einem Reaktionsgefäß wurden 300 µl der Allergen-Lösung mit einer Konzentration zwischen 0,5 und 1,5 mg/ml vorgelegt. Es wurde ein hundertfacher molarer Überschuß an TFPA-PEG_3-Biotin, welches als Stocklösung von 25 mg/ml in DMSO bei -20 °C gelagert vorlag hinzugegeben. Mithilfe einer UV-Lampe wurde UV-Licht auf das offene Reaktionsgefäß eingestrahlt. Unter Rühren mit einem kleinen Rührfisch und auf Eis wurde die Biotinylierung dann für 45 min durchgeführt. Anschließend wurde das restliche Biotinylierungsreagenz durch mehrmalige Dialyse gegen PBS entfernt.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 ELISA

Zur Analyse der Expression oder der Funktionalität von Antikörperkonstrukten wurden 20 µl der Antigen-Lösungen, in denen die Allergene in Konzentrationen von 50-200 µg/ml enthalten waren, in Vertiefungen einer ELISA-384-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C an die Plattenoberfläche gebunden. Es wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend die Polystyrol-Oberfläche für 1 h bei RT mit 4 % MPBS oder 10 % FKS/PBS blockiert. Es wurde einmal mit PBS gewaschen und 50 µl Zellüberstand oder entsprechende Verdünnungen der Antikörper-Lösungen in die Vertiefungen gegeben und bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Inkubationszeiten reichten je nach Anforderungen von 1 h bei konzentrierten Proteinlösungen bis hin zu 12 h bei Zellüberständen mit geringen Antikörper-Konzentrationen. Es wurde viermal mit PBS gewaschen, wobei die Ausrichtung der Mikrotiterplatte nach jedem Waschschritt geändert wurde, damit die Waschlösung von einer anderen Seite in die Vertiefung gespült wurde. Die sekundären Antikörper wurden in 2 % MPBS, bzw. 10% FKS/PBS verdünnt und 50 µl in die Vertiefungen gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS, erfolgte die Zugabe von 25 µl der PNPP Detektionslösung und die Absorbtion wurde nach 1-12 h im Photometer bei 405 nm gemessen.

3.6.2 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von Antikörpern

Konzentrationen von Antikörpern und Antikörperkonstrukten in Zellkulturüberständen bzw. Reinigungsfraktionen wurden mit ELISA*QuantitationSets* durchgeführt. Hierbei werden die Antikörper durch Sandwich-ELISA Messungen detektiert. Bei jeder Messung wird eine Standardreihe erstellt. Die Extinktion wird dann gegen die Konzentration aufgetragen und durch Kurvenanpassung eine Standardkurve erhalten, mithilfe derer dann die Konzentrationen der zu messenden Antikörper-Lösungen bestimmt werden können.

Die Fänger-Antikörper wurden in 0,05 M Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6 hundertfach verdünnt und 50 µl in die Vertiefungen einer Polystyrol ELISA-384-Mikrotiterplatte gegeben. Diese wurde für 1 h bei RT und unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und einmal mit Quantifizierungs-Waschlösung gewaschen. Freie Bindungsstellen der Vertiefungen wurden mit 100 ml Quantifizierungs-Blockierungspuffer für 1 h bei RT und unter leichtem Schütteln blockiert. Der Blockierungspuffer wurde entnommen und 7 serielle 1:2 Verdünnungen der Standardreihe sowie 3-4 Verdünnungen der zu quantifizierenden Antikörperlösung mit Quantifizierungs-Verdünnungspuffer hergestellt, von denen jeweils 50 µl in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei RT und leichtem Schütteln inkubiert wurden. Die Antikörper wurden abgesaugt und nach viermaligem Waschen 50 ml des Detektionsantikörpers, der 1:50000 in Quantifizierungs-Verdünnungspuffer verdünnt wurde, zugegeben und abermals 1 h bei RT und unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Detektionsantikörper wurde ebenfalls abgesaugt und erneut viermal gewaschen, sowie 40 µl ABTS/H_2O_2-Detektionlösung zugegeben und nach 20 min die Extinktion bei 405 nm gemessen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen.

Zur Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der beiden Extinktionswerte der Standardreihe gebildet und gegen die Konzentration aufgetragen. Mithilfe des Computerprogramms Origin 75 erfolgte eine Vier-Parameter logistische Kurvenanpassung mit deren Gleichung eine Umrechnung der Extinktionswerte in Konzentrationen möglich war.

3.6.3 Immunblot

Bei einem Immunblot handelt es sich um den Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen. Nach erfolgtem elektrophoretischen Transfer wurde die Membran für 60 min in 4 % MPBS bei RT blockiert. Danach wurde sie einmal mit PBS gewaschen und in eine 2 %ige MPBS-Lösung, die eine geeignete Primärantikörper-Konzentration enthielt oder in den Kulturüberstand der Antikörper-exprimierenden HEK293-Zellen überführt. In diesen wurde sie ÜN bei 4°C geschüttelt. Die Membran wurde nachfolgend drei Mal unter leichtem Schütteln für je 4 min mit PBS gewaschen. Dann wurde die Membran mit einer geeigneten Verdünnung eines Sekundärantikörper-AP-Konjugates (in 2 % MPBS) für 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Falle der rekombinanten Antikörperkonstrukte erfolgte gleich nach dem Blockierungsschritt die Inkubation mit dem konjugierten Sekundärantikörper. Es folgten erneut jeweils 3 Waschschritte mit PBS. Anschließend wurde die Membran in die Färbelösung (12,5 ml AP-Detektionspuffer, 125 µl BCIP, 1,25 ml NBT) überführt. Die Färbung wurde unter Lichtausschluss bis zur Detektion der Banden durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.6.4 Degranulationsanalysen humanisierter RBL-Zellen

Für die Degranulationsanaylsen wurden die RBL-SX38-Zellen einer 250 ml Kulturflasche nach zweimaligem Waschen mit PBS trypsiniert und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 100 xg sedimentiert, Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und durch Verdünnung eine Zellzahl von 5 x 10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 200 µl dieser Zell-Suspension wurden in die Vertiefungen einer sterilen Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht einem einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Diese Arbeiten erfolgten an in einer sterilen Laminarströmungsbank.

Am nächsten Tag wurde des Kulturmedium der Zellen abgesaugt. Die verwendeten IgE-Antikörper wurden mit Tyrodes-Puffer, der mit 0,1% Glucose und 0,1% BSA komplettiert wurde auf die gewünschte Konzentation verdünnt und 100µl dieser Lösung auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 1h in einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die

IgE-Antikörper abgesaugt und nach viermaligem, vorsichtigem Waschen mit 200 µl des supplementiertem Tyrodes-Puffer, mit 100µl des Quervernetzers, der ebenfalls in Tyrodes-Puffer mit 0,1% Glucose und 0,1% BSA verdünnt wurde, für 1h in einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. In die Vertiefungen einer unsterilen Mikrotiterplatte wurden jeweils 10 µl der PNAG-Substratlösung vorgelegt und dann 30 µl des aktuellen Zellkulturüberstandes hinzugegeben. Die Restmenge des Überstandes wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit dem supplementiertem Tyrodes-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 100µl des Puffers, zu dem Triton x in einer finalen Konzentration von 0,1% gegeben wurde auf die Zellen gegeben. Sowohl die Zellen, als auch die Überstände mit der Substratlösung wurden für 1h in einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. In die Vertiefungen mit Zellüberstand und Substratlösung wurde nun zur Beendigung der Umsetzung durch die Hexosaminidase und der Farbentwicklung 50 µl eines Carbonatpuffers gegeben. Die Farbentwicklung erfolgte sofort und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen. Außerdem wurden erneut 10 µl der pNAG-Substratlösung in Vertiefungen vorgelegt, 30 µl des Zellüberstandes der mit Triton x inkubierten Zellen hinzugegeben und 1h in einem CO_2-Inkubator unter 5 % CO_2-Begasung und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die Farbentwicklung wurden auch hier in jede Vertiefung 50 µl Carbonatpuffer hinzugegeben und die Extinktion am Photometer gemessen. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen. Die Auswertung erfolgte, indem die Extinktionswerte jeder Vertiefung nach Quervernetzung und nach Zelllyse addiert und als 100 % festgelegt wurden. Die Degranulation wurde dann als der, durch die Quervernetzung induzierte, prozentuale Anteil angegeben. Von den Dreifachbestimmungen wurden ein Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Die prozentualen Werte wurde dann entweder gegen die Konzentration eingesetzter IgE-Antikörper oder quervernetzender Moleküle aufgetragen.

3.7 Bioinformatische Methoden

Bei den verwendeten Isoformen handelt es sich nach Abgleich mit der Strukturdatenbank allergener Proteine (SDAP, Structual database of allergenic proteins, http://fermi.utmb.edu/SDAP/, 14.08.2011) für Bet v 1a um Bet v 1.0101, die isolierte Isoform Bet v 1iso zeigte 96 % Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz mit

Bet v 1.1401, war mit dieser jedoch nicht völlig identisch. Bei dem hier dargestellten Phl p 5a handelt es sich um Phl p 5.0109, bei Phl p 5b um Phl p 5.0204.

Dreidimensionale Proteinstrukturen wurden mithilfe des Computerprogramms *Chimera* bearbeitet. Die vorhandene Struktur des Bet v 1a-Allergens wurde der Protein-Datenbank PDB (http://www.pdb.org, 14.08.2011) entnommen (PDB 1BV1) und in Form von PDB-Formaten in das Programm *Chimera* eingefügt und bearbeitet. Für verkürzte Fragmente der Allergene, mutierte Versionen oder Allergene, für die noch keine Strukturdaten vorhanden waren, wurde mithilfe des *protein structure homology-modeling servers* (http://swissmodel.expasy.org, 14.08.2011) unter Verwendung des automatisierten Modus eine Strukturmodellierung vorgenommen . Für die Modellierung des chimären Mal d 1-ad126-Bet v 1a-Konstruktes wurde hierfür die Struktur des Bet v 1a als Modellvorlage gewählt, ansonsten wurde durch die Datenbank eine bereits vorhandene Struktur mit höchster Identität auf Ebene der Aminosäuresequenz gesucht. Im Falle des N-terminalen Fragments des Phl p 5-Allergens handelte es sich hierbei um die Struktur von Phl p 6 (PDB 1NLX) und für das C-terminale Fragment um Phl p 5b (PDB 1L3P).

4 ERGEBNISSE

Die Verfügbarkeit des Repertoires Allergie-relevanter Isotypen eines monoklonalen Antikörpers mit definierter Spezifität für ein Allergen stellt die Grundlage zur Evaluierung der Rolle einzelner Isotypen für die Allergiediagnostik und -therapie dar. Sie bietet die Möglichkeit auf molekularer Ebene Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper zu gewinnen und Epitope auf den Oberflächen der Antigene zu identifizieren. Im folgenden Kapitel werden zunächst die Ergebnisse von Klonierungen und Analysen zur eukaryotischen Expression der Isotypen IgE, IgG1, IgG4 und IgA1 und IgA2 eines Bet v 1 sowie eines Phl p 5-spezifischen scFv dargestellt und die Resultate verschiedener chromatografischer Methoden zur Reinigung der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand aufgezeigt. In Bindungsanalysen wird die Interaktion der Antikörper mit den jeweilign Allergenen und Fc-Rezeptoren demonstriert. Es schließen sich Ergebnisse an, in denen die Epitope beider Antikörper auf struktureller Ebene anhand von definierten Aminosäureaustauschen identifiziert wurden.

4.1 Darstellung monoklonaler Antikörperkonstrukte

Im Arbeitskreis konnte zuvor erfolgreich eine humane Spenderbibliothek kloniert und gegen das Birkenpollenallergen Bet v 1a selektiert werden. Ausgangsmaterial für die V_H-Domänen dieser Bibliothek stellte die cDNA von $CD19^+$-B-Zellen peripherer Lymphozyten dreier Pollinosepatienten dar. Durch Amplifikation mit *leader*-spezifischen Oligonukleotiden sowie einem εC_H1-spezifischem Oligonukleotid wurden dabei ausschließlich V_H-Regionen amplifiziert, die auf mRNA-Ebene direkt mit dem konstanten Bereich einer εC_H-Kette fusioniert waren. Auf diese Weise konnte das IgE V_H-Repertoir der Spender erhalten und in den Phagemid-Vekor pHEN2 insertiert werden. (s. Kap. 1.3). Das V_L-Repertoire ist durch Verwendung des Gen III-Phagemidsystems der Griffin-1-Bibliothek synthetischen Ursprungs (Griffin und Ouwehand 1995). Die Selektion dieser Bibliothek gegen das Birkenpollen-Allergen Bet v 1 führte zum Erhalt eines Bet v 1-spezifischen scFvs. Ein Phl p 5-spezifisches scFv lag ebenfalls im Arbeitskreis vor, dieses wurde im Fomat eines Fab-Konstrukts ebenfalls auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen selektiert und dessen CDR-Regionen (CDR, *complementarity determining region)* in das pHEN2-Phagemid übertragen. Diese beiden aus vorangegangenen Selektionen erhaltenen Phagemide enthielten jeweils die Sequenzinformationen

der schweren und leichten Kette eines monoklonalen allergenspezifischen Antikörpers und bildeten die Grundlage dieser Arbeit.

In den vorliegenden Bibliotheksformaten sind die scFv für die Phagendisplay-Technologie mit dem Gen III des filamentösen M13 Bakteriophagen verknüpft, wodurch es auf dessen Oberfläche zu einer fusionierten Expression mit dem Hüllprotein III des Phagen kommt (s. Abb. 4.2). Eine unfusionierte, periplasmatische Expression der scFv, die ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa besitzen, ist zwar prinzipiell durch die Verwendung von subE-*E. coli* Stämmen möglich, da jedoch durch die Monovalenz die funktionelle Affinität stark eingeschränkt ist, bietet sich dieses Format nicht für nachstehende Bindungsanalysen an. Ebenso lassen sich keine Untersuchungen, denen eine Rezeptorbindung für nachgeschaltete Effektorfunktionen zugrunde liegt, durchführen, da diese über den konstanten Bereich der schweren Kette vermittelt werden. Für die Analyse von Wechselwirkungen der Antikörper, sowohl mit ihren Allergenen als auch den Fc-spezifischen Rezeptoren, sollte eine Expression und Reinigung selektierter scFv in Form bivalenter Antikörperkonstrukte, die über Rezeptorbindungspotential verfügen, erfolgen.

Als Expressionssystem wurden HEK293-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um immortalisierte, humane, embryonale Nierenzellen, die posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen durchführen. Die Expression natürlicher, heterotetramerer Immunglobuline basiert auf der gleichzeitigen Expression und anschließenden Zusammenlagerung von schwerer und leichter Kette. Für eine rekombinante Expression müssen somit zwei Zielproteine gleichzeitig exprimiert und richtig zusammengelagert werden. Hierfür wurde der Vektor pBudCE4.1 genutzt und die DNA Sequenzen der variablen schweren und leichten Ketten in zwei aufeinanderfolgenden Klonierungen in die beiden Polylinkerregionen insertiert. In einer einfachen Einschrittklonierung mithilfe des Vektors pcDNA3.1 kann die Domänenstruktur des scFv direkt an den FcBereich der, um die C_H1-Domäne der schweren Kette deletierten eines beliebigen Isotyps gekoppelt werden. Dieses artifizielle scFv-Konstrukt lagert sich nachweislich zu einem bivalenten Antikörpermolekül zusammen, verfügt über Rezeptorbindungspotential und weist eine hohe Expressionsrate in HEK293 Zellen auf. Dadurch bietet es die Möglichkeit ein selektiertes scFv unmittelbar in ein für weitere Analysen verwendbares Format zu übertragen. Eine schematische Darstellung aller angestrebten Antikörperformate sowie den zugrundeliegenden Vektoren ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

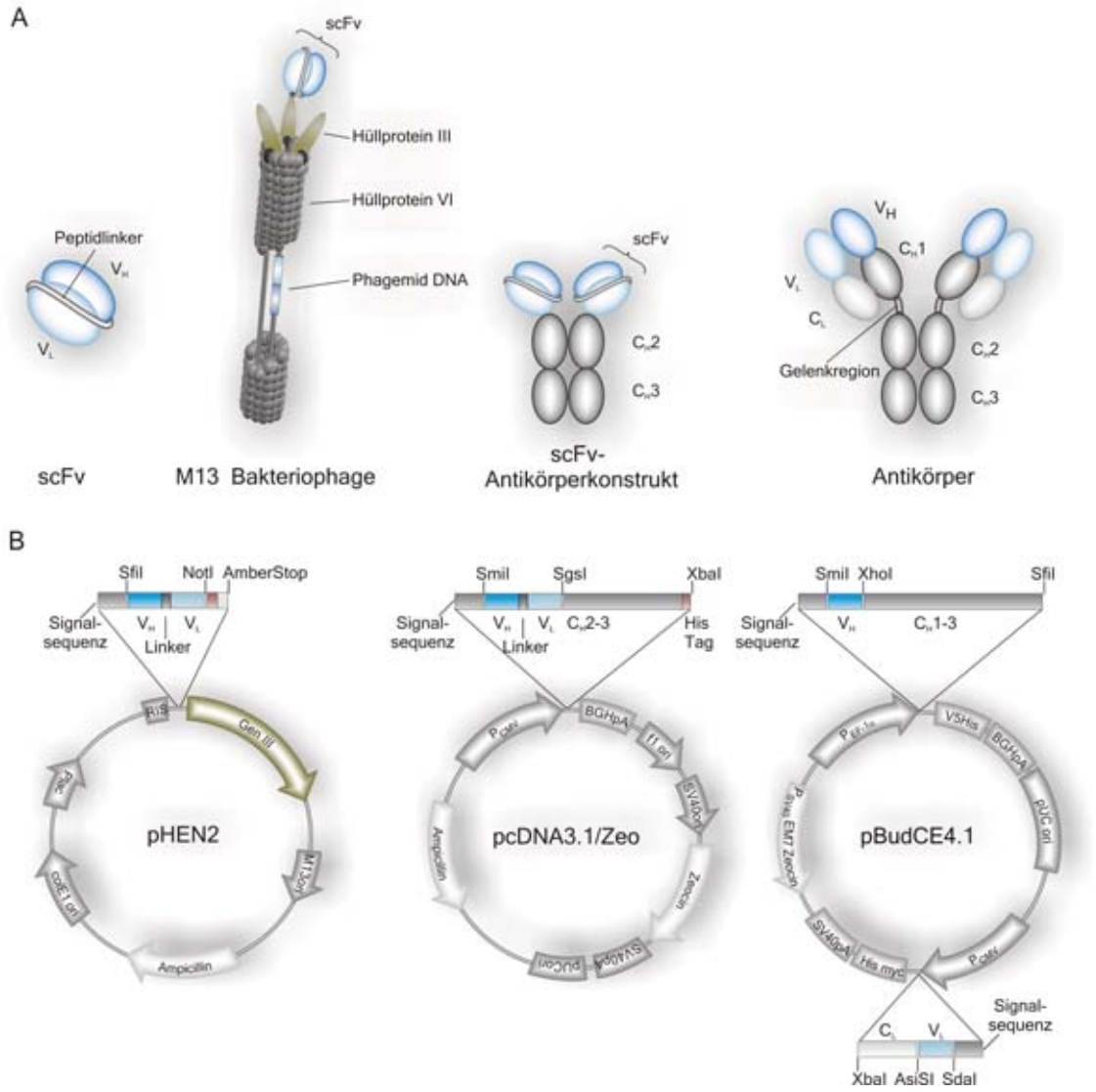


Abb. 4.1 Vereinfachte grafische Darstellung verwendeter Antikörperformate und Expressionsvektoren.

A: Die verschiedenen Antikörperkonstrukte lassen sich durch Insertion in die Expressionvektoren darstellen. Neben den natürlich-vorkommenden heterotetrameren Antikörpern wurden verkürzte artifizielle scFv-Konstrukte generiert.

B: Verwendete Vektoren mit Expressionskassetten. Unter Zuhilfenahme spezifischer Restriktionsendonukleasen können in den Vektoren alle Ketten einzeln ausgetauscht werden. Dadurch lassen sich unterschiedliche Isotypen und unterschiedliche Spezifitäten generieren.

Zunächst wurde besonderer Fokus auf die Darstellung der im Kontext einer Allergie bedeutsamen IgE-Antikörper gelegt, um sowohl Zugang zur Analyse der Interaktion zwischen Antikörper und Allergen, als auch zu nachgeschalteten zellulären Effektorfunktionen zu erhalten. Neben IgE-Antikörpern als Vermittler von Allergien, gibt es weitere Allergie-relevante Isotypen. IgA-Antikörper werden vorwiegend mit der sekretorischen Komponente als Dimer in die Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe sezerniert. Ihnen kommt im Rahmen einer Allergie Bedeutung zu, da sie möglicherweise im-

munsuppressiv wirken, indem sie die Ausschüttung von IL10 fördern. Weiterhin gibt es viele Anhaltspunkte, dass IgA- und IgG-Antikörper eine Rolle als blockierende Antikörper während der Desensibilisierung allergischer Patienten im Laufe einer Immuntherapie spielen (s. Kap. 1.1.3).

4.1.1 Expression Bet v 1- und Phl p 5-spezifischer Antikörperkonstrukte

4.1.1.1 Expression von IgE-Konstrukten

Eine Insertion der Sequenz der beschriebenen allergenspezifischen scFv in den Vektor pcDNA3.1εC_H2-4 zur Expression verkürzter scFv-IgE-Konstrukte wurde im Arbeitskreis bereits zuvor durchgeführt. Es erfolgte eine Transfektion von HEK293-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid und eine Selektion von Transfektanden mittels Zeocin. Im Kulturüberstand der so entstandenen Kulturen konnte über deren Reaktivität mit den jeweiligen Allergenen die Expression der scFv-basierten Antikörperkonstrukte αBet-v1a-scFv/IgEC_H2-4 und αPhlp5-scFv/IgEC_H2-4 in einer ELISA-Analyse nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2).

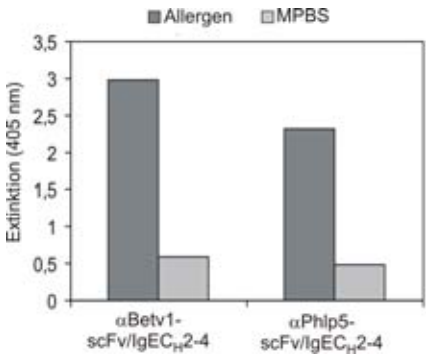


Abb. 4.2 ELISA zur Überprüfung der Expression von scFv/IgEC_H2-4 Konstrukten mit Spezifität für Bet v 1 und Phl p 5.

Mit Bet v 1a und Phl p 5a beschichtete und durch 4 % MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 1 h mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch ein monoklonales Anti-human IgE-AP-Konjugat (1:1000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Im weiteren Verlauf dieses Ergebnisteils werden die Einzelschritte von Klonierungen wie gelelektrophoretische Analyse der Amplifikationen zu insertierender Gene mithilfe Schnittstellen-einfügender Oligonukleotide, Restriktionen mit Restriktionsendonukleasen, Ligationen, Transformationen von *E. coli*-Zellen mit dem generierten Plasmid und die PCR-Überprüfung selektierter Klone nicht beschrieben, da es sich um standardisierte Verfahren handelt, die in Kapitel 3.1 beschrieben werden. Eine Auflistung ver-

wendeter Oligonukleotide und Restriktionsenzyme für die Generierung aller rekombinanten Moleküle ist in Kapitel 3.1.4 gegeben.

Durch weiterführende Klonierungen konnten sowohl V_H- als auch V_L-Regionen beider scFv jeweils in den Vektor pBud-IgE-C_L, der die Expression eines heterotetrameren Antikörpers mit den Immunglobulindomänen $C_H\varepsilon$1-4 und κC_L erlaubt, insertiert werden. Klonierungen der schweren und leichten variablen Ketten erfolgten nacheinander und wurden einzeln durch Sequenzierung verifiziert. Mit Plasmidpräparationen der entstandenen Vektoren pBud-αBetv1/IgE-C_L und pBud-αPhlp5/IgE-C_L wurden HEK293-Zellen transfiziert und der Kulturüberstand stabiler Transfektanden auf die Expression natürlicher heterotetramerer IgE Antikörper in einer ELISA-Analyse getestet. Diese zeigte, dass der αPhlp5-IgE-Antikörper exprimiert wurde, für den Bet v 1-spezifischen IgE konnte jedoch kein reaktiver IgE-Antikörper in dem Kulturüberstand nachgewiesen werden (s. Abb. 4.3).

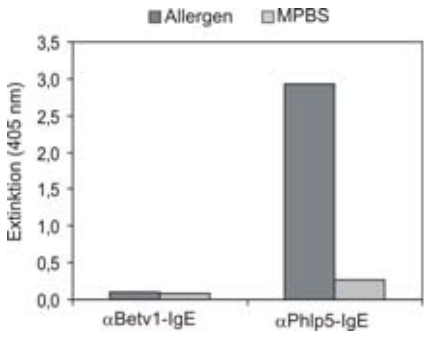


Abb. 4.3 ELISA zur Überprüfung der Expression heterotetramerer IgE-Antikörper mit Spezifität für Bet v 1a und Phl p 5a.

Mit Bet v 1a und Phl p 5a beschichtete und durch 4 % MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 1 h mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch einen monoklonalen Anti-human IgE-AP-Konjugat (1:1000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Bei dieser Klonierung fand eine Fusion der V_L-Domäne mit einer konstanten leichten κ- Kette statt. Humane Antikörper liegen in einem von drei Fällen jedoch mit einer λ-Kette vor. Um zu evaluieren ob die Klasse der konstanten leichten Kette zu Faltungsschwierigkeiten während der eukaryotischen Expression geführt hatte, sollte in dem Vektor pBud-αBetv1/IgE-κC_L nun ein Austausch von κ nach λ erfolgen. Dazu wurde die Sequenz der λC_L aus cDNA, welche nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen peripheren Lymphozyten mithilfe des *peq*-GOLD TriFast-Reagenz und anschließender reverser Transkription mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* und einem oligo-dT-Nukleotid halten wurde, amplifiziert. Das Amplifikat einer PCR mit Schnittstellen-

einfügenden Oligonukleotiden wurde in den Vektor pBud-αBetv1-IgE insertiert und mit dem so entstandenen Vektor pBud-αBetv1-IgE-λC_L eine Sequenzierung und eine Transfektion von HEK293-Zellen durchgeführt. Die Sequenzierung bestätigte die Insertion der λC_L-Sequenz. Zur Kontrolle wurde ebenso mit dem Expressionsvektor des Phl p 5-spezifischen Antikörpers verfahren. Eine ELISA-Analyse zeigte, dass im Kulturüberstand stabiler Transfektanden abermals nur Phl p 5-spezifische, jedoch keine Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper vorlagen (s. Abb. 4.4).

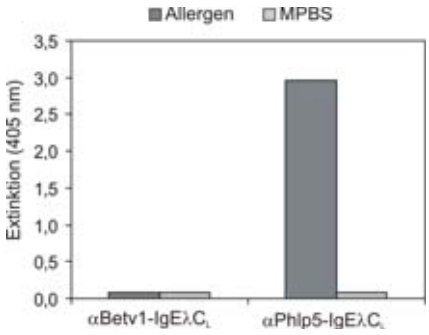


Abb. 4.4 ELISA zur Überprüfung der Expression heterotetramerer IgEλC_L-Antikörper mit Spezifität für Bet v 1a und Phl p 5a.

Mit Bet v 1a und Phl p 5a beschichtete, und durch 4 % MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 1 h mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch ein monoklonales Anti-human IgE-AP-Konjugat (1:1000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Geplante FcεRI-basierte Interaktionsanalysen konnten folglich mit einem Phl p 5-spezifischen heterotetrameren Antikörper durchgeführt werden, wobei für den Bet v 1-spezifischen Antikörper auf das scFv/IgEC_H2-4-Konstrukt zurückgegriffen wurde. Nach der Insertion der leichten und schweren variablen Domänen und erfolgreicher IgE-Expression konnten nun die Sequenzen der schweren konstanten Ketten in den erstellten Plasmiden über Restriktionsendonukleasen ausgetauscht und dadurch die Isotypen IgA und IgG generiert werden.

4.1.1.2 Expression von IgA-Konstrukten

Die *template*-DNA für Klonierungen von Antikörpern der Immunglobulin-Klasse A musste zunächst aus der humanen cDNA peripherer Lymphozyten amplifiziert werden. Hierfür erfolgte eine genspezifische Umschreibung der mRNA durch reverse Transkription mithilfe eines oligo-dT-Nukleotids. Unter Verwendung einer Pfx-Polymerase wurden in einer PCR die Sequenzen der Ketten der beiden IgA Subklassen IgA1 und IgA2 amplifiziert. Zur Differenzierung zwischen IgA1 und IgA2 wurde ein Aminosäure-

Sequenzunterschied in der Gelenkregion zwischen den beiden sonst sehr homologen Subklassen für die Konzipierung der Oligonukleotide genutzt. So konnten sowohl der Bereich der IgAC_H1-Domänen als auch die Sequenz der Domänen IgAC_H2-3 beider Subklassen erhalten werden. Mittels Sequenzierung konnte die Isolierung bestätigt und gezeigt werden, dass es sich bei der Sequenz der IgA2C_H2-3 um die Domänen des IgA2m(1) Allotyps handelt (Swissprot P01877). Die verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass eine spätere Hybridisierung der Domäne C_H1 mit den Domänen C_H2-3 möglich war (s. Abb. 4.5).

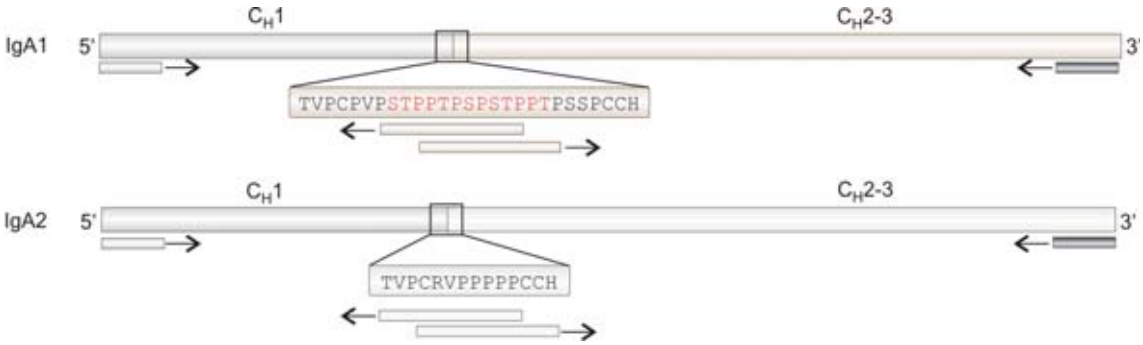


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der IgA1- und IgA2C_H1-3 sowie der Oligonukleotide für die Amplifikationen.

Die Aminosäuresequenzen der Gelenkregionen beider Isotypen sind vergrößert dargestellt. Aminosäuren, die zusätzlich in der IgA1-Sequenz vorkommen sind rot markiert. Oligonukleotide zur Amplifikation der C_H-Domänen sind durch Kästen und die Richtung der Amplifikation durch Pfeile angedeutet.

Durch weitere Klonierungsschritte wurden nun zunächst die Vektoren pcDNA-αBet-v1-scFv/IgAC_H2-3 bzw. pcDNA-αPhlp5-scFv/IgAC_H2-3 für den IgA1- und IgA2-Isotyp generiert. Anschließend wurde eine Transfektion von HEK293-Zellen mit den Plasmiden durchgeführt und der Überstand stabiler Transfektanden auf die Expression der artifiziellen scFv/IgA-Konstrukte hin in einer ELISA-Analyse getestet (s. Abb. 4.6).

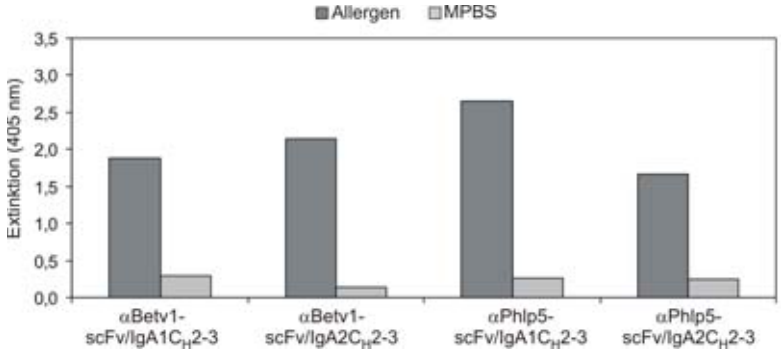


Abb. 4.6 ELISA zur Überprüfung der Expression von scFv/IgAC_H2-3-Konstrukten mit Spezifität für Bet v 1a und Phl p 5a.

Mit Bet v 1a und Phl p 5a beschichtete und durch 4% MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 3 h mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch ein Anti-human IgA-AP-Konjugat (1:2000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Die Analyse ergab, dass sowohl für das Bet v 1 als auch das Phl p 5-spezifische scFv bivalente scFv/IgA-Konstrukte der Unterklassen A1 und A2 generiert werden konnten.

In einem anschließenden Schritt erfolgte die Hybridisierung und Amplifikation der IgAC_H1 und -C_H2-3 Domänen zur vollständigen Länge. Anschließende Sequenzierungen bestätigten die Hybridisierung der Fragmente zu kompletten konstanten schweren Ketten der IgA1- bzw. IgA2-Isotypen. Diese Sequenzen zur Expression vollständiger IgA-Antikörper konnten nun unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen und amplifiziert werden, um anschließend für eine Insertion in die Vektoren pBud-αBetv1-IgA1 und 2 und pBud-αPhlp5a-IgA1 und 2 zur Verfügung zu stehen.

Aufgrund einer internen Erkennungssequenz für das zu verwendende Restriktionsenzym *Xho*I in der Sequenz der C_H3, wurde zunächst mithilfe des *Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit* eine Punktmutation durchgeführt und die Amplifikate anschließend in die Vektoren Insertiert. Diese Klonierungen konnten ebenfalls durch Sequenzierung verifiziert werden, und die Vektoren wurden verwendet um HEK293-Zellen zu transfizieren. Der Kulturüberstand stabiler Transfektanden wurde entnommen und in ELISA-Analysen auf die Expression Allergen-bindender heterotetramerer IgA-Antikörper hin getestet (s. Abb. 4.7). Die Messung zeigte, dass im Kulturüberstand allergenspezifische IgA-Antikörper beider Subklassen und beider Spezifitäten vorhanden waren.

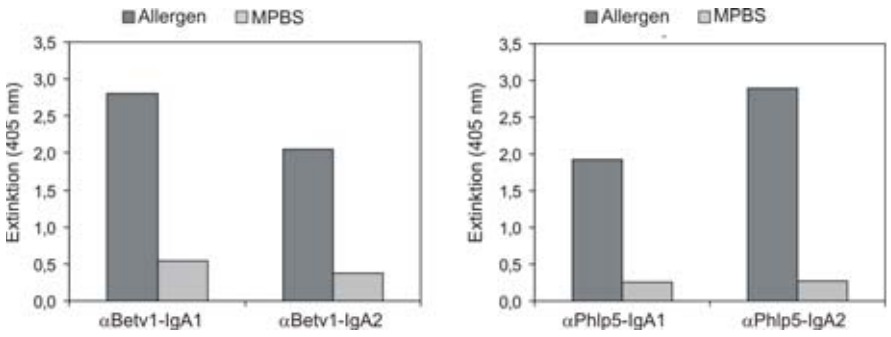


Abb. 4.7 ELISA zur Überprüfung der Expression heterotetramerer IgA1 und IgA2-Antikörper mit Spezifität für Bet v 1a und Phl p 5a.

Mit Bet v 1a und Phl p 5a beschichtete und durch 4 % MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 3 h mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch ein Anti-human IgA-AP-Konjugat (1:2000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

4.1.1.3 Expression von IgG-Konstrukten

Als Matrize zur Amplifikation der schweren Kette des Isotyps IgG konnte auf einen im Arbeitskreis vorliegenden Vektor zurückgegriffen werden, in dem die aus cDNA stammende Sequenz bereits insertiert vorlag. Durch Klonierungsschritte konnten die γ-konstanten schweren Ketten der Subklassen G1 und G4 in die pBud-Vektoren eingefügt und somit die zur Transfektion verwendeten Plasmide pBud-αBetv1-IgG1 und pBud-αBetv1-IgG4 sowie pBud-αPhlp5-IgG1 pBud-αPhlp5-IgG4 generiert werden. Es folgte eine Sequenzierung sowie eine Transfektion von HEK293-Zellen mit diesen Plasmiden und der Kulturüberstand stabiler Transfektanden wurde auf die Expression allergenspezifscher IgG-Antikörper in einer ELISA-Analyse getestet. Hierbei konnten heterotetramere IgG-Antikörper nachgewiesen werden (s. Abb.4.8).

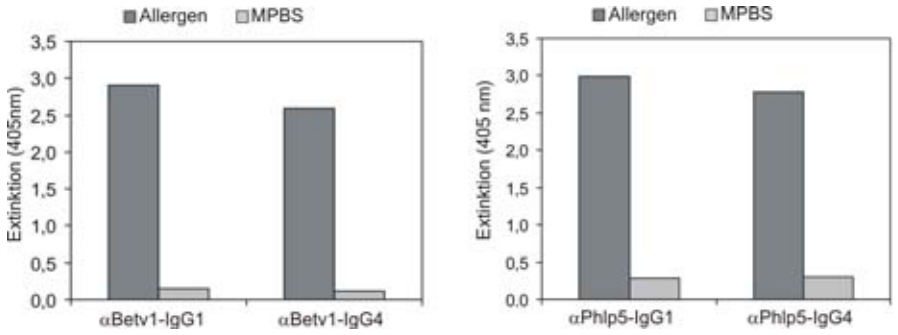


Abb. 4.8 ELISA zur Überprüfung der Expression heterotetramerer IgG-Antikörper mit Spezfität für Bet v 1a und Phl p 5a.

Mit Bet v 1a und Phl p 5a beschichtete und durch 4 % MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 1 h mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch ein Anti-human IgG-AP-Konjugat (1:20000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

In Abbildung 4.20 ist eine Übersicht aller fertiggestellten Expressionsvektoren und im Kulturüberstand detektierbaren Antikörperformate gezeigt. Durch *Sandwich*-ELISA-Analysen mit Isotyp-spezifischen Fänger- und Detektionsantikörpern und einer Standardreihe mithilfe konnten Quantifizierungen der Antikörper in den Kulturüberständen durchgeführt werden. Diese ergaben für die für scFv/IgEC_H2-4 Konstrukte zwischen 240 ng/ml und 1 µg/ml IgE-Antikörper im Zellkulturüberstand. Heterotetramere Phl p 5-spezifische IgE-Antikörper zeigten keinen starken Konzentrationsunterschiede hinlänglich der Zusammensetzung mit einer κ- oder λ-konstanten leichten Kette, hier lag die Konzentration zwischen 500 ng/ml und 1 µg/ml. Die Konzentrationen exprimierter artifizieller verkürzter scFv-IgAC_H2-4 Konstrukte betrugen für IgA1 67 ng/ml und für IgA2 200 ng/ml. Heterotetramere-IgA Antikörper waren im Kulturüberstand mit bis zu 260 ng/ml vorhanden. Die Konzentration von IgG-Antikörpern betrug bis zu 3 µg/ml.

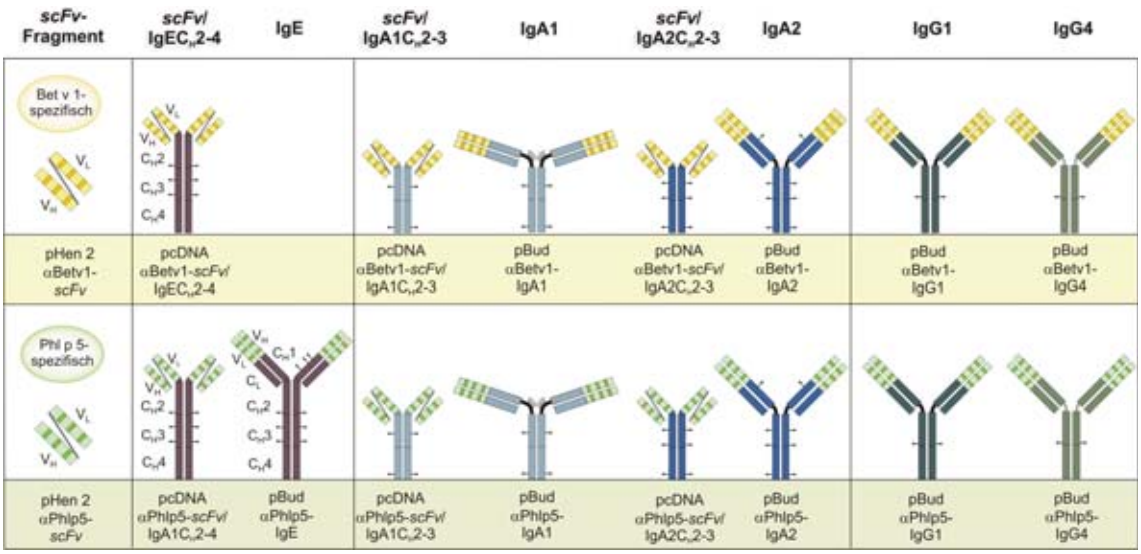


Abb. 4.9 Übersicht der generierten Expressionsvektoren sowie dargestellter rekombinanter Antikörperkonstrukte

Die exprimierten rekombinanten Antikörperkonstrukte sind vereinfacht dargestellt. Variable Regionen, die das Paratop für die Bet v 1-Bindung enthalten sind gelb, für die Phl p 5a- Bindung grün dargestellt. CDR-Regionen sind dunkler gezeichnet und die N-Glykosylierungsstellen schwarz angedeutet. Die Namen aller Expressionsvektoren sind aufgelistet.

4.1.2 Chromatographische Reinigungen der Antikörperkonstrukte

Einige der im weiteren Verlauf geplanten Experimente konnten mit den Antikörper-enthaltenden Kulturüberständen durchgeführt werden, so z.B. die Analysen zur Bindung einzelner Allergenmutanten durch Immunblots. Für andere Interaktionsanalysen wurden jedoch höhere Konzentrationen der Antikörper benötigt, sodass eine Proteinreinigung aus dem Kulturmedium erfolgen musste. Hier boten sich affinitätschromatographische Reinigungsmethoden an. Sie verfügen über eine hohe Spezifität, wodurch die Reinigung der Antikörper aus dem Proteingemisch des fötalen Kälberserums (FKS), welches dem Medium zugesetzt wird, möglich ist. Affinitätschromatographische Reinigungen humaner Antikörper des IgG-Isotyps werden standardmäßig mithilfe von Protein G- und Protein A-Sepharose durchgeführt. Diese binden spezifisch an die γ-konstanten, schweren Ketten und sind daher nicht für die Reinigung von IgA- und IgE-Antikörper anwendbar.

Bei der häufig verwendeten Methode der IMAC-Technologie (*Immobilized Metall Affinty Chromatography*) wird die Affinität für eine chromatografische Reinigung exprimierter Proteine über ein Histidin-*tag* vermittelt. Der Imidazolring des Histidins bindet Ni^{2+}-Ionen, die in Komplexen mit Nitriloessigsäure (NTA) an Agarose gekoppelt vorliegen. Die

Elution erfolgt kompetetiv durch Zugabe von gelöstem Imidazol. Die Proteine werden dabei keinem veränderten pH-Wert ausgesetzt. Bereits während der Klonierung wurden alle Antikörperkonstrukte mithilfe der verwendeten Oligonukleotide mit einem His-*tag* versehen. In Abbildung 4.10 ist exemplarisch das Ergebnis einer Reinigung des Antikörpers αPhlp5-IgE anhand der IMAC-Methode mittels SDS-PAGE-Analyse und nachfolgenden Färbungen gezeigt. Vor der Elution, die mit einer 250 mM Lösung Imidazol durchgeführt wurde, erfolgten drei Waschschritte mit steigenden Imidazolkonzentrationen von 10 mM, 20 mM und 25 mM.

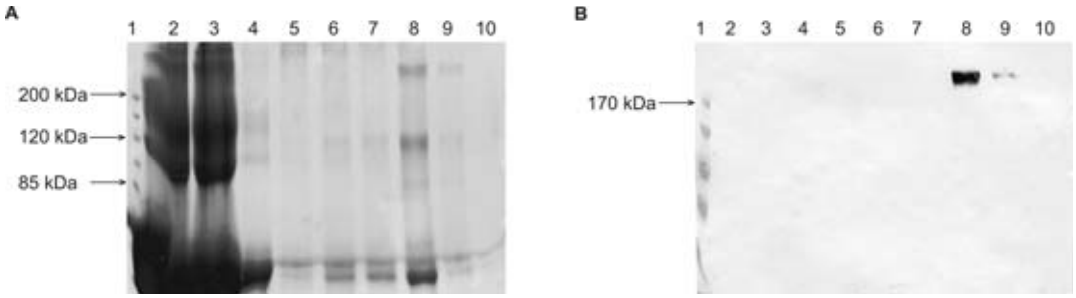


Abb. 4.10 SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Coomassiefärbung und Immunblot der Reinigung von αPhlp5-IgE-Antikörpern aus HEK293-Zellkulturüberstand durch Ni-NTA-Sepharose

Nach einer Affinitätschromatographie mithilfe von Ni-NTA-Sepharose wurden die Elutionsfraktionen der Reinigung einer SDS-PAGE mittels 7,5 %igen Acrylamidgelen unterzogen. Anschließend wurde eine Coomassiefärbung (A) und ein Immunblot (B) mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgE-Antikörper (1:2000 in MPBS) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/BCIP als Substrat.

Bahn 1**A** : *PageRuler*™ *Unstained Protein Ladder*, Bahn 1**B**: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: konzentrierter Zellkulturüberstand, Bahn 3: Säulendurchlauf, Bahn 4: Waschfraktion 10 mM Imidazol, Bahn 5: Waschfraktion 20 mM Imidazol, Bahn 6: Waschfraktion 25 mM Imidazol, Bahnen 7-10: Elutionsfraktionen 1-4

Die Reinigung mittels Ni-NTA wies starke Verunreinigung durch BSA in den Elutionsfraktionen mit hohen Antikörperkonzentrationen auf. Nachstehende Analysen sollten durch BSA jedoch nicht beeinträchtigt werden, und eine spezifische Quantifizierung der Immunglobuline in den Fraktionen war anhand der Verwendung von ELISA *Quantitiy Set*s möglich. Abbildung 4.11 zeigt exemplarisch eine Zusammenstellung von SDS-PAGE-Analysen mit anschließenden Immunblot-Färbungen, die nach Reinigungen Phl p 5- und Bet v 1-spezifischer Antikörperkonstrukte erhalten werden konnten. Die Antikörper zeigen ihrem Molekulargewicht entsprechende Laufverhalten. Für heterotetramere IgG- und IgA-Antikörper konnte wiederholt eine starke Fragmentierung der Antikörper beobachtet werden.

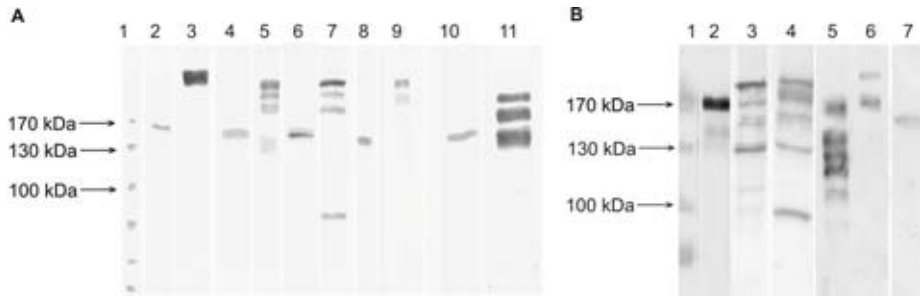


Abb. 4.11 SDS-PAGE-Analysen mit anschließenden Immunblot Phl p 5- und Bet v 1-spezifischer Antikörperkonstrukte

Durch IMAC-gereinigte Antikörperkonstrukte wurden SDS-PAGE-Analysen mittels 7,5 %igen Acrylamidgelen unterzogen. Anschließend wurden Immunblots mit Isotyp-spezifischen Antikörper-AP-Konjugaten durchgeführt: einem AP-konjugiertem Anti-human IgE-Antikörper (1:2000 in MPBS), einem AP-konjutiertem Anti-human IgA-Antikörper (1:2000 in MPBS) oder einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper (1:20000). Als Substrat wurde NBT/BCIP verwendet.

A: Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: αPhlp5/scFv-IgEC$_H$2-4, Bahn 3: αPhlp5-IgE, Bahn 4: αPhlp5/scFv-IgG1C$_H$2-3, Bahn 5: αPhlp5-IgG1, Bahn 6: αPhlp5/scFv-IgG4C$_H$2-3, Bahn 7: αPhlp5-IgG4, Bahn 8: αPhlp5/scFv-IgA1C$_H$2-3, Bahn 9: αPhlp5-IgA1, Bahn 10: αPhlp5/scFv-IgA2C$_H$2-3, αPhlp5-IgA2

B: Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: αBetv1/scFv-IgEC$_H$2-4, Bahn 3: αBetv1-IgG1, Bahn 4: αBetv1-IgG4, Bahn 5: αBetv1/scFv-IgA1C$_H$2-3, Bahn 6: αBetv1-IgA2, Bahn 7:αBetv1/scFv-IgA2C$_H$2-3

Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen der mittels Ni-NTA gereinigten Antikörper kommen durch Wechselwirkungen von Imidazolringen in Histidin-Resten unspezifischer Proteine mit dem Nickel zustande. Kommen diese Proteine in weitaus größeren Mengen als das eigentliche Zielprotein in der zu reinigenden Lösung vor, wie es hier beim BSA der Fall ist, können Verunreinigungen kaum vermieden werden. Affinitätschromatographische Methoden, bei denen eine ausschließliche Spezfität für Antikörper besteht, bieten die Möglichkeit höhere Reinheitsgrade erzielen. In diesem Zusammenhang stellt die spezifische Wechselwirkung des Protein L aus dem Bakterium *Peptostreptococcus magnus* mit den Klassen I, III und IV von κ-V$_L$-Ketten eine Alternative zur IMAC-Reinigung dar. Es ist an Sepharose oder Agarose gekoppelt kommerziell erhältlich und kann für Reinigungen aller humanen Isotypen, die mit einer der erwähnten Klasse von κ-V$_L$-Ketten exprimiert wurden, verwendet werden. Die Elution erfolgte durch Erniedrigung des pH-Wertes auf einen Bereich von pH 2 -2,8. In Abbildung 4.12 ist das Ergebnis einer SDS-PAGE-Analyse mit nachfolgenden Färbungen nach einer Reinigung des Antikörpers αPhlp5-IgA2 mittels Protein L gezeigt. Im Immunblot konnten die Antikörper in den Elutionfraktionen 1-7, die nur schlecht mittels Coomassiefärbung zu detektieren waren, nachgewiesen werden. Das apparente Laufverhalten zeigte ein Molekulargewicht der IgA2-Antikörper von etwa 200 kDa was über dem erwartenden Literaturwert von etwa 170 kDa lag.

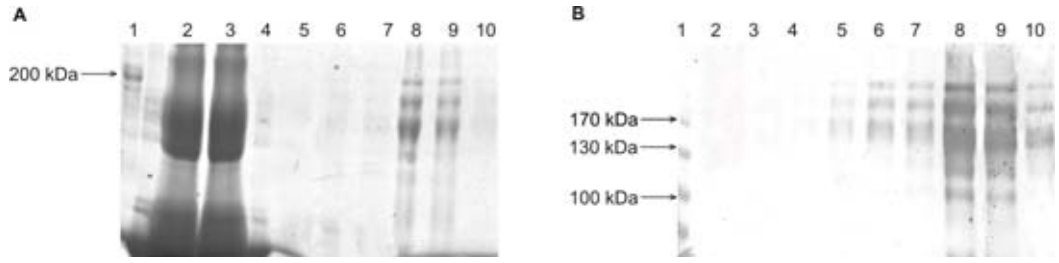


Abb. 4.12 SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Coomassiefärbung und Immunblot der Reinigung von αPhlp5-IgA2-Antikörpern aus HEK293-Zellkulturüberstand mithilfe einer Protein L- Matrix

Nach einer Affinitätschromatographie mittels Protein L-Matrix wurden die Elutionsfraktionen der Reinigung einer SDS-PAGE mittels 7,5 %igen Acrylamidgelen unterzogen. Anschließend wurde eine Coomassiefärbung (A) und ein Immunblot (B) mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgA-Antikörper (1:2000 in MPBS) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/BCIP als Substrat.

A: Bahn 1: *PageRuler*™ *Unstained Protein Ladder*, Bahn 2: Zellkulturüberstand, Bahn 3: Säulendurchlauf, Bahnen 4-10: Elutionsfraktionen 1-7

B: Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zellkulturüberstand, Bahn 3: Säulendurchlauf, Bahnen 4-10: Elutionsfraktionen 1-7, Bahn 10: Kolostrum-IgA

Eine mögliche Dimerbildung der Antikörper wäre durch Disulfidbrückbildung von Cysteinen im C-terminalen Bereich der schweren konstanten Kette theoretisch möglich, dafür zeigt das Laufverhalten jedoch ein zu niedriges Molekulargewicht an. Normalerweise erfolgt eine Dimerisierung von IgA-Antikörpern über die J-Kette und die sektretorische Komponente, die beide nicht von HEK293-Zellen exprimiert werden. Zu Kontrolle wurden polyklonale Antikörper aus Kolostrum untersucht (nicht gezeigt) und auch für diese Antikörper konnte ein leicht erhöhtes Laufverhalten beobachtet werden. Die SDS-PAGE-Analysen lassen eine Fragmentierung der Antikörper vermuten, dies konnte jedoch durch positive Ergebnisse sowohl in ELISA-Messungen als auch Fc-Rezeptorbindungen auf funktioneller Ebene nicht beobachtet werden. Die Coomassiefärbung zeigt die noch vorhandene Verunreinigung der Elutionsfraktionen mit bovinem Serum-Albumin (BSA), welches im FKS in hoher Konzentration enthalten ist.

In einem zweiten Ansatz sollte die Antigen-Antikörperbindung für eine Affinitätschromatographie genutzt werden. Diese hochspezifische und oft hochaffine Bindung sollte es ermöglichen, Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen zu minimieren. Phl p 5a wurde mithilfe des Vektors pTXB1 mit einem Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne (CBD) fusioniert in *E. coli*-Zellen exprimiert. Anschließend wurde das Zelllysat über ein Säulenbett, bestehend aus Chitin-Partikeln, gegeben, an welche über die CBD-Domäne eine Bindung des Phl p 5a-Fusionproteins erfolgte. Diese Matrix konnte dann zur Reinigung der rekombinanten Phl p 5-spezifischen IgE-Antikörper aus dem Zellkulturüberstand genutzt werden. Die Elution der Antikörper erfolgte durch Erniedrigung des pH-Wertes. Da nicht bekannt war, welcher pH-Wert eine Dissoziation vom Antigen in-

duziert, wurde mit einem Citratpuffer (20 mM) eine schrittweise Verringerung, beginnend bei pH 5 durchgeführt. Zur Neutralisation der Elutionsfraktionen wurde Trispuffer (1M) mit einem pH-Wert von 7,5 in den Auffanggefäßen vorgelegt. In Abbildung 4.13 sind SDS-PAGE-Analysen der Reinigung mit nachfolgender Coomassiefärbung und Immunblot zu sehen.

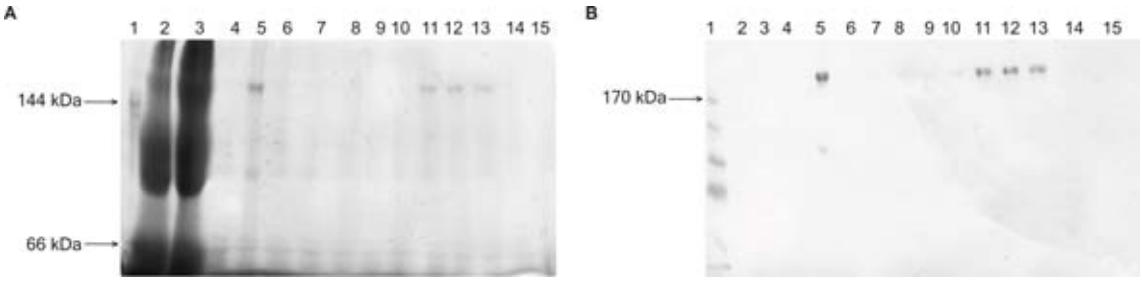


Abb. 4.13 SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Coomassiefärbung und Immunblot der Reinigung von αPhlp5-IgE-Antikörpern aus HEK293 Zellkulturüberstand mithilfe einer Antigen-Affinitätsmatrix

Nach einer Affinitätschromatographie mithilfe einer Antigen-Affinitätsmatrix wurden die Elutionsfraktionen der Reinigung einer SDS-PAGE mittels 7,5 %igen Acrylamidgelen unterzogen. Anschließend wurde eine Coomassiefärbung (A) und ein Immunblot (B) mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgE-Antikörper (1:2000 in MPBS) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/BCIP als Substrat.

Bahn 1**A** : *mixed protein marke*r, Bahn 1**B**: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: konzentrierter Zellkulturüberstand, Bahn 3: Säulendurchlauf, Bahn 4: Waschfraktion, Bahn 5: Säulenmatrix nach Waschschritt, Bahn 6: Citratpuffer pH 5, Bahn 7: Citratpuffer pH 4,5 , Bahn 8: Citratpuffer pH 4, Bahn 9: Citratpuffer pH 3,5, Bahn 10: Citratpuffer pH 3, Bahn 11: Citratpuffer pH 2,5, Bahn 12-14:Citratpuffer pH 2, Bahn 15: Säulenmatrix nach Elution

Anhand des mittels Coomassie gefärbten Polyacrylamidgels ist zu erkennen, dass Verunreinigungen durch BSA fast vollständig durch den Waschschritt entfernt werden konnten. Eine Dissoziation der Antikörper von der Phl p 5a-CBD-Chitinmatrix erfolgte bei pH 2,5. Der Immunblot konnte auch eine beginnende Elution bei einem pH-Wert von 3 detektieren. Eine ELISA-Analyse wies die Elution Allergen-bindender IgE-Antikörper schon bei einem pH-Wert von 3,5 nach (s. Abb. 4.14). Hier zeigte sich, dass im Säulendurchlauf ebenfalls IgE Antikörper detektiert werden konnten, was auf eine unzureichende Kapazität der hergestellten Matrix schließen lässt, wobei jedoch eine gute Bindung der Antikörper an die Matrix an sich erfolgte (s. Abb. 4.13, Bahn 5).

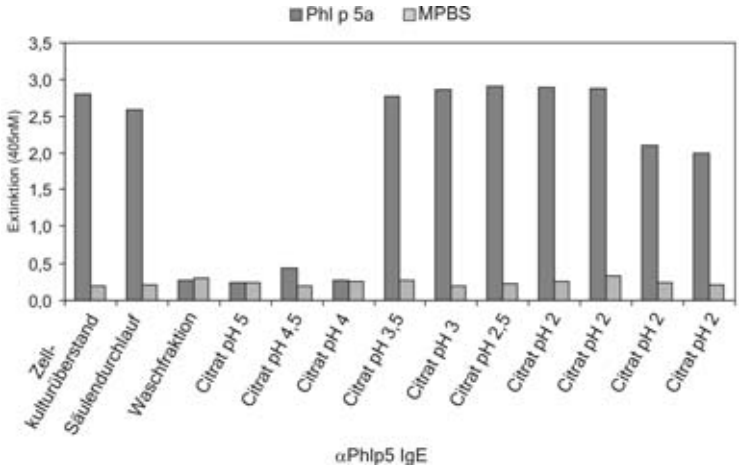


Abb. 4.14 ELISA zur Überprüfung der Reiniung von αPhlp5-IgE-Antikörpern aus HEK293 Zellkulturüberstand mithilfe einer Antigen-Affinitätsmatrix

Mit Phl p 5a beschichtete und durch 4 % MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 12 h mit den Reinigungsfraktionen inkubiert. Die Detektion durch ein monoklonales Anti-human IgE-AP-Konjugat (1:1000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Um eine Denaturierung der IgE-Antikörper durch die Säure-Einwirkung besser einschätzen zu können, wurde ein Stabilitätstest durchgeführt. Dafür wurden jeweils 50 µl des IgE-enthaltenden Überstandes mit 150 µl Citratpuffer, pH 2 versetzt und nach unterschiedlichen Zeitabständen 60 µl des Neutralisierungspuffers hinzugegeben. Zur Kontrolle wurde PBS anstelle von Citratpuffer verwendet. Anschließend wurde die Integrität der Antikörper in einem ELISA getestet (s. Abb. 4.15).

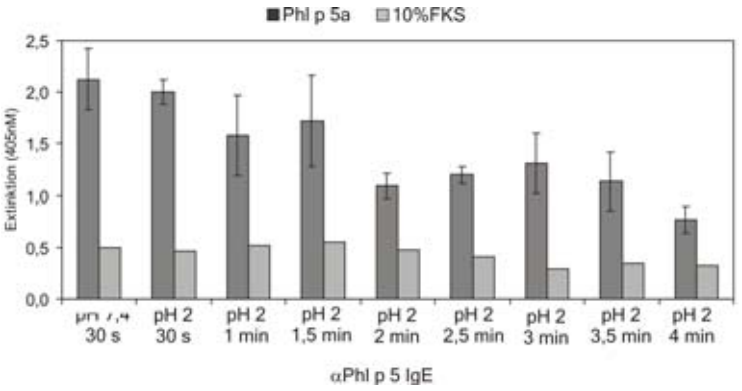


Abb. 4.15 ELISA zur Überprüfung der pH-Stabilität von αPhlp5-IgE-Antikörpern

Mit Phl p 5a beschichtete und durch 10 % FKS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für12 h mit Ansätzen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe von Citrat pH 2 neutralisiert wurden inkubiert. Alle Ansätze erfolgten in Dreifachbestimmungen. Die Detektion durch ein monoklonales Anti-human IgE-AP-Konjugat (1:1000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Es war deutlich erkennbar, dass bereits nach zwei-minütiger Inkubation bei einem pH Wert von 2 eine Degradierung der Antikörper erfolgte Dabei konnte jedoch nicht differenziert werden, ob das beobachtete verringerte ELISA-Signal durch eine Beeinträchti-

gung der Bindung der Antikörper an das Allergen oder des Sekundärantikörpers an die IgE-Antikörper rührte. Dieses Ergebnis führte dazu, dass eine Reinigungsmethode, bei der die Elution durch eine pH-Erniedrigung erfolgt, für weitere Reinigungen nicht mehr in Betracht gezogen wurde, da sich Analysen zu den nativen Bindungseigenschaften der Antikörper anschließen sollten.

Aufgrund der Schädigung bei Säure-basierter Elution wurde die geringe Reinheit der Antikörper toleriert und weitere Konstrukte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die so aus dem Kulturüberstand transfizierter HEK293-Zellen gewonnenen Antikörper unterschiedlicher Formate standen nun für weitere Analysen hinsichtlich ihrer Allergen- und Rezeptorbindungseigenschaften bereit.

4.2 Analysen der Allergen-Antikörper-Interaktionen

Nach Reinigung der Antikörperkonstrukte konnten diese für weitere Untersuchungen verwendet werden. Hierbei stand zunächst die Charakterisierung der spezifischen Bindungen der Allergene Bet v 1a und Phl p 5a im Fokus. Durch Oberflächenplasmonenresonaz Spektroskopie sollte Aufschluss über die Affinitäten der rekombinanten Antikörperkonstrukte zu ihren Allergenen erhalten werden. Weiterhin sollte angestrebt werden, die rekombinanten IgG- und IgA-Antikörper in ELISA- und durchflusszytometischen Messungen hinsichtlich der Bindung löslicher und zellgebundener Rezeptoren zu analysieren. Antikörperkonstrukte des IgE-Isotyps wurden in zellulären Versuchsanordnungen zur Belegung von FcεI- Rezeptoren auf der Oberfläche humanisierter Ratten-RBL-Zellen eingesetzt, die dann bei Quervernetzung zur Degranulation führen. Die ausgeschütteten Mediatoren können durch spezifische Substratumsetzung colorimetrisch gemessen werden. Dieser Versuchsaufbau imitiert die Abläufe während einer pathogenen allergischen Reaktion des Soforttyps und lässt eine Einschätzung der Funktionalität rekombinanter Antikörperkonstrukte im natürlichen System zu.

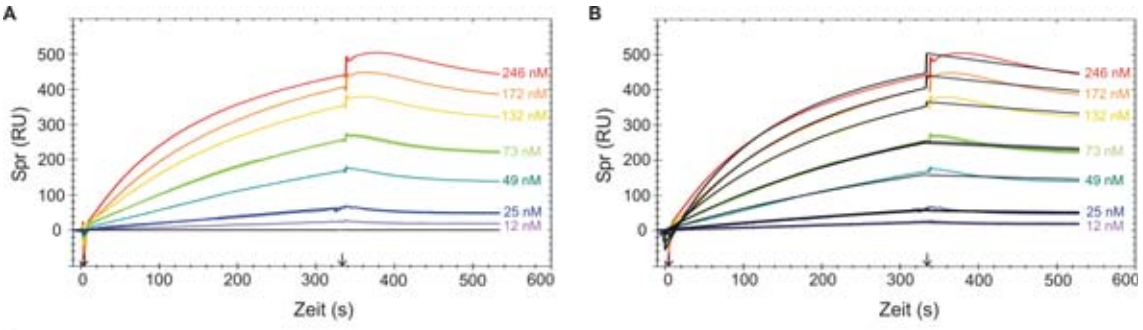
4.2.1 SPR-spektroskopische Messungen zur Bestimmung der Affinität

Bei der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie, kurz SPR-Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*), handelt es sich um eine Biosensortechnik, bei der Biomoleküle wie z.B. Proteine in einer Miniaturflusszelle auf der Goldoberfläche eines Sensorchips an eine Carboxymethlydextranschicht als Liganden immobilisiert werden. Interaktionspartner für diese Moleküle werden als mobile Phase über den Chip geleitet und als Analyten bezeichnet. Bei einer Bindung des Analyten an den Liganden erfolgt eine messbare Änderung der auf der Chipoberfläche immobilsierten Masse. Dies wird anhand eines veränderten, sogenannten SPR-Winkels detektiert. Durch eine Registrierung dieser Änderung kann das Bindungsverhalten des Analyten zum Liganden in Echtzeit beobachtet und kinetische Parameter der Bindung ermittelt werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Bindungsanalysen, wie z.B. immunologischen Methoden ist der Verzicht von Markierungen der Interaktionspartner. Bei Bindung eines Nanogramms Protein auf einer Fläche von einem Quadratmillimeter ändert sich der SPR-Winkel um etwa 100 m°, was als 1000 *Response Units* (RU) detektiert wird. Für SPR-Messungen der Bindungen Bet v 1a- und Phl p 5a-spezifischer Antikörperkonstrukte an ihre Liganden wurde das jeweilige Allergen als MBP-Fusionsprotein auf der Chipoberfläche immobilisiert. Um bei der Interaktion mit dem Antikörper zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung unterscheiden zu können, wurde auf einer Referenz-Flusszelle MBP immobilisiert. Die unspezifischen Wechselwirkungen mit dem MBP wurden von der spezifischen Bindung an das Allergen-MBP-Konstrukt subtrahiert und die daraus resultierenden RU in Abhängigkeit von der Zeit in einem Sensorgramm aufgetragen. Am Verlauf der Kurve kann das Bindungsverhalten der Antikörper also deren Assoziations- und Dissoziationsverhalten charakterisiert werden. Durch Vermessungen unterschiedlicher Konzentrationen des Analyten werden einzelne Sensorgramme erhalten, deren Auswertung mit geeigneten Bindungsmodellen durch Kurvenanpassungen erfolgt. Dies liefert Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation, anhand derer die Dissoziationskonstante im Gleichgewicht, oder auch Bindungskonstante K_D (M), die ein Maß für die Affinität des Analyten zum Liganden darstellt erhalten werden kann. Bei der Auswertung der im Folgenden dargestellten SPR-spektroskopischen Messungen wurde zur Auswertung eine in Kapitel 3.4.2 beschriebene bivalente Kurvenanpassung durchgeführt und die beschriebenen Bindungskonstanten berechnet.

4.2.1.1 SPR-Messungen Bet v 1a-spezifischer Antikörperkonstrukte

Bet v 1a-MBP und MBP wurden zunächst durch kovalente Kopplung mithilfe eines EDC/NHS Esters auf einem Amin-Affinitätschip zur Vermessung in einem *Sierra Sensors* SPR-Biosensor auf zwei unterschiedlichen Flusszellen immobilisiert. Es wurden 1168 RU Bet v 1a-MBP, das entspricht etwa 1,2 ng Protein/mm² oder 0,19 nmol/m² auf dem Chip kovalent gebunden. Von dem als Referenz verwendeten MBP wurden 2430 RU immobilisiert, was 0,24 ng Protein/mm² oder 48 nmol/m² entspricht. Die Dichte an unspezifischem Protein lag somit etwa in der gleichen Größenordnung wie die Dichte an Bet v 1a-Molekülen. Anschließend wurden Bindungsanalysen mit dem verkürzten scFv/IgE-Konstrukt des αBetv1-Antikörpers durchgeführt. Zunächst wurden die Regenerationsbedingungen, also Pufferbedingungen bei denen eine sofortige Dissoziation vom Antigen stattfindet, ermittelt. Dies ist nötig, da bei der Antigen-Antikörperbindung häufig eine sehr langsame Dissoziation erfolgt, die bei mehreren aufeinanderfolgenden Messungen unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen zu enormen Zeitverzögerungen führen würde. Mithilfe einer Programmautomatik konnten Messungen unterschiedlicher Konzentrationen des αBetv1-scFv/IgEC_H2-4 hintereinander erfolgen. Das Antigen wurde nach jeder Messung mit einem Regenerationspuffer, der zu zwei Teilen aus einem basischen Puffer und zu einem Teil aus Wasser bestand (Andersson, Areskoug, und Hardenborg, 1999), regeneriert. Abbildung 4.16 A zeigt die Sensorgramme der Messungen unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen. Eine Kurvenanpassung nach bivalentem Bindungsmodell ist in Abbildung 4.16 B zu sehen.

Die erhaltenen kinetischen Parameter sowie berechnete Bindungskonstanten sind in Abbildung 4.16 C tabellarisch zusammengestellt. Anhand der Messung konnte eine Bindungskonstante von 43 nM erhalten werden. Zum Vergleich wurde die Analyse des Bindungsverhaltens eines Antikörpers, der von einer Bet v 1a-spezifischen Hybridomzelllinie stammte, durchgeführt. Hier hatte im Arbeitskreis die Klonierung eines Plasmids, die Transfektion sowie Expression in HEK293-Zellen des Antikörpers als avianer IgY-Isotyp stattgefunden. Der Kulturüberstand wurde mithilfe von Ni-NTA gereinigt und die resultierende Antikörperfraktion mithilfe des ELISA-*Quantitation Set*s für IgY quantifiziert.



C

	k_a1	k_d1	k_a2	k_d2	Chi^2	K_D1	K_D2	K_Dbi
Wert	2,3E4	9,8E-4	6,5E-3	1,7	40	4,3E-8	259	4,3E-8
Einheit	1/(M*s)	1/s	1/(RU*s)	1/s	RU	M	mol/m²	M

Abb. 4.16: SPR-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen des Bet v 1a-spezifischen Antikörperkonstruktes αBet v1/scFv-IgEC$_H$2-4

Der Antikörper wurde für 360 s mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 µl/min über das immobilisierte Allergen geleitet. Verwendet wurde ein *Sierra Sensors* SPR-Biosensor und das Auswertungsprogramm *Trace-Drawer*

A: Sensorgramme der Echtzeitmessung bei Bindung des Antikörpers an Bet v 1a-MBP in Form eines steigenden Resonanzsignals (RU). Assoziations- und Dissoziationsverhalten sind bei steigenden Antikörperkonzentrationen als farbige Kurven erkennbar. Ein Puffer-Referenzsensorgramm wurde subtrahiert und ist als schwarze Nulllinie erkennbar. Pfeile markieren Beginn und Ende der Antikörperinjektion..

B: Überlagerung des Sensorgramms mit der Kurvenanpassung (schwarz). Für die Kurvenanpassung wurde ein bivalentes Bindungsmodell gewählt. Die RU_{max}-Werte wurden lokal für jede Konzentration berechnet.

C: Tabellarische Darstellung errechneter kinetischer Parameter. Anhand der Kurvenanpassungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d der Bindungen beider Antikörperbindungsstellen an Phl p 5a (k_a1, k_d1, k_a2, k_d2) berechnet werden. Die Bindungskonstanten wurden dann wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben berechnet. $K_D$bi bezeichnet die Bindungskonstante der bivalenten Bindung.

In einer Sandwich-ELISA-Messung wurde untersucht, ob sich die Bindungsstelle dieses Antikörpers mit dem Epitop des Bet v 1-spezifischen selektierten scFvs überlagert. Da eine gleichzeitige Bindung beider Antikörper an das Allergen möglich ist, kann je-

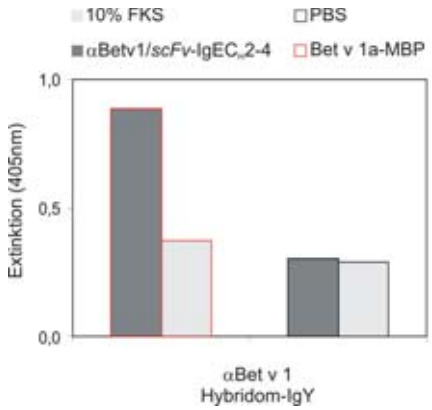
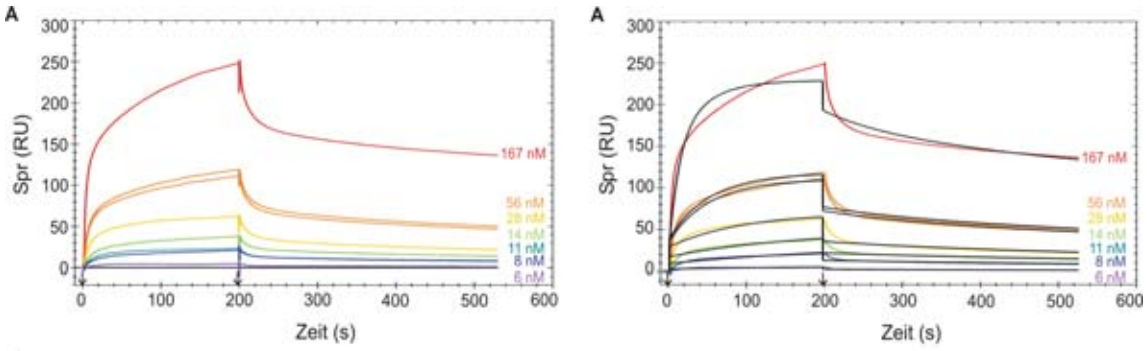


Abb. 4.17 Sandwich-ELISA zur Überprüfung der gleichzeitigen Bindung des αBetv1-scFv/-IgEC$_H$2-4 und des Bet v 1-spezifischen Hybridom-Antikörpers an Bet v 1a-MBP

Mit αBetv1-scFv/IgEC$_H$2-4 beschichtete und durch 10 % FKS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 1 h mit Bet v 1a-MBP in einer Konzentration von 100 µg/ml inkubiert. Anschließend wurde der, Hybridomzell-Antikörper zugegen und für 1 h inkubiert. Die Detektion mit einem Anti-IgY-AP-Konjugat (1:2000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

doch davon ausgegangen werden, dass die Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen (s. Abb. 4.17). Die Biosensor-Messung mit diesem Hybridom-Antikörper erfolgte mit einem *Biacore-T100* Biosensor, unter Benutzung eines CM5-Chips. Die Auswertungsdaten sind in Abbildung 4.18 gezeigt. Die Bindungskonstante für die Bindung dieses Antikörpers an Bet v 1a liegt bei 3,5 nM. Die Bindungsstärke ist somit um etwa eine Zehnerpotenz stärker als die des selektierten Antikörpers. Auch zeigen die Sensorgramme und die berechneten Geschwindigkeitskonstanten ein anderes Bindungsverhalten. Die Assoziation verläuft schneller, was durch den steileren Anstieg der Kurven erkennbar ist. Die Dissoziation erfolgt zunächst auch zügig, verläuft dann jedoch sehr langsam.



C

	k_a1	k_d1	k_a2	k_d2	Chi^2	K_D1	K_D2	K_Dbi
Wert	1,9E6	6,7E-3	7,4E-1	6,2	19	3,5E-9	8,4	3,5E-9
Einheit	1/(M*s)	1/s	1/(RU*s)	1/s	RU	M	mol/m²	M

Abb. 4.18 SPR-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen eines Bet v 1a-spezifischen Hybridom-Antikörpers.

Der Antikörper wurde für 200 s mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min über das immobilisierte Allergen geleitet. Verwendet wurde ein *Biacore T100*-Biosensor und das Auswertungsprogramm *TraceDrawer.*

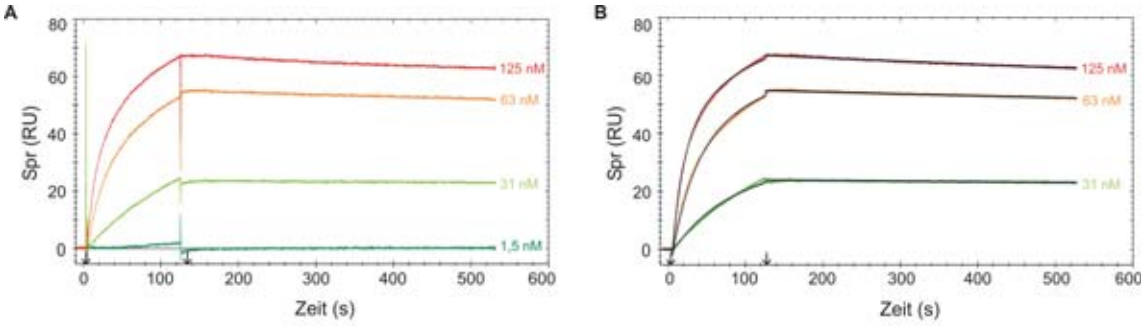
A: Sensorgramm der Echtzeitmessung bei Bindung des Antikörpers an Bet v 1a-MBP in Form eines steigenden Resonanzsignals (RU). Assoziations- und Dissoziationsverhalten sind bei steigenden Antikörperkonzentrationen als farbige Kurven erkennbar. Ein Puffer-Referenzsensorgramm wurde subtrahiert und ist als schwarze Nulllinie eingezeichnet. Pfeile markieren Beginn und Ende der Antikörperinjektion.

B: Überlagerung des Sensorgramms mit der Kurvenanpassung (schwarz). Für die Kurvenanpassung wurde ein bivalentes Bindungsmodell gewählt. Die RU_{max}-Werte wurden lokal für jede Konzentration berechnet.

C: Tabellarische Darstellung errechneter kinetischer Parameter. Anhand der Kurvenanpassungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d der Bindungen beider Antikörperbindungsstellen an Bet v 1a (k_a1, k_d1, k_a2, k_d2) berechnet werden. Die Bindungskonstanten wurden dann wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben berechnet. $K_D$bi bezeichnet die Bindungskonstante der bivalenten Bindung.

4.2.1.2 SPR-Messungen Phl p 5a-spezifischer Antikörperkonstrukte

Für die SPR-Messung mit Phl p 5a-spezifischen Antikörpern wurde ein IgA2-Antikörper verwendet. Phl p 5a-MBP wurde analog zum Bet v 1a-MBP auf einer CM5-Chipoberfläche mittels EDC/NHS immobilisiert, wobei MBP als Kontrolle diente. Hierbei konnten 960 RU immobilisiert werden, was etwa 1 ng/mm² oder einer Dichte von 0,14 nmol/m² entspricht. Anschließend erfolgte zunächst eine Testphase, um die optimalen Regenerationsbedingungen für die Messungen zu ermitteln. Es konnte eine starke Bindung des Antikörpers an Phl p 5a-MBP beobachtet werden. Die Dissoziation erfolgte sehr langsam und erst durch aufeinanderfolgende Injektionen von Citratpuffer (50 mM) pH 1 und Tris (50 mM) pH 11 konnte eine vollständige Regeneration des Liganden erreicht werden. Die Ergebnisse der daraufhin durchgeführten Messungen sind in Abbildung 4.19 dargestellt.



C

	k_a1	k_d1	k_a2	k_d2	Chi^2	K_D1	K_D2	K_Dbi
Wert	2,4E5	3,4E-4	8,9E-1	4,8	0,21	1,4E-9	5,4	1,4E-9
Einheit	1/(M*s)	1/s	1/(RU*s)	1/s	RU	M	mol/m²	M

Abb. 4.19: SPR-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen des Phl p 5a-spezifischen Antikörperkonstruktes αPhlp5 IgA2.

Der Antikörper wurde für 120 s mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min über das immobilisierte Allergen geleitet. Verwendet wurde ein *Biacore-T100* Biosensor und das Auswertungsprogramm *TraceDrawer*

A: Sensorgramm der Echtzeitmessung bei Bindung des Antikörpers an Phl p 5a-MBP in Form eines steigenden Resonanzsignals (RU). Assoziations- und Dissoziationsverhalten sind bei steigenden Antikörperkonzentrationen als farbige Kurven erkennbar. Ein Puffer-Referenzsensorgramm wurde subtrahiert und ist als schwarze Nulllinie eingezeichnet. Pfeile markieren Beginn und Ende der Antikörperinjektion..

B: Überlagerung des Sensorgramms mit der Kurvenanpassung (schwarz). Für die Kurvenanpassung wurde ein bivalentes Bindungsmodell gewählt. Die RU_{max}-Werte wurden lokal für jede Konzentration berechnet.

C: Tabellarische Darstellung errechneter kinetischer Parameter. Anhand der Kurvenanpassungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d der Bindungen beider Antikörperbindungsstellen an Phl p 5a (k_a1, k_d1, k_a2, k_d2) berechnet werden. Die Bindungskonstanten wurden dann wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben berechnet. $K_D$bi bezeichnet die Bindungskonstante der bivalenten Bindung.

Es konnte eine Bindungskonstante von 1 nM für die Affinität des Antikörpers zum Allergen erhalten werden. Der niedrige Chi^2-Wert und die kaum abweichende Kurvenanpassung lassen diesen Wert veritabel wirken. Die sehr niedrige Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_d der monovalenten Bindung deutet auf eine Allergen-Antikörper-Interaktion hin, deren Gleichgewicht stark auf der Seite assoziierter Moleküle liegt. Dies fällt auch bei Betrachtung des Sensorgramms auf und geht mit den Schwierigkeiten bei der Regeneration des Allergens nach der Antikörperbindung einher.

4.2.2 Bindung von Fcα -und FcγI-Rezeptoren

Um auch für die Konstrukte anderer Isotypen eine Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren zu zeigen, wurden Bindungsanalysen mit einem löslichen Konstrukt des IgG-Rezeptors, und IgA-Rezeptor-tragenden U937-Zellen durchgeführt. Der FcγRI (CD64) bindet monomere IgG-Antikörper und wird als integrales Membranprotein von Makrophagen und Monozyten exprimiert. Im Arbeitskreis wurde der Rezeptor löslich in Form eines Fusionsproteins mit einer υ-konstanten schweren Kette zur Detektion mit einem Anti-IgY-Antikörper kloniert und exprimiert. Die Bindung rekombinanter allergenspezifischer IgG-Konstrukte an dieses Rezeptormoleklül konnte in einer ELISA-Analyse nachgewiesen werden (s. Abb. 4.20).

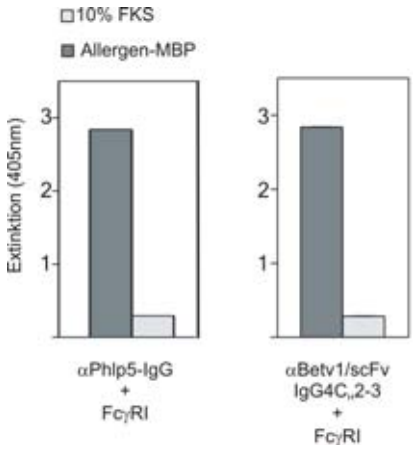


Abb. 4.20: ELISA zur Überprüfung der Bindung des αPhlp5-IgG1-Antikörpers und des αBetv1/scFv-IgG1C_H2-3- Konstruktes an den FcγRI.

Mit 100 µg/ml rekombinantem Allergen-MBP-Fusionsprotein beschichtete und durch 4% MPBS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 3 h mit Zellkulturüberstand des αPhlp5-IgG1 bzw. des αBetv1/scFv-IgG4C_H2-3 inkubiert. Anschließend wurden für 1 h 10 µg/ml des Konstrukts CD64-IgYC_H2-4 zugegeben. Die Detektion erfolgte durch anti-IgY (1:20000) mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Die Rezeptorbindung der rekombinanten dargestellten IgA-Antikörper wurde mit dem Phl p 5a-spezifischen Antikörper αPhlp5-IgA durchgeführt. Die verwendeten U937-Zel-

len verfügen über einige Charakteristika von myeloiden humanen Monocyten, wodurch sie zu einem Modellsystem für Untersuchungen zur Differenzierung von Monozyten wurden. Eines dieser Merkmale ist die Expression des membranständigen IgA-Rezeptors CD89. In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde der Rezeptor mit einem Phycoerythrin-markierten Anti-CD89 Antikörper auf den Zellen nachgewiesen und anschließend eine Bindung des dargestellten αPhlp5-IgA2-Antikörpers an die Zellen mithilfe eines Fluorescein-markierten Anti-human IgA-Antikörpers gezeigt (s. Abb 4.22).

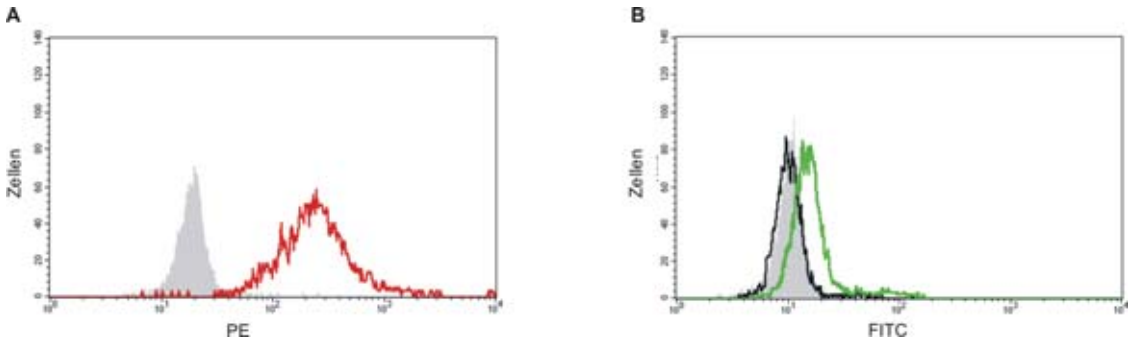


Abb. 4.21 Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis des FcαR auf U937-Zellen und der Bindung des rekombinanten αPhlp5-IgA2-Antikörpers an den Rezeptor.

U937-Zellen wurden mit 20µl des markierten Anti-human CD89-Antikörpers für 1 h inkubiert und in 500 µl 10 %igem FKS gemessen (rot A). Für die Analyse der Bindung des rekombinanten IgA2-Antikörpers an den Rezeptor wurden 1 µg des Antikörpers zu den Zellen gegeben und nach 1 h Inkubation und Waschschritten 0,5 µl des FITC-Konjugats zugegeben (grün B). Zur Kontrolle wurde das FITC-Konjugat mit Zellen ohne IgA2 gemessen (schwarz B).

A: Nachweis des FcαR auf U937-Zellen durch ein Anti-human CD89-PE-Konjugat.

B: Nachweis der Bindung von αPhlp5a-IgA2 an den FcαRI mithilfe eines Anti-human IgA-FITC-Konjugats.

4.2.3 Quervernetzung membranständiger FcεI-Rezeptoren

IgE-Konstrukte sollten einer Analyse ihrer Bindungseigenschaften für den humanen hochaffinen IgE-Rezeptor unterzogen werden. Anhand einer basophilen Ratten-Leukämie-Zelllinie, den sogenannen RBL-Zellen (*Rat Basophilic Leukemia*) kann zusätzlich zur Rezeptorbindung auch die Degranulation bei IgE-Quervernetzung mittels Allergenbindung untersucht werden. Die Zellen wurden durch Transfektion mit dem humanen hochaffinen IgE-Rezeptor Untersuchungen mit humanem IgE zugänglich gemacht. Das Ausmaß der Degranulation wird anhand der Ausschüttung von β-Hexosaminidase die das Substrat pNAG unter Bildung eines kolorimetrisch messbaren Produkts umsetzt, ermittelt. Diese wird mit der Menge an β-Hexosaminidase, die nach Lyse der Zellen freigesetzt wird, prozentual errechnet. Zunächst wurde das System mit einem humanen Myelom-IgE-Antikörper und einem Anti-human IgE-Antikörper als quervernetzen-

dem Agens getestet. Das Ergebnis einer Verdünnungsreihe des IgE-Antikörpers ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

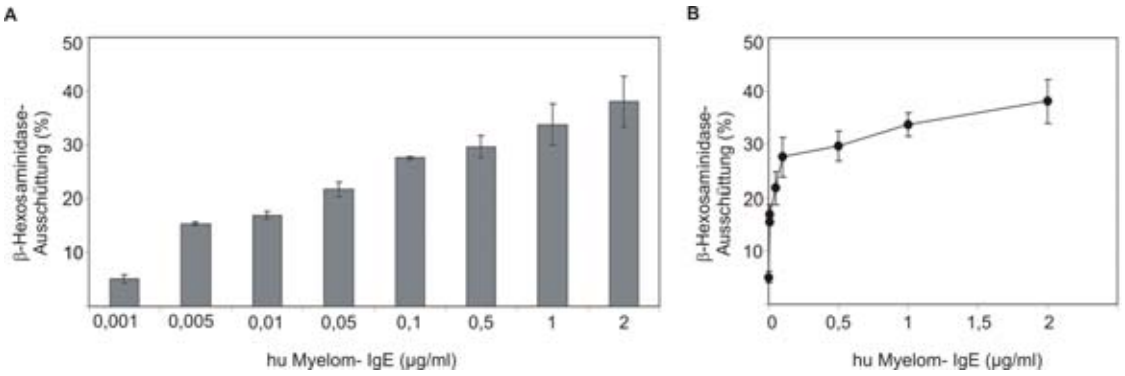


Abb. 4.22 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit humanem Myelom-IgE und Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper.

RBL-SX38 Zellen wurden für 3 h mit humanem IgE belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe eines Anti-human IgE-Antikörpers (1 µg/ml) induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats PNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei steigenden IgE-Konzentrationen.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen die IgE-Konzentration.

Die Messungen zeigten, dass bei IgE-Konzentrationen über 1µg/ml eine Annäherung an den Bereich der Sättigung der Fcε-Rezeptoren auf den Zellen erfolgte. Durch weitere Erhöhung der IgE-Konzentration konnte die Mediatorausschüttung durch die Zellen kaum mehr gesteigert werden. Dieser Wert konnte nun für die folgenden Degranulationsanalysen mit den allergenspezifischen Antikörperkonstrukten verwendet werden.

4.2.3.1 Degranulationsanalysen mit Bet v 1-spezifischen IgE-Konstrukten

Da für den Bet v 1a-spezifischen Selektanden kein heterotetramerer IgE-Antikörper rekombinant generiert werden konnte, wurde hier auf das verkürzte Konstrukt αBet-v1-scFv/IgECH2-4 zurückgegriffen. In einer Konzentrationsreihe wurden die Konzentrationen des IgE-Konstrukts variiert und mit einem Anti-human IgE-Antikörper quervernetzt (s. Abb. 4.23).

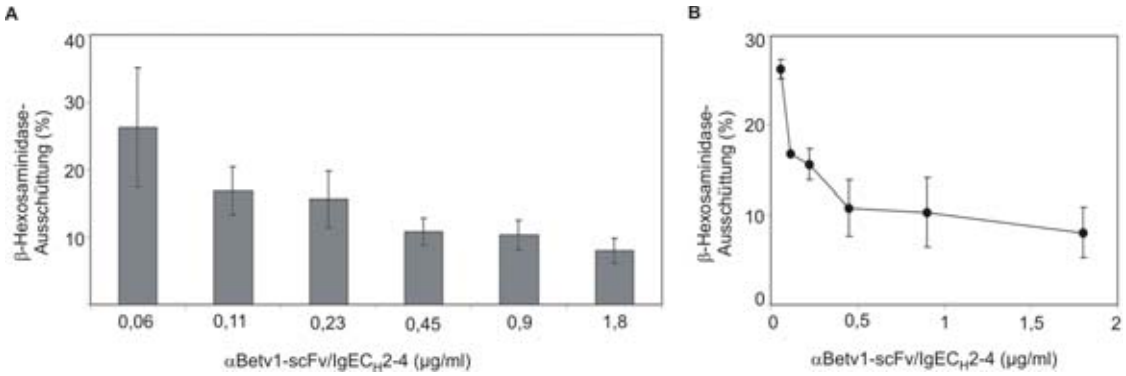


Abb. 4.23 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit αBetv1/scFv-IgEC$_H$2-4 und Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper.

RBL-SX38 Zellen wurden für 3 h mit dem Antikörperkonstrukt belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe eines Anti-human IgE-Antikörpers (1 µg/ml) induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats PNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei steigenden IgE-Konzentrationen.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen die IgE-Konzentration.

Entgegen der Annahme, dass mit steigender Konzentration ein Sättigungseffekt der Rezeptoren eintritt, zeigte dieser Versuch inhibitorische Effekte von hohen IgE-Konzentrationen auf die Degranulation. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob dieser Effekt durch die artifiziellen Konstrukte entsteht, die zur Aggregation neigen und so zu einer Quervernetzung führen könnten. Diese Annahme würde das geringe Signal bei der Zugabe des eigentlichen Quervernetzers erklären. Der Überstand der Zellen wurde hierfür bereits nach Zugabe des IgE-Konstrukts mit dem Substrat inkubiert, um die Ausschüttung von β-Hexosaminidase noch vor der eigentlichen Quervernetzung nachzuweisen. Dieselben Zellen wurden dann mit dem Anti-human IgE-Antikörper inkubiert. Beide Werte wurden mit der restlichen, durch Zelllyse sezernierten, Glucosaminidase prozentual verrechnet.

Wie in Abbildung 4.24 zu sehen ist, schütten die Zellen bereits bei einer Zugabe von 0,1 µg/ml des Konstruktes bis zu 80 % der enthaltenen β-Hexosaminidase aus. Daher ist es wahrscheinlich, dass Aggregate die Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und quervernetzen. Das eigentliche quervernetzende Agens steigert die Degranulation kaum mehr. Um diesen Aggregations-Effekt im weiteren Verlauf zu umgehen, wurde das Bet v 1-spezifische scFv/IgE-Konstrukt in Konzentrationen unter 0.05 µg/ml verwendet.

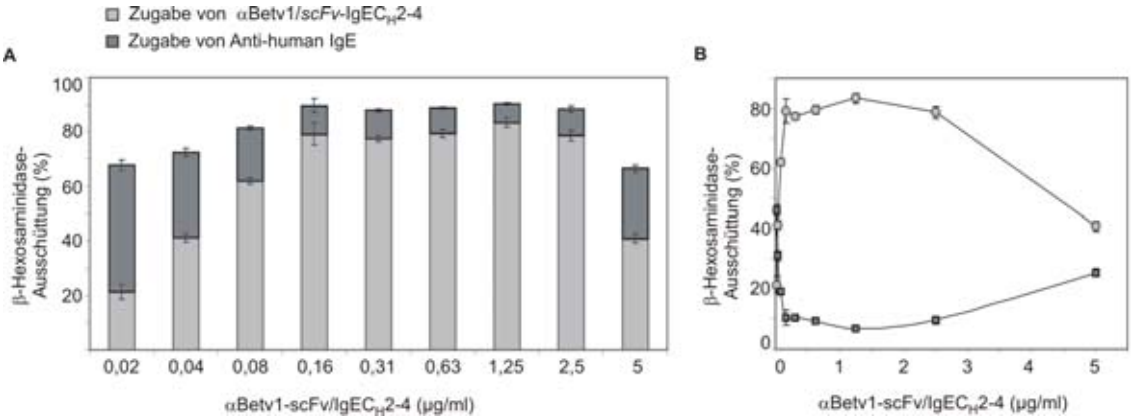


Abb. 4.24 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Aggregation des Konstruktes αBet-v1/scFv-IgEC$_H$2-4 und Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper

RBL-SX38 Zellen wurden für 3 h mit dem Antikörperkonstrukt belegt. Der Kulturüberstand wurde entnommen und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrates PNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe eines Anti-human IgE-Antikörpers (1µg/ml) induziert und abermals die Ausschüttung von β-Hexosaminidase durch die Zellen bestimmt. Beide Werte wurden mit der, durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen. Gezeigt ist die Degranulation nur bei Zugabe des IgE-Konstrukts sowie nach Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei steigenden IgE-Konzentrationen.

B: Graphische Darstellung anhand einer Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen die IgE-Konzentration.

Außerdem wurde zur Kontrolle ein Bet v 1-spezifischer Hybridom-Antikörper, welcher bereits für SPR-Messungen als IgY verwendet wurde, in Form eines heterotetrameren IgE-Antikörpers eingesetzt.(s. Abb. 4.25).

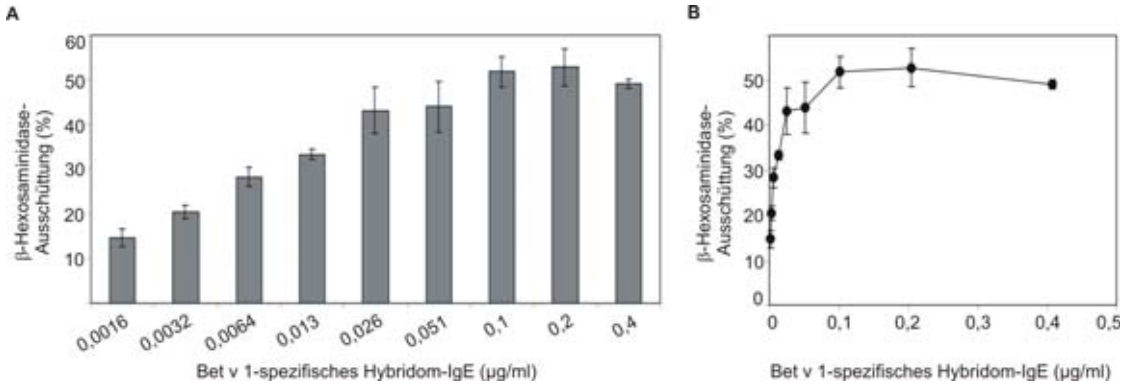


Abb. 4.25 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit einem Bet v 1a-spezifischen Hybridomzell-Antikörper und Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper

RBL-SX38 Zellen wurden für 3 h mit dem Antikörperkonstrukt belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe eines Anti-human IgE-Antikörpers (1 µg/ml) induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats PNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei steigenden IgE-Konzentrationen.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen die IgE-Konzentration.

Eine Konzentration von 0,1 µg/ml reichte hierbei aus, um eine Sättigung der Rezeptoren hervorzurufen.

Da im natürlichen System ein Allergen die Quervernetzung und somit die allergische Reaktion auslöst, wurde für Folgeversuche eine Quervernetzung durch Bet v 1a angestrebt. Da monoklonale Antikörper jedoch nur ein Epitop des Allergens binden, musste das Allergen für eine Quervernetzung der Rezeptoren vorab multimerisiert werden. Dafür wurde Bet v 1a-MBP mithilfe von TFPA-PEG_3-Biotin biotinyliert und an Streptavidin gebunden, das an Magnetpartikel gekoppelt (*Roti-MagBeads)* vorlag. Diese Bet v 1a-beladenen Partikel wurden dann in Konzentrationen von $3x10^8$ zu den zuvor mit einem IgE-Antikörper inkubierten Zellen gegeben. Um nachzuweisen, dass die Partikel an sich keine quervernetzenden Eigenschaften besitzen, wurden nicht-beladene Partikel in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Abbildung 4.26 zeigt die Allergen-Quervernetzung mit dem Antikörper, der einer Hybridomzelllinie entstammte und in Form eines hetereotetrameren IgE-Antikörpers exprimiert wurde. Für den Bet v 1-spezifischen scFv-IgE konnte diese nicht induziert werden.

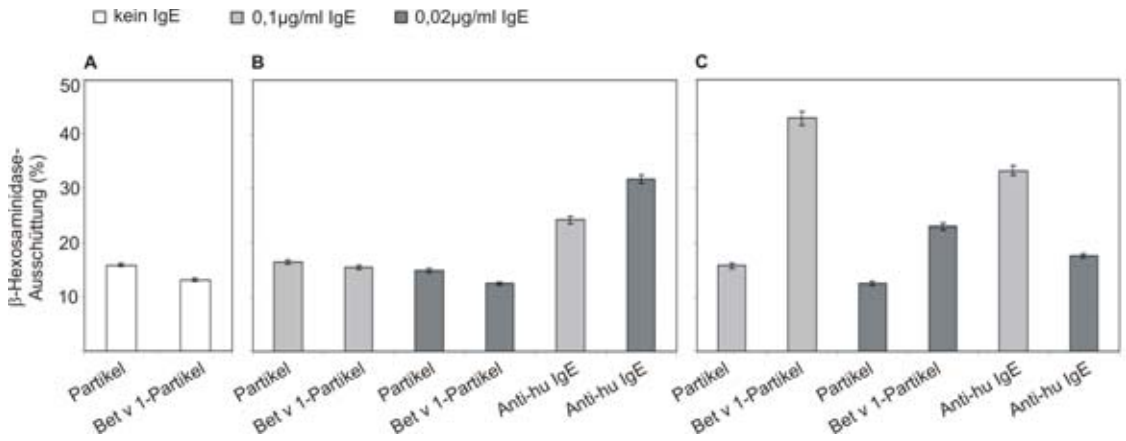


Abb. 4.26 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit unterschiedlichen Bet v 1a- spezifischen Antikörpern und Quervernetzung mit Bet v 1a-MBP Partikeln

RBL-SX38 Zellen wurden für 3 h mit dem jeweiligen Antikörperkonstrukt belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe von 100 µl Bet v 1a-MBP-Partikeln mit einer Konzentration von $3x10^8$ Partikeln/ml, bzw. einem Anti-human IgE-Antikörper induziert. Zur Kontrolle wurden nicht konjugierte Partikel verwendet. Die Ausschüttung der β-Hexosaminidase wurde anhand der Umsetzung des Substrats pNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen ohne IgE-Belegung bei Zugabe von Bet v 1a-MBP-konjugierten und unkonjugierten Partikeln.

B: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei Belegung mit dem αBetv1/scFv-$IgEC_H2$-4-Konstrukt und Zugabe von Bet v 1a-MBP-konjugierten und unkonjugierten Partikeln.

C: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei Belegung mit dem Bet v 1-spezifischen, einer Hybridomlinie abstammenden IgE und Zugabe von Bet v 1a-MBP-konjugierten und unkonjugierten Partikeln.

Somit konnte für die Bet v 1-spezifischen IgE-Konstrukte eine Rezeptorbindung und eine Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper gezeigt werden. Eine Degranulationsinduktion durch Zugabe multimeren Allergens war nicht möglich. Für den humanisierten murinen Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper war dies jedoch möglich und demonstrierte die generelle Durchführbarkeit des Systems.

4.2.3.2 Degranulationsanalysen mit Phl p 5-spezifschen IgE-Konstrukten

Analog zu den Versuchen mit dem Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper sollte nun der Phl p 5-spezifische Antikörper in Degranulationsanalysen auf die Bindung und Querverernetzung des FcεRI hin getestet werden. In einer Titrationskurve konnte eine Konzentrationsabhängigkeit und ein Sättigungseffekt beobachtet werden (s. Abb. 4.27).

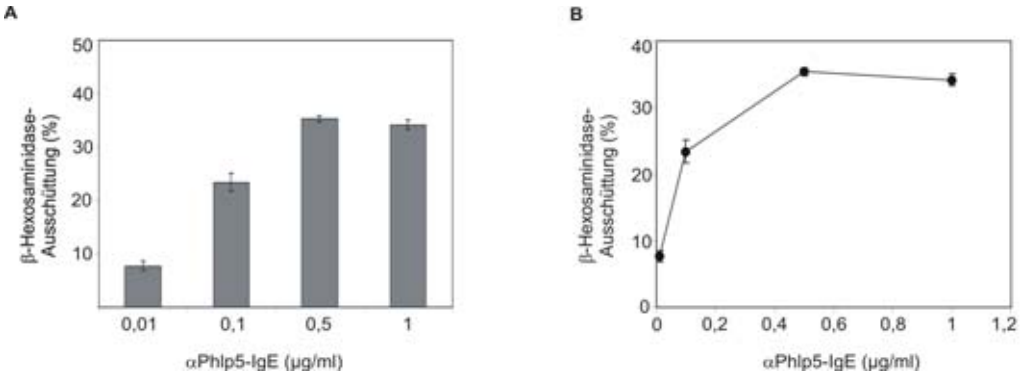


Abb. 4.27 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit αPhlp5-IgE und Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper

RBL-SX38 Zellen wurden für 3 h mit dem rekombinanten IgE belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe eines Anti-human IgE-Antikörpers (1 µg/ml) induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats pNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei steigenden IgE-Konzentrationen.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen die IgE-Konzentration.

Dieser Konzentrationsbereich konnte nun genutzt werden, um eine Allergen-induzierte Quervernetzung der Rezeptoren zu erreichen. Phl p 5a-MBP wurde mithilfe von TFPA-PEG_3-Biotin biotinyliert. Nach Bindung an den Antikörper wurde das Allergen durch Streptavidin multimerisiert. Hierbei war zu beachten, dass ein optimales molares Verhältnis zwischen Phl p 5a-MBP-Biotin und Streptavidin hergestellt werden musste. Ein molarer Überschuss an Streptavidin würde eine geringere Quervernetzung zur Folge haben, da dann lediglich jedes Antikörper-gebundene Allergen ein Streptavidinmolekül binden, jedoch nicht mehr multimerisieren würde. Idealerweise sollte das molare Verhältnis von gebundenem Allergen zum Streptavidin 2:1 betragen. In einer Versuchsrei-

he wurden zwei Konzentrationen des Allergens mit variierenden molaren Verhältnissen von Streptavidin getestet, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Eine Konzentration von 0,1 µg/ml oder 1 µg biotinyliertem Phl p 5a-MBP waren gleichermaßen einsetzbar solange die Zugabe von Steptavidin einem Drittel der Molarität entsprach (s. Abb. 4.28).

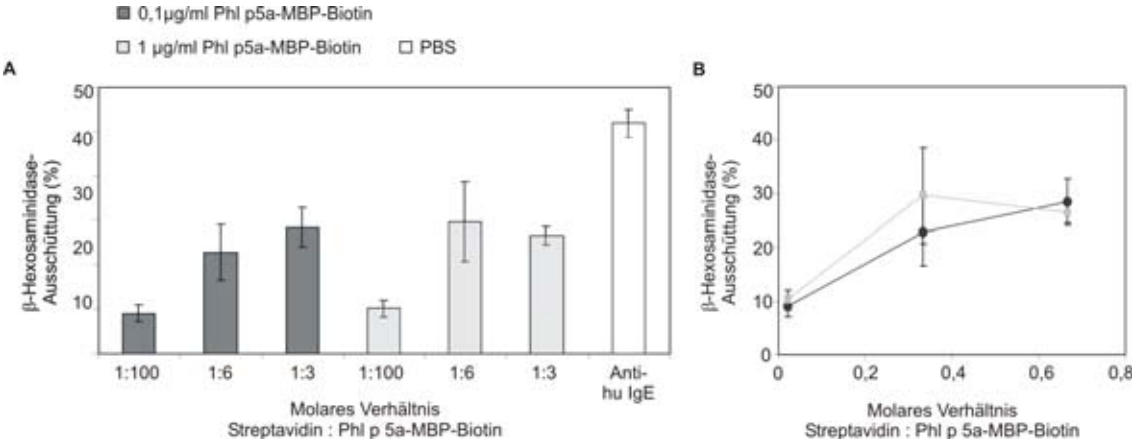


Abb. 4.28 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit αPhlp5-IgE und Quervernetzung mit einem Anti-human IgE-Antikörper

RBL-SX38-Zellen wurden für 3 h mit dem rekombinanten IgE belegt und das Allergen hinzugegeben. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe von Streptavidin induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats pNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Streptavidin zu Phl p 5a-MBP-Biotin.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen das molare Verhältnis von Streptavidin zu Phl p 5a-MBP-Biotin.

Wie bereits in einer ELISA-Analyse gezeigt, bindet der Antikörper selektiv nur an die Isoform a des Allergens Phl p 5. Diese sehr spezifische Reaktivität sollte nun ebenfalls auf Ebene der zellulären Quervernetzung von Rezeptoren gezeigt werden. Um eine Multimerisierung bei IgE-Bindung über Streptavidin zu ermöglichen, wurde Phl p 5b biotinyliert. Die geeignetesten Konzentrationen aus den vorangegangenen Versuchen wurden beibehalten und Degranulationsanalysen mit Phl p 5a und b in Verbindung mit dem αPhlp5-IgE durchgeführt. In diesen Versuchen wurden die IgE-Antikörper mit dem jeweiligen biotiniylierten Allergen vorinkubiert, bevor die Zellen mit dem Komplex beladen wurden. Dadurch ließ sich die Durchführungszeit um eine Stunde verkürzen und bessere Signale erzielen. In Abbildung 4.29 ist deutlich eine Allergen-induzierte Quervernetzung für das Phl p 5a bei Zugabe von Streptavidin zu sehen, die bei Einsatz gleicher Mengen an Phl p 5b und Streptavidin nicht erfolgt.

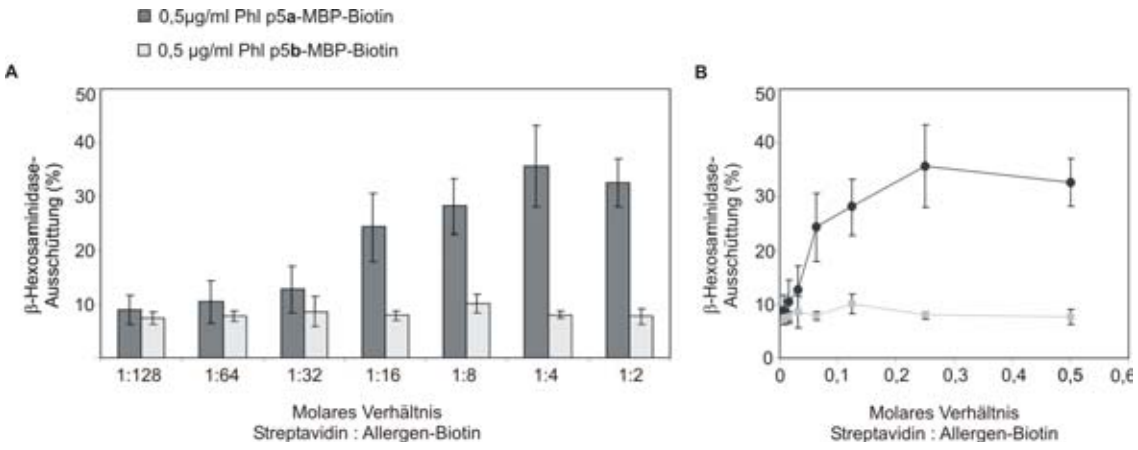


Abb. 4.29 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit αPhlp5-IgE und Phl p 5a/b-MBP-Biotin und Quervernetzung mit Streptavdin.

Rekombinante IgE-Antikörper wurden für 1 h mit den biotinylierten Allergenen Phl p 5a bzw. Phl p 5b inkubiert. RBL-SX38-Zellen wurden für 3 h mit dem Komplex aus Antikörper und Allergen belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe von Streptavidin induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats pNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der, durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Streptavidin zu biotinyliertem Allergen.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen das molare Verhältnis von Streptavidin zu biotinyliertem Allergen.

Natürlicherweise erfolgt eine Belegung von Basophilen und Mastzellen mit einem heterogenen Gemisch polyklonaler IgE-Antikörper. Für eine Quervernetzung ist eine Multimerisierung des Allergens dann nicht nötig. Da im Arbeitskreis eine Phl p 5-spezifische Hybridomzelllinie vorhanden war, deren Antikörper in humanisierter Form als IgE vorlagen, sollten diese genutzt werden, um zusammen mit dem Patienten-abgeleiteten IgE eine Degranulation von RBL-SX38-Zellen bei Zugabe von monomerem Phl p 5a zu induzieren. Vorab wurde die beschriebene Degranulationsanalyse mit dem Hybridomzell-Antikörper wiederholt, die Allergen- und Streptavidinkonzentrationen beibehalten und lediglich der Antikörper ausgetauscht, um auch hier auf eine selektive Unterscheidung zwischen Phl p 5a und b zu testen. Wie in Abbildung 4.31 zu sehen, zeigt dieser Antikörper ebenfalls eine spezifische Reaktivität für die Isoform Phl p 5a und ist in der Lage die Rezeptoren auf der Zelloberfläche bei Multimerisierung mit Streptavidin querzuvernetzen.

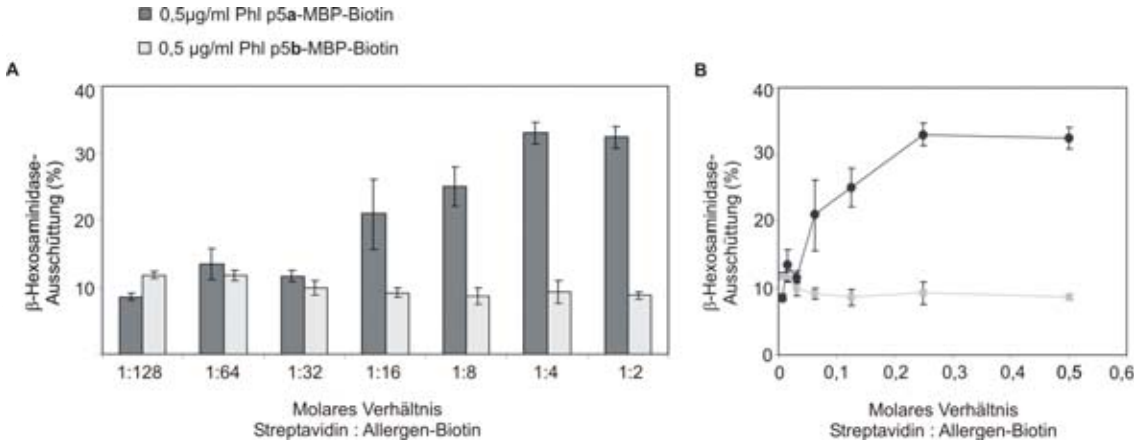


Abb. 4.31: Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit einem Phl p 5a-spezifischen, einer Hybridomzelline abstammendem IgE und Phl p 5a/b-MBP-Biotin und Quervernetzung mit Streptavdin.

Rekombinante IgE-Antikörper wurden für 1 h mit den biotinylierten Allergenen Phl p 5a bzw. Phl p 5b inkubiert. RBL-SX38-Zellen wurden für 3 h mit dem Komplex aus Antikörper und Allergen belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe von Streptavidin induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats pNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der, durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Streptavidin zu biotinyliertem Allergen .

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen das molare Verhältnis von Streptavidin zu biotinyliertem Allergen.

Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den beiden Epitopen um einen überlappenden Molekülbereich handelt, der ausschließlich in der Isoform a des Phl p 5-Allergens vorhanden ist. Für die geplante Degranulationsanalyse mit beiden Antikörpern und monomerem Phl p 5a wurde daher zunächst in einer Sandwich-*EL*ISA-Analyse getestet, ob eine gleichzeitige Bindung beider Antikörper an Phl p 5a möglich ist, sie also unterschiedliche Epitope erkennen. Eine dafür nötige adsorptive Immobilisierung der Antikörper wurde mit dem murinen Konstrukt des Hybridom-Antikörpers durchgeführt, da hier gute Expressionsraten erzielt werden konnten, die bei den humanisierten IgE-Antikörpern gering waren. Zum einen wurde der Antikörper αPhlp5a-IgA2 immobilisiert und nach Zugabe von Phl p 5a die zusätzliche Bindung des murinen IgGs analysiert. Zum anderen wurde in umgekehrter Reihenfolge der murine Hybridomzell-Antikörper immobilisiert und bei Applikation von Phl p 5a auf die gleichzeitige Bindung des αPhlp5a-IgA2-Antikörpers getestet. Wie in Abbildung 4.32 zu erkennen ist, sind die Antigenbindungsstellen beider Phl p 5a-spezifischen Antikörper gleichzeitig zugänglich.

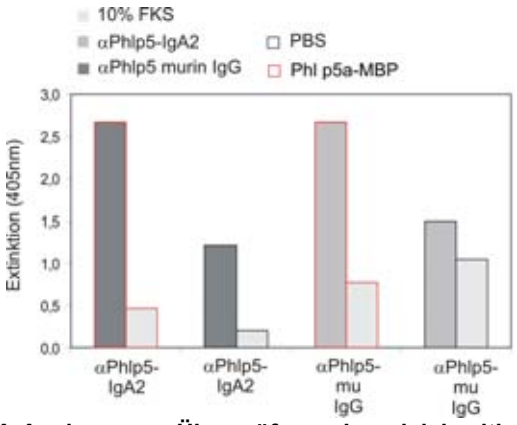


Abb. 4.32 *Sandwich*-ELISA-Analyse zur Überprüfung der gleichzeitigen Bindung des αPhlp5-IgA2-Antikörpers und eines Phl p 5-spezifischen Hybridom-Antikörpers an Phl p 5a-MBP.

Mit 200 µg/ml αPhlp5-IgA2 bzw. dem Phl p 5-spezifischem murinem IgG beschichtete und durch 10 % FKS blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden für 1 h mit 100 µg/ml Phl p 5a-MBP inkubiert. Anschließend wurde der jeweils andere Antikörper zugegeben. Die Detektion durch ein Anti-human IgA-Antikörper-AP-Konjugat (1:2000) bzw. ein Anti-murin-AP-Konjugat (1:10000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

Für die Degranulationsanalyse wurden die Antikörper in einem 1:1-Verhätnis auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden Phl p 5a- und Phl p 5b-MBP in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert (s. Abb. 4.33).

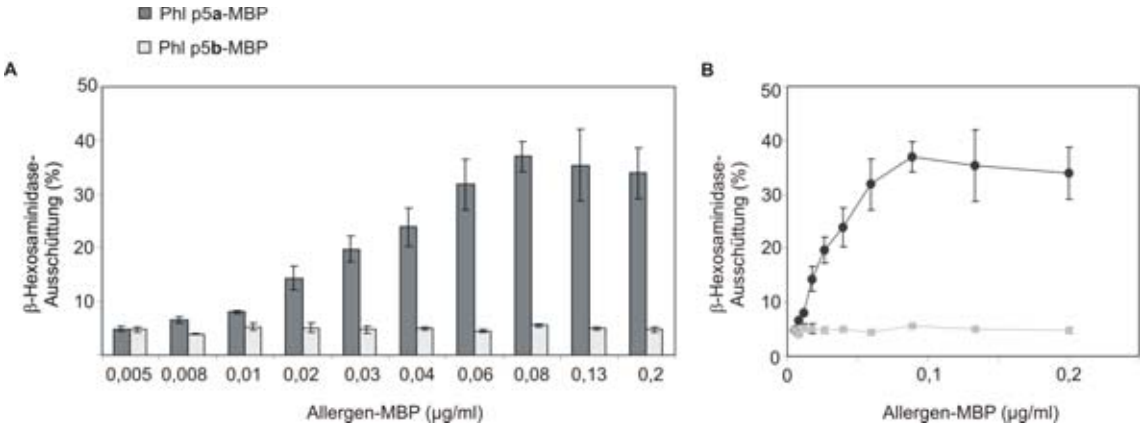


Abb. 4.33 Mediatorausschüttung von RBL-SX38-Zellen bei Belegung mit zwei Phl p 5a-spezifischen IgE-Antikörpern und Quervernetzung mit monovalentem Phl p 5a-MBP und Phl p 5b-MBP.

RBL-SX38-Zellen wurden für 3 h mit den beiden rekombinanten IgE- Antikörpern (0,5 µg/ml) belegt. Die Degranulation der Zellen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der Zellen induziert und die Ausschüttung der β-Hexosaminidase anhand der Umsetzung des Substrats pNAG bei 405 nm photometrisch gemessen. Diese wurde mit der, durch Zelllyse erhaltenen Gesamtmenge an β-Hexosaminidase prozentual verrechnet. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

A: Balkendiagramme der Degranulationsanalysen bei Belegung mit zwei monoklononalen Phl p 5a-spezifischen Antikörpern und Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen Phl p 5a-MBP, bzw Phl p 5b-MBP.

B: Auftragung der β-Hexosaminidase-Ausschüttung gegen die eingesetzte Allergenkonzentration.

Die Degranulationsanalysen mit dem heterotetrameren Phl p 5a-spezifischen rekombinantem Antikörper zeigten somit sowohl Bindung des Antikörpers an den Rezeptor als auch Effektorfunktionen bei Quervernetzung durch multi- und monomeres Allergen.

4.2.4 Selektive Reaktivitäten der Antikörper mit Allergenen

Neben denen, zur Selektion verwendeten Isoformen Bet v 1a und Phl p 5a konnten weitere Allergene rekombinant dargestellt und als MBP-Fusionsproteine exprimiert werden. Hierunter fiel das Apfelallergen Mal d 1, welches ebenfalls zur Familie der PR10-Proteine gehört und für das Bet v 1-reaktive IgE-Antikörper häufig Kreuzreaktivitäten aufweisen. Außerdem konnte im Arbeitskreis durch reverse Transkription der mRNA, die aus Birkenblättern isoliert wurde, ein cDNA-Transkript einer Bet v 1-Isoform isoliert werden. Diese wies zwar eine große Homologie mit den bekannten Isoformen m und n auf, konnte jedoch keiner von beiden direkt zugeordnet werden. Die DNA-Sequenz dieser, im weiteren Verlauf der Arbeit als Bet v 1iso bezeichneten Isoform lag im Expressionsvektor des pMal-c2X vor. Aminosäureaustausche durch Punktmutationen konnten zum Erhalt der Isoform Bet v 1a führen. Die zweite Isoform des Wiesenlieschgras-Allergens Phl p 5b lag, genau wie Phl p 5a, im Expressionsvektor pMAL-c2X vor. Die Fusionierung der Allergene mit MBP führte zu hohen Expressionsraten in *E. coli*-Zellen und große Mengen löslichen Proteins konnten in einer Einschritt-Reinigung mittels Affinitätschromatographie durch Bindung an eine Amylose-Matrix erhalten werden. Mithilfe einer ELISA-Analyse wurde festgestellt, mit welchen Allergenen die dargestellten Antikörper wechselwirkten. Zur Kontrolle der Funktionalität und Menge immobilisierter Allergene wurden zusätzlich die humanisierten IgE-Antikörper verwendet, deren variable Domänen einer Bet v 1a- bzw. Phl p 5a-spezifischen Hybridomzelllinie entstammten, sowie ein Anti-MBP-Antikörper, der ebenfalls im Arbeitskreis selektiert wurde. Um eine unspezifische Bindung an das Fusionsprotein MBP auszuschließen wurde dies ebenfalls in einer *E. coli*-basierter Expression und anschließender Reinigung mittels Amylose gewonnen. Die ELISA-Analyse zeigte, dass sowohl der Bet v 1-spezifische als auch der Phl p 5-spezifische Antikörper nur die Isoform a ihres jeweiligen Allergens erkennen. Die erwartete Kreuzreaktivität mit Mal d 1 war im Falle des Bet v 1-spezifischen Antikörpers nicht zu verzeichnens (s.Abb. 4.34).

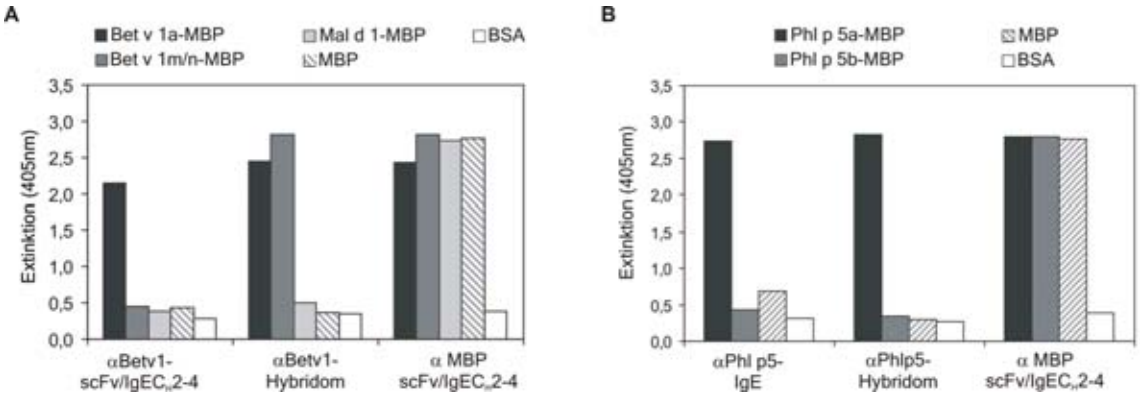


Abb. 4.34 ELISA-Analysen der Reaktivitäten selektierter Antikörper

Mit den Allergenen beschichtete und durch 4 % BSA blockierte Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden ÜN mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion durch einen Anti-human IgE-Antikörper (1:1000) erfolgte mittels PNPP und die Absorbtion wurde im Photometer bei 405 nm gemessen.

A: Kulturüberstände enthalten Bet v 1-spezifische Antikörperkonstrukte. Die Isoform Bet v 1iso wurde aus cDNA isoliert und stellt eine Zwischenform der Isoformen m und n dar.

B: Kulturüberstände enthalten Phl p 5-spezifsche Antikörperkonstrukte.

Diese selektiven Bindungseigenschaften wurden im weiteren Verlauf der Arbeit genutzt, um die Epitope der Allergene näher zu definieren.

4.2.5 Epitopcharakterisierungen

Die analysierten selektiven Bindungen der dargestellten Antikörper an die Isoformen Bet v 1a und Phl p 5a beinhalteten die Möglichkeit, die an der Bindung beteiligten Aminosäuren mithilfe von Sequenz-und Strukturvergleichen beider Isoformen zu identifizieren.

4.2.5.1 Bet v 1a-Epitopcharakterisierung

In Abbildung 4.35 ist ein Sequenz-Abgleich der beiden vorliegenden Isoformen Bet v 1a und Bet v 1iso gezeigt. Unterschiedliche Aminosäuren sind farbig markiert und die Proteinstruktur des Bet v 1a, welche durch Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie gelöst werden konnte, ist gezeigt (PDB 1BV1). Die Komposition der strukturellen Elemente besteht aus einem 7-strängigen antiparallelen β-Faltblatt und einer langen C-terminalen α-Helix, die von zwei kurzen, V-förmig angeordneten N-terminalen α-Helices umrahmt wird, was eine typischen Faltungstopologie der PR-10 Proteine darstellt. Der Sequenzvergleich zeigte, dass abweichende Aminosäuren in der gesamten Sequenz vorhanden waren, wobei im C-terminalen Bereich eine Anhäufung der Variationen beobachtet werden konnte. Die Allergene wurden, wie in Kapitel

3.2.2.1 beschrieben, als MBP-Fusionskonstrukte exprimiert und die Zelllysate induzierter *E.coli*-Zellen verwendet, um nach einer SDS-PAGE-Analyse einen Immunblot mit dem Bet v 1-spezifischen IgG-Antikörper durchzuführen. Zur Kontrolle wurde ein Immunblot mit einem His-tag-spezifischen Antikörper durchgeführt, der eine Expression beider Isoformen sicherstellen sollte. Die Ergebnisse konnten die im vorherigen Kapitel beobachtete selektive Bindung des Antikörpers an Bet v 1a, nicht jedoch Bet v 1iso, reproduzieren.

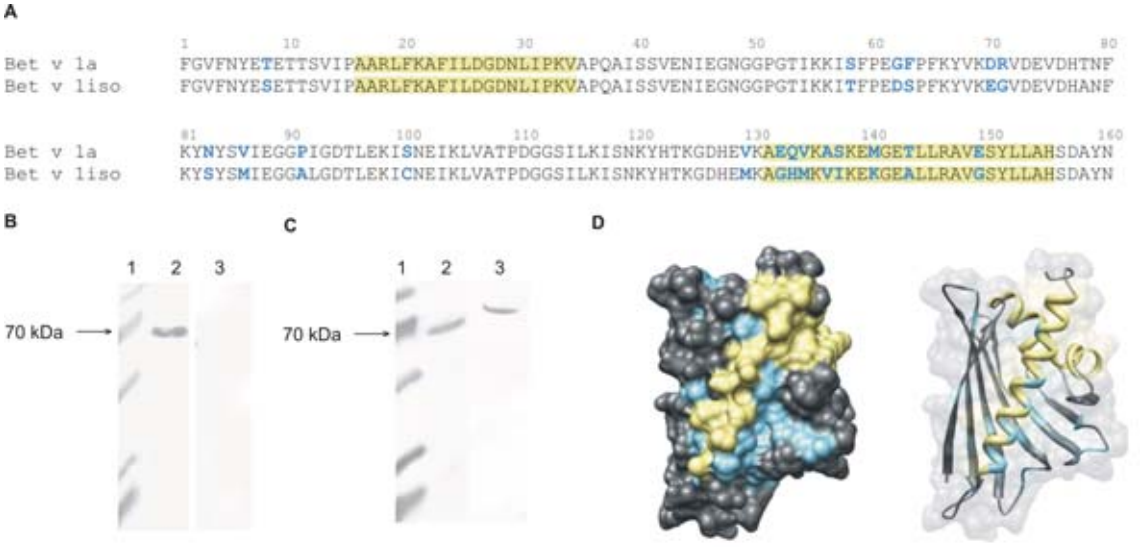


Abb. 4.35: Vergleich der Aminosäuresequenz von Bet v 1a und Bet v 1iso sowie der Reaktivität mit dem Antikörper αBetv1-IgG1.

A: Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Isoformen. Die α-helikalen Strukturen sind gelb hinterlegt, Aminosäuren, die sich in den beiden Isoformen unterscheiden sind blau.

B,C: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5 %igen Acrylamidgel unterzogen. Anschließend wurden Immunblots der Isoformen mit Kulturüberstand des αBetv1-IgG1-Antikörpers (B) und einem Anti-His Antikörper (1:5000) (C) durchgeführt. Die Detektion erfolgte für B mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper (1:20000) und für C einem AP-konjugiertem Anti-murin Antikörper (1:10000) und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Bet v 1a-MBP, Bahn 3: Zelllysat Bet v 1iso-MBP.

D: Proteinstruktur des Bet v 1a. Links: Oberflächenmodell, rechts: Sekundärstrukturelemente. α-Helices sind gelb Aminosäurereste, die in beiden Isoformen variieren, blau gekennzeichnet.

Immunisierungen von Mäusen mit unterschiedlichen Bet v 1-Peptiden konnten diesen C-terminalen, α-helikalen Bereich als immundominantes Peptid nachweisen (Bauer *et al*. 1997; Hufnagl *et al.* 2005). Aufgrund dieser Kenntnisse und der Anhäufung abweichender Aminosäuren in diesem Abschnitt, wurde nun schrittweise eine Verkürzung des Moleküls vom N-Terminus her vorgenommen und die vier verkürzten Fragmente Bet v 1a-ad58, -ad91, -ad110 und -ad124 generiert. Anschließend wurden die so entstandenen Fragmente auf ihre Reaktivitäten mit dem Antikörper hin analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das stark verkürztes Fragment Bet v 1a ad124, welches lediglich aus dem Strukturelement der C-terminalen α-Helix und einigen Amino-

säureresten der vorgelagerten Schleife bestand, in Immunblot-Analysen von dem Antikörper gebunden wurde (s. Abb. 4.36). Aminosäurereste in diesem epitopbildenen Bereich, die sich von der reaktiven Isoform Bet v 1a zu der nicht-reaktiven Isoform Bet v 1iso unterscheiden, sind Val129, Glu132, Gln133, Val134, Ala136, Ser137, Met140, Thr143 und Glu149.

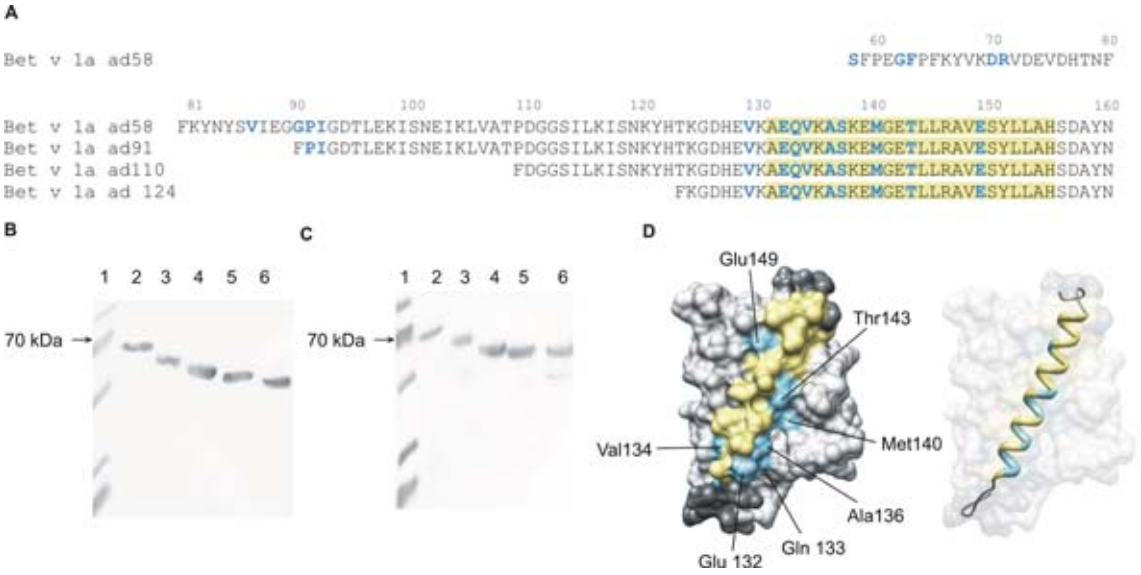


Abb. 4.36 Aminosäuresequenzen N-terminal verkürzter Fragmente des Bet v 1a und Reaktivität mit dem Antikörper αBetv1-IgG1.

A: Aminosäuresequenzen N-terminal verkürzter Bet v 1a-Fragmente. Die α-helikalen Strukturen sind gelb hinterlegt, Aminosäuren, die sich zu der unreaktiven Isoform Bet v 1iso unterscheiden und somit maßgeblich am Epitop beteiligt sein müssen sind blau gekennzeichnet.

B, C: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5%igen Acrylamidgel unterzogen. Anschließend wurden Immunblots der Isoformen mit Kulturüberstand des αBetv1-IgG1-Antikörpers (B) und einem Anti-His-Antikörper (1:5000) (C) durchgeführt. Die Detektion erfolgte für B mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG Antikörper (1:20000) und für C einem AP-konjugiertem Anti-murin-Antikörper (1:10000) und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Bet v 1a-MBP, Bahn 3: Zelllysat Bet v 1a ad58-MBP, Bahn 4: Zelllysat Bet v 1a ad91MBP, Bahn 5: Zelllysat Bet v 1a ad110-MBP, Bahn 6: Zelllysat Bet v 1a ad124-MBP

D: Proteinstruktur des Bet v 1a. Links: Oberflächenmodell, rechts: Sekundärstrukturelemente des kleinsten reaktiven Fragments Bet v 1ad124. Die C-terminale a-Helix ist gelb dargestellt. Aminosäuren, die sich zu der unreaktiven Isoform Bet v 1iso unterscheiden und maßgeblich am Epitop beteiligt sein könnten sind blau gekennzeichnet.

Die Darstellung der elektrostatischen Potentiale auf der Molekülоberfläche, sowie der superfiziellen Hydrophibizität beider Aminosäuren sind in Abbildung 4.42 dargestellt. Anhand dieser Ansicht rücken vier Aminosäuren in den näheren Fokus für eine Beteiligung am Epitop, darunter das Glu132, dessen negative Ladungseigenschaft im Gly132 des Bet v 1iso nicht mehr vorhanden ist und das Ala136 welches im Bet v 1iso durch ein stark hydrophobes Valin ausgetauscht ist. Das leicht hydrophobe Met140 wird durch einen basischen Lysinrest ersetzt. Am augenscheinlichsten ist jedoch die Änderung der Oberflächeneigenschaften an Position 149. Hier erfolgt ein Austausch von

Glutaminsäure zu Glycin, wodurch eine sterische anspruchsvolle Strukturerhebung mit negativem elektrostatischem Potential verloren geht.

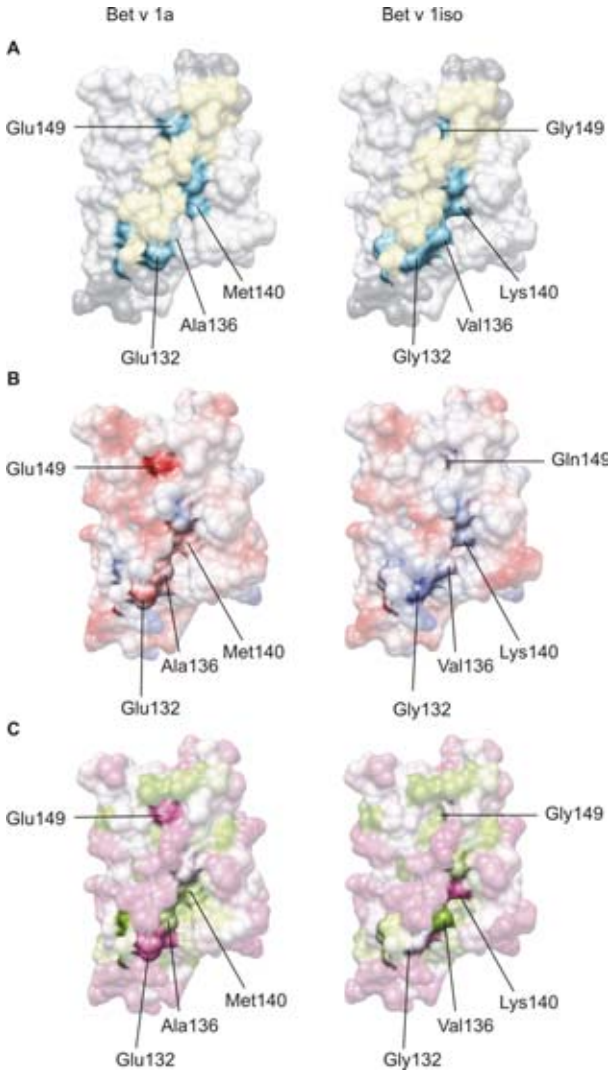


Abb. 4.37 Hervorhebung abweichender Aminosäuren der Isoformen Bet v 1a und Bet v 1iso in der C- terminalen α-Helix.

Halbtransparent dargestellt sind die Proteinstrukturen des Bet v 1a und des Bet v 1iso. Vollfarbig hervorgehoben sind Aminosäuren, die sich zum einen in der C-terminalen α-Helix befinden, zum anderen aber auch in den beiden Isoformen voneinander abweichen. Sie könnten maßgeblich am Epitop beteiligt sein. Zur Beurteilung der damit verbundenen Änderungen auf der Molekülоberfläche sind die Strukturen nach unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäuren koloriert. Aminosäuren, die eine veränderte Eigenschaft auf der Oberfläche hervorrufen, sind beschriftet.

A: Die C-terminale α-Helix ist gelb und halbtransparent dargestellt, abweichende Aminosäuren sind blau hervorgehoben.

B: Aminosäuren sind nach ihrem elektrostatischem Potential eingefärbt, negativ-geladene Bereiche sind rot, positiv-geladene blau eingefärbt.

C: Aminosäuren sind nach ihrer Hydrophibizität koloriert: hydrophobe Bereiche sind grün, hydrophile magenta eingefärbt.

Um den Einfluss des Glu149 an der Bindung des Antikörpers zu testen, wurde sowohl im vollständigen Protein Bet v 1a-MBP ein einzelner Aminosäureaustausch von Glu149 zu Gln149 durchgeführt, als auch im Fragment der Aminosäurereste 124-160 der

C-terminalen α-Helix. Die Mutationen wurden mithilfe entsprechender Oligonukleotide eingefügt und die entstehenden Konstrukte in den Vektor pMal-c2X insertiert. Anschließend wurde die Reaktivität dieser Konstrukte mit dem Antikörper in einem Immunblot getestet, mit dem Ergebnis, dass durch die Mutation von Glu149 zu Gly149 die Reaktivität des Bet v 1 mit dem Antikörper aufgehoben wurde (s. Abb. 4.38). Es konnte somit gezeigt werden, dass in diesem Fall die Bindung zwischen Antigen und Antikörper von einem einzelnen Aminosäurerest abhängt.

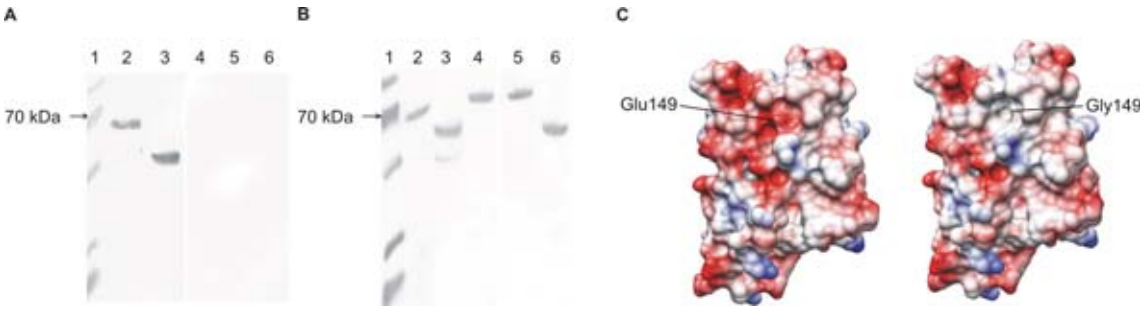


Abb. 4.38 Reaktivitätsverlust des Antikörpers αBetv1-IgG1 bei Austausch von Glutaminsäure 149 zu Glycin im Bet v1 a.

A, B: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5%igen Acrylamidgelen unterzogen. Anschließend wurden Immunblots der Konstrukte mit Kulturüberstand des αBetv1gG1-Antikörpers (A) und einem murinen Anti-His-Antikörper (1:5000) (B) durchgeführt. Die Detektion erfolgte für A mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper (1:20000), für B mit einem Anti-murin-Antikörper (1:10000) und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Bet v 1a-MBP, Bahn 3: Zelllysat Bet v 1a ad124-MBP, Bahn 4: Zelllysat Bet v 1iso-MBP, Bahn 5: Zelllysat Bet v 1aE/G149-MBP, Bahn 6: Zelllysat Bet v 1a ad124E/G149-MBP.

C: Tertiärstrukturen mit elektrostatischem Oberflächenpotential des Bet v 1a (links) und des Allergens mit dem Austausch von Glutaminsäure zu Glycin an Position 149 (rechts). Negative Ladungen sind rot (saure Aminosäure-Seitenketten) und positive blau (basische Aminosöure-Seitenketten) markiert.

Das Apfel-Allergen Mal d 1, ein weiteres PR10-Protein, wurde ebenfalls auf seine Reaktivität mit dem Antikörper hin getestet sowie die Oberflächenstruktur im Bereich des Bet v 1a-Epitops charakterisiert. Die Klonierung eines Expressionsvektors für die prokaryotische Expression des Mal d 1-MBP-Fusionskonstruktes wurde im Arbeitskreis mithilfe des Vektors pMAL-c2X durchgeführt. Die Reaktivitätsanalyse mit dem Bet v 1a-spezifischen Antikörper erfolgte anhand eines Immunblots mit Zelllysaten und zeigte, dass der Antikörper αBetv1-IgG1 keine spezifische Bindung mit dem zu 57% homologen Mal d 1 eingeht (Abbildung 4.39). Eine Betrachtung der Proteinstrukturen zeigte eine ganz ähnliche Faltungstopologie des Bet v 1-Allergens. Es wurde dann versucht, die Reaktivität des Antikörpers mit Mal d 1 zu induzieren, indem der Teilbereich der Aminosäurereste 126-160 auf das nicht-reaktive Mal d 1-Molekül transferiert wurde. Eine Klonierung mithilfe geeigneter Oligonukleotide führte zur Konstruktion eines pMalc2x-Expressionsvektors und es konnte ein Immunblot mit Zelllysaten induzierter

Zellen und dem Antikörper durchgeführt werden. In diesem zeigte sich die Induktion einer Affinität zu dem chimären Konstrukt Mal d 1/ad126 Bet v 1 (s. Abb. 4.39).

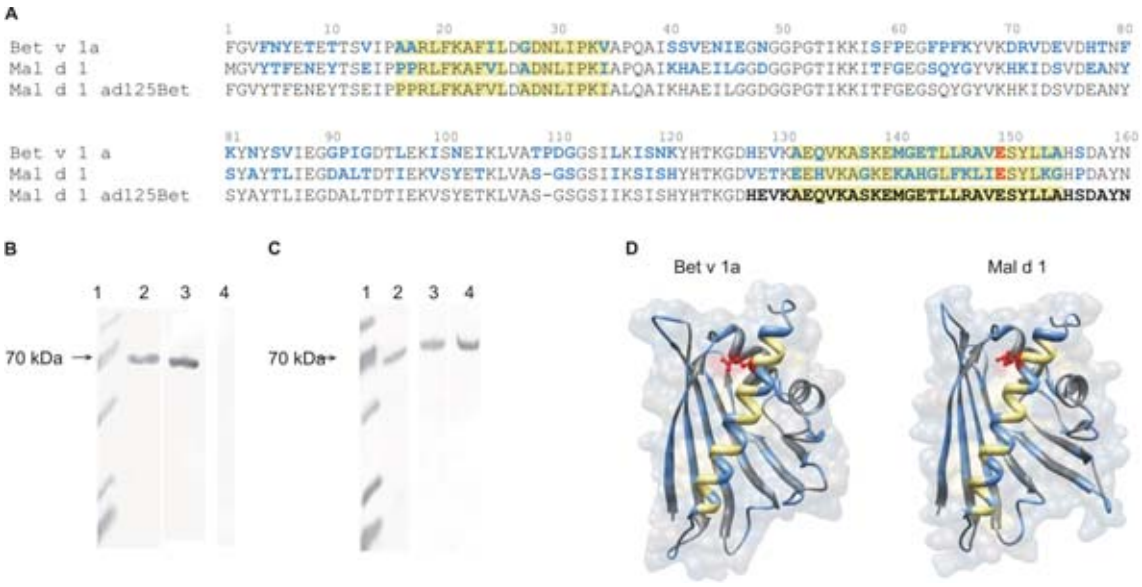


Abb. 4.39 Aminosäuresequenzen des Bet v 1a, des Mal d 1 sowie des chimären Allergens Mal d 1/ad126Bet v 1 und Reaktivität mit dem Antikörper αBetv1-IgG1.

A: Aminosäuresequenzen N-terminal verkürzter Bet v 1a-Fragmente. Die α-helikalen Strukturen sind gelb hinterlegt, Aminosäuren in den beiden Allergenen unterscheiden sind blau markiert und die Glutaminsäure 149 ist rot markiert. Transferierte Aminosäuren sind im chimären Protein fett gekennzeichnet.

B, C: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5 %igem Acrylamidgel unterzogen. Anschließend wurden Immunblots beider Allergene sowie des chimären Konstrukts mit Kulturüberstand des αBetv1-IgG1-Antikörpers (B) und einem murinen Anti-His-Antikörper (1:5000) durchgeführt Die Detektion erfolgte für B mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper (1:20000), für C mit einem Anti-murin-Antikörper (1:10000) und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Bet v 1a-MBP, Bahn 3: Zelllysat Mal d 1/ad126 Bet v 1, Bahn 4: Zelllysat Mal d 1-MBP.

D: Proteinstruktur des Bet v 1a (links) und Mal d 1 (rechts). Die C-terminale α-Helix ist gelb dargestellt. Aminosäuren, die sich in beiden Allergenen unterscheiden, sind blau markiertund die Glutaminsäure 149 ist rot markiert.

Eine Betrachtung der Ladungsverteilung auf den Molekülоberflächen zeigt eine Destruktion des Epitops um die Glutaminsäure 149 im Mal d 1, welches im chimären Konstrukt wiederhergestellt ist (s. Abb. 4.40). Das für die Bindung des Antikörpers essentielle Glu149 hat im Mal d 1 eine Ausrichtung ins Molekülinnere und wird teilweise von umliegenden Resten verdeckt. Dadurch kommt es nicht zur negativen Ladungsverteilung auf der Oberfläche in diesem Bereich. Zusätzliche Lysine in der Aminosäuresequenz des Mal d 1 führen insgesamt zu einer diagonal verlaufenden positiven Elektrostatik, die auf der Oberfläche des Bet v 1a nicht vorhanden ist. Dies könnte die Bindung des Antikörpers ebenfalls beeinflussen. Ein Transfer der Reste 126-160 von Bet v 1 auf Mal d 1 führte zu einer Restauration des negativen elektrostatischen

Potentials auf der Oberfläche, was durch das zusätzliche Glu13 des Apfel-Allergens verstärkt wird.

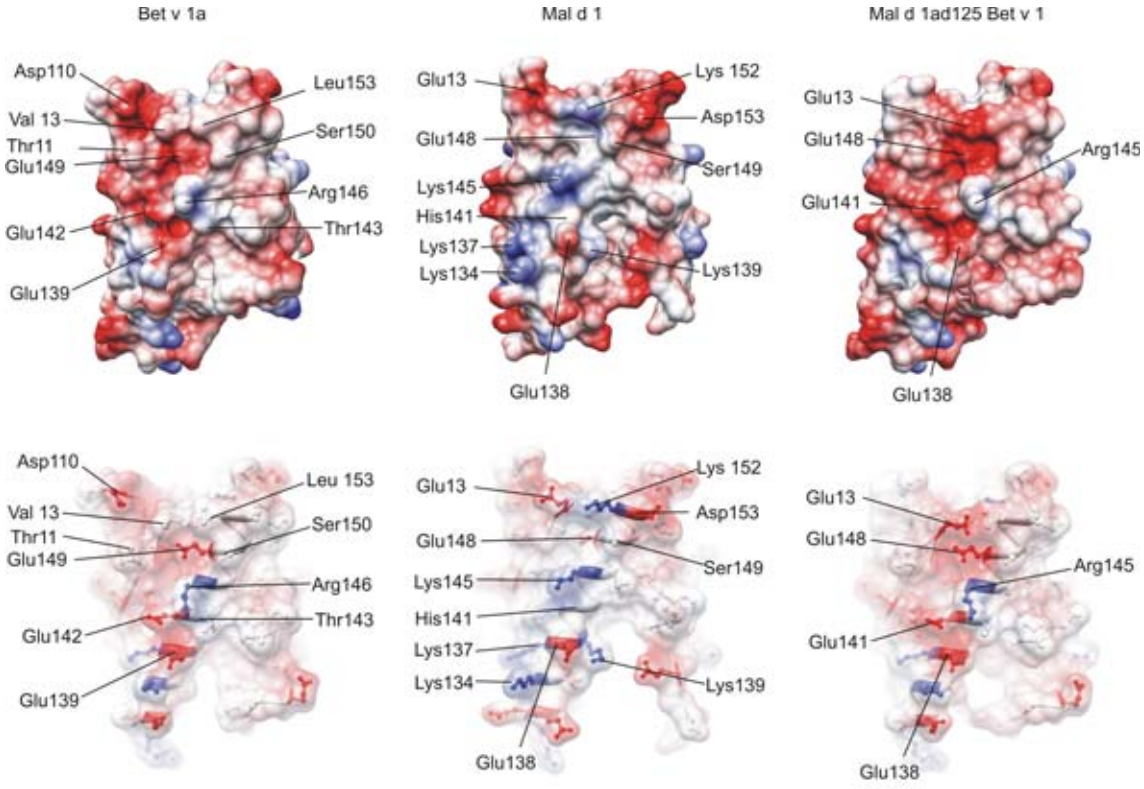


Abb. 4.40 Epitopbereich des humanen αBetv1-Antikörpers in der C-terminalen α-Helix der Allergene Bet v 1a, Mal d 1 sowie eines chimären Konstruktes.

Dargestellt ist die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der drei Allergene, von dem das Bet v 1a und das Mal d 1ad126Bet v 1 von dem Antikörper gebunden werden, das Mal d1 jedoch nicht. Negative Ladungen sind rot (saure Aminosäure-Seitenketten) und positive blau (basische Aminosöure-Seitenketten) markiert. Im unteren Bildabschnitt wurde nur die oberste Ebene der Molekülоberfläche halbtransparent dargestellt, sodass Sekundärstrukturen und die Ausrichtung einzelner Aminosäurereste sichtbar werden.

4.2.6 Phl p 5a-Epitopcharakterisierung

In analoger Vorgehensweise zur Charakterisierung des Bet v 1-Epitops wurde nun die Bindungsstelle des Phl p 5a-spezifischen Antikörperfragments analysiert. Auch hier diente die selektive Erkennung der Isoform Phl p 5a im Gegensatz zu Phl p 5b als Grundlage zur Identifizierung essentieller, am Epitop beteiligter, Aminosäuren. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Isoformen zeigte eine hohe Übereinstimmung im C-terminalen Bereich, wohingegen der N-Terminus deutliche Unterschiede aufwies (s. Abb. 4.43).

Ein strukturelles Merkmal des Allergens ist die Anordnung zu zwei Bündeln von je 4 αHelices. Hierbei wird ein je Bündel aus N-terminalen und ein Bündel aus C-terminalen Aminosäureresten gebildet. Bereits 1996 konnte eine autokatalytische Spaltung zwischen diesen beiden abgegrenzten Bereichen im Phl p 5b beobachtet werden (Bufe *et al.*1996). Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einem Immunblot mit dem Antikörper αPhlp5-IgG4 unterzogen. Zur Kontrolle wurden Immunblots mit einem, im Arbeitskreis selektierten, Anti-MBP-Antikörper durchgeführt, um die eine Expression aller Proteine zu nachzuweisen.

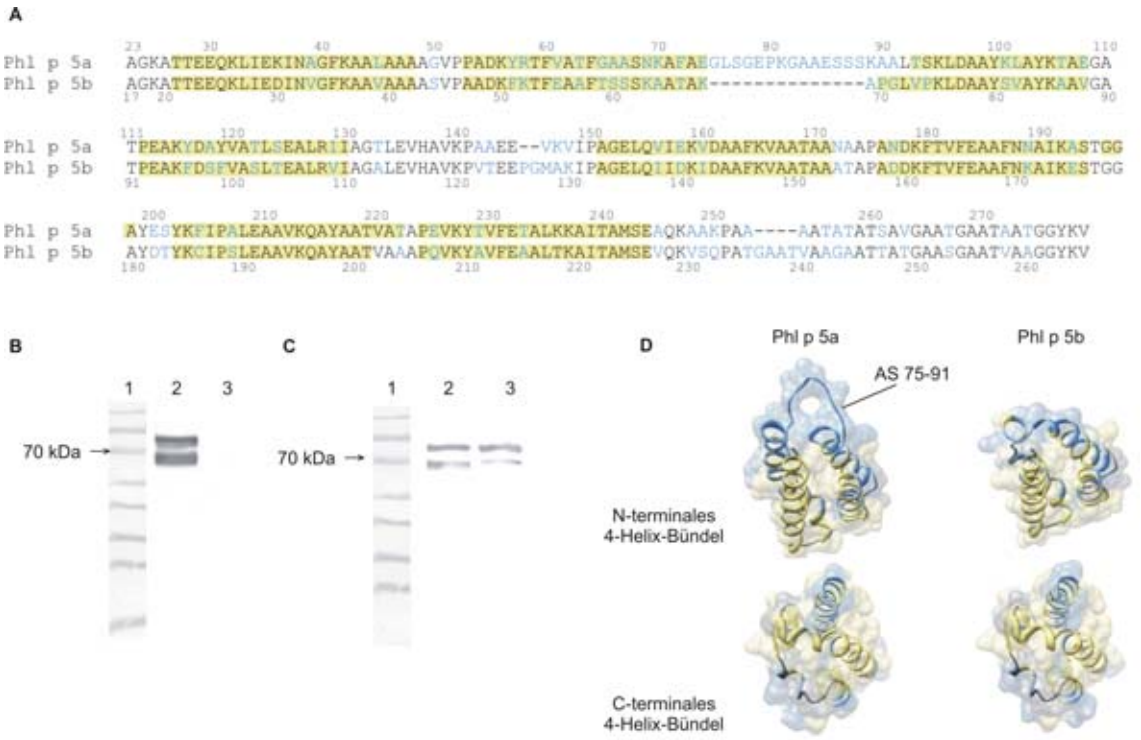


Abb. 4.41 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Phl p 5a und Phl p 5b, sowie der Reaktivität mit dem Antikörper αPhlp5-IgG.

A: Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Isoformen. Die α-helikalen Strukturen sind gelb hinterlegt, Aminosäuren, die sich in den beiden Isoformen unterscheiden blau gekennzeichnet.

B,C: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5 %igen Acrylamidgel unterzogen. Anschließend wurden Immunblots der Isoformen mit Kulturüberstand des αPhl p 5-IgG4-Antikörpers (**B**) und einem Anti-CBD-Antikörper (**C**) durchgeführt. Die Detektion erfolgte für B mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper (1:20000), für C mit einem AP-konjugiertem Anti-murin -Antikörper und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Phl p 5a-MBP, Bahn 3: Zelllysat Phl p 5b-MBP.

D: Proteinstrukturmodellierung der Isoformen Phl p 5a und b. Oberflächen sind halbtransparent dargestellt und durch Sekundärstrukturelemente überlagert. α-Helices sind gelb, Aminosäurereste, die in beiden Isoformen variieren blau gekennzeichnet.

Eine Proteinstrukturmodellierung erfolgte für das N-terminale 4-Helix Bündel durch Phl p 6 als Vorlage (PDB 1NLX) und für das C-terminale 4-Helix-Bündel anhand der vorhandenen Kristallstruktur (PDB 1L3P).

Auffällig in dem Aminosäuresequenz-Abgleich beider Isoformen sind Deletionen des Phl p 5b im Bereich der zweiten und dritten α-Helix. Die Strukturmodellierung zeigt, dass in der Isoform Phl p 5a hier eine ausgedehnte Schleife als verbindendes Element zwischen den beiden α-Helices ausladend aus dem ansonsten globulären Protein herausragt (s. Abb. 4.41 D). Aufgrund dieser starken Abgrenzung von N- und C-Termini und der großen Aminosäureabweichung in diesem Bereich, wurde als nächstes untersucht, ob ein Fragment, welches lediglich das N-terminale 4-Helix-Bündel des Phl p 5a umfasste, vom Antikörper gebunden wurde und somit das Epitop beinhaltete. Weitere verkürzte Fragmente, die den Stellenwert der Schleifen- oder „*loop"*-Region aufklären sollten, wurden kloniert und exprimiert,. Hierfür wurde das N-terminale 4-Helix-Bündel um je eine α-Helix vom N- und vom C-Terminus her verkürzt. Die Klonierung verkürzter Varianten erfolgte mithilfe des Vektors pTXB1 und führte zur Expression von vier verkürzten CBD-Fusionskonstrukten in *E. coli*-BL21-Stämmen. Immunblots wurden wie zuvor mit Zelllysaten induzierter Zellen und dem Antikörper αPhlp5-IgG4 durchgeführt. Positivkontrollen für die Expression wurden für CBD-Fusionsproteine mit einem Anti-CBD-Antikörper durchgeführt (s. Abb.4.42).

Die Fragmente 1-3 wurden von dem Phl p 5-spezifischen Antikörper gebunden. Die Annahme dass es sich beim Epitop um Aminosäurereste der *loop*-Struktur handelt wurde daher mit diesem Versuch bestätigt. Fragment 4, bei dem die Struktur vorhanden, jedoch die dritte Helix unterbrochen war, zeigte keine Reaktivivät mehr mit dem Antikörper. Die Strukturmodellierung zeigt hier die Ausbildung eines *loops* an, es ist jedoch fraglich ob durch die stark verkürzte dritte α-Helix eine ausreichende Stabilität gegeben ist um das Strukturelement tatsächlich auszubilden.

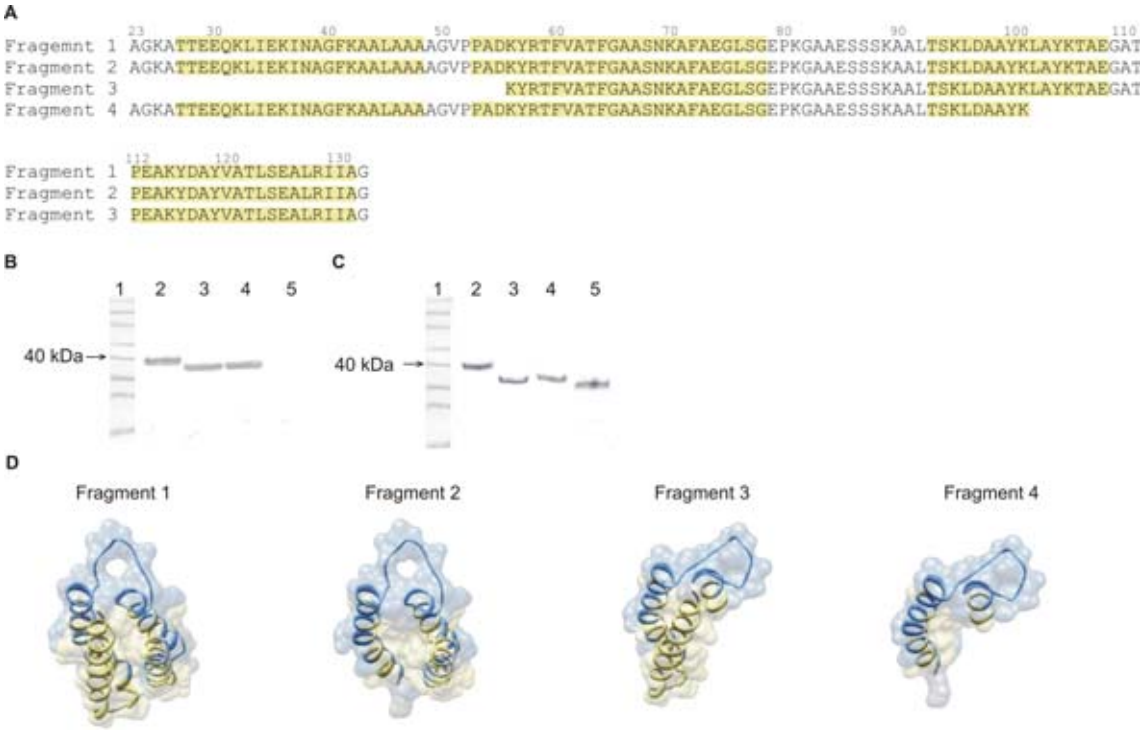


Abb. 4.42 Aminosäuresequenzen verkürzter Fragmente des Phl p 5a und Reaktivität mit dem Antikörper αPhl p 5-IgG4.

A: Vergleich der Aminosäuresequenzen der verkürzter Fragmente. Die α-helikalen Strukturen sind gelb hinterlegt

B, C: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5 %igen Acrylamidgel unterzogen. Anschließend wurden Immunblots der verkürzten Fragmente mit Kulturüberstand des αPhl p 5IgG4-Antikörpers (**B**) und einem Anti-CBD-Antikörper (1:1000) (**C**) durchgeführt. Die Detektion erfolgte für B mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper(1:20000), für C mit einem AP-konjugierten Anti-murin IgG (1:10000) und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Phl p 5a Fragment1, Bahn 3: Zelllysat Phl p 5a Fragment 2, Bahn 4: Zelllysat Phl p 5a Fragment 3, Bahn 5: Zelllysat Phl p 5a Fragment 4.

D: Proteinstrukturmodellierung der verkürzten Fragmente. Oberflächen sind halbtransparent dargestellt und durch Sekundärstrukturelemente überlagert. α-Helices sind gelb, Aminosäurereste, die in beiden Isoformen variieren, blau gekennzeichnet.

Um dieses Ergebnis weiter zu untermauern, wurde ein Transfer der *loop*-Region vom reaktiven N-terminalem Bündel des Phl p 5a auf das des nicht-reaktiven Phl p 5b-Allergens vorgenommen. Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einem Immunblot unterzogen und auf ihre Reaktivität mit dem Antikörper hin getestet. Neben diesem chimären Molekül wurde auch das N-terminale Bündel des Phl p 5b als Kontrolle kloniert und exprimiert. Wie in Abbildung 4.43 gezeigt, führt die Insertion des Bereichs vom Phl p 5a in das 4-Helix-Bündel des Phl p 5b zur Induktion der Reaktivität mit dem Antikörper αPhlp5-IgG4.

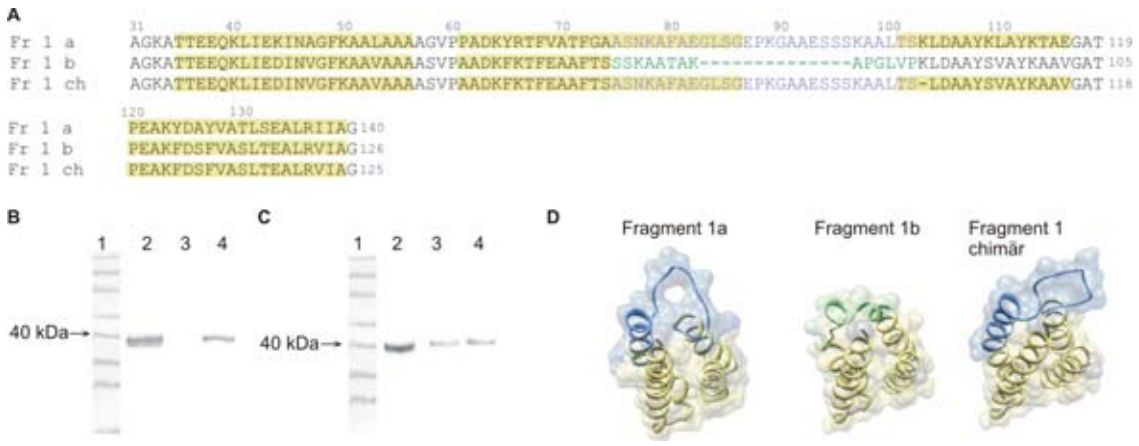


Abb. 4.43 Aminosäuresequenzen N-terminaler Fragmente von Phl p 5a und Phl p 5b, sowie eines chimären Moleküls und Reaktivitäten mit dem Antikörper αPhl p 5-IgG4.

A: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Konstrukte. Die α-helikalen Strukturen sind gelb hinterlegt, Aminosäuren, die von Phl p 5a auf Phl p 5b transferiert wurden blau gekennzeichnet, grün der entsprechend ersetzte Bereich des Phl p 5b.

B, C: Zelllysate induzierter *E. coli*-Zellen wurden einer SDS-PAGE-Analyse mittels 12,5 %igen Acrylamidgel unterzogen. Anschließend wurden Immunblots der Konstrukte mit Kulturüberstand des αPhl p 5-IgG4-Antikörpers (**A**) und einem Anti-CBD-Antikörper (1:1000) (**B**) durchgeführt. Die Detektion erfolgte für A mit einem AP-konjugiertem Anti-human IgG-Antikörper(1:20000), für B mit einem AP-konjugierten Anti-murin-Antikörper (1:10000) und durch NBT/BCIP als Substrat. Bahn 1: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder,* Bahn 2: Zelllysat Phl p 5a Fragment 1, Bahn 3: Zelllysat Phl p 5b-Fragment 1, Bahn 4: Zelllysat chimäres Fragment ch.

D: Proteinstrukturmodellierung der Konstrukte. Oberflächen sind halbtransparent dargestellt und durch Sekundärstrukturelemente überlagert. α-Helices sind gelb, Strukturen, die transferiert wurden blau, solche die ersetzt wurden, grün gekennzeichnet.

Das Epitop konnte daher eindeutig in Zusammenhang mit dem Sekundärstrukturelement einer Schleife zwischen zweiter und dritter α-Helices gebracht werden. Eine nähere Betrachtung der oberflächlichen Ladungsverteilung in diesem Bereich zeigt, dass sowohl die Schleifen-Region, als auch die angrenzende Fläche im Phl p 5a positive Ladungen von Glutaminsäure-Resten aufweisen, die dem Phl p 5b-Molekül fehlen (s. Abb 4.44). Der Transfer dieser Aminosäuren führt zur Regeneration der sterischen Struktur und negativen Elektrostatik, wodurch das Epitop auf der Moleküloberfläche wiederhergestellt ist.

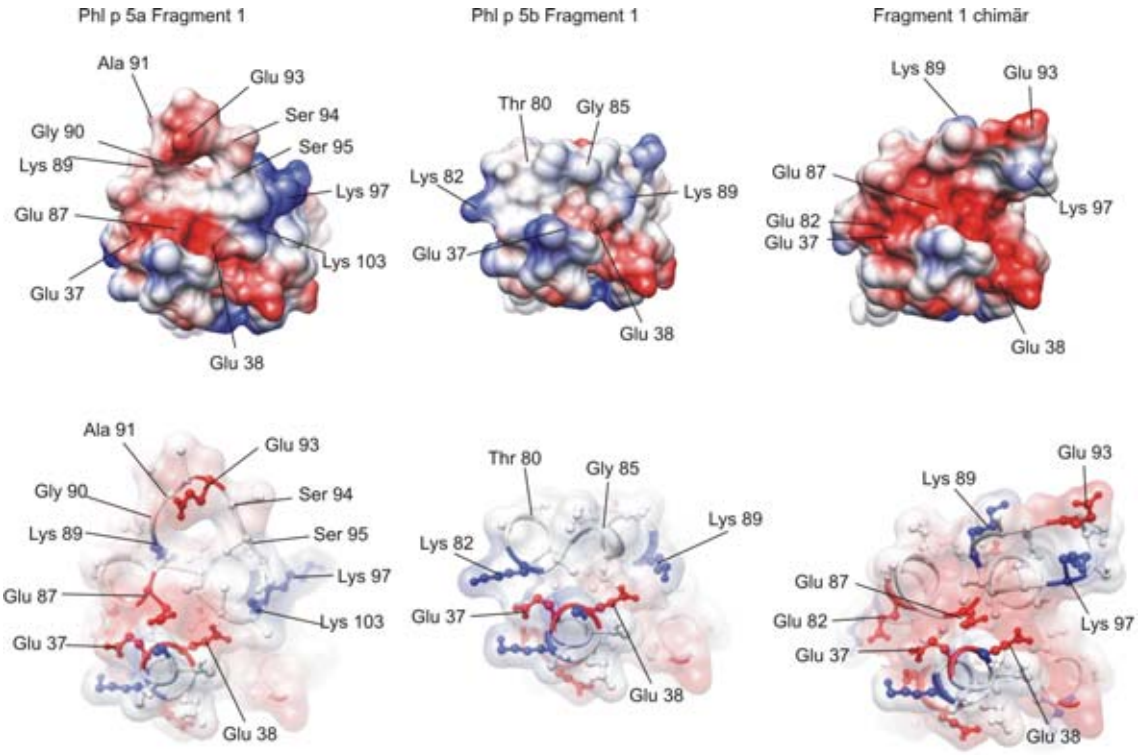


Abb. 4.44 Epitopbereich des humanen αPhl p 5-Antikörpers im N-terminalen 4-Helixbündel der Allergen-Isoformen Phl p 5a und b sowie eines chimären Konstruktes

Dargestellt ist die Ladungsverteilung auf der Molekülоberflächen der Allergene, von denen Phl p 5a Fragment 1 und Fragment 1 chimär von dem Antikörper gebunden werden. Negative Ladungen sind rot (saure Aminosäure-Seitenketten) und positive blau (basische Aminosäure-Seitenketten) markiert. Im unteren Bildabschnitt wurde nur die oberste Ebene der Molekülоberfläche halbtransparent dargestellt, sodass Sekundärstrukturen und die Ausrichtung einzelner Aminosäurereste sichtbar werden.

Es konnten somit die Epitope beider Allergene lokalisiert werden und wichtige, an der Bindung der spezifischen Antikörper beteiligte, Motive und Aminosäurereste identifiziert werden.

5 DISKUSSION

Viele Faktoren, die die Ausbildung und den Verlauf allergischer Erkrankungen beeinflussen, wie beteiligte Zellpopulationen, Zytokine, genetische Veranlagungen und äußere Faktoren konnten bereits charakterisiert werden. Warum jedoch bestimmte Antigene unter gegebenen äußeren Bedingungen in Atopikern allergische Reaktionen auslösen, während andere Antigene unter gleichen Bedingungen toleriert werden, also eine Antwort auf die Frage, was ein Antigen zu einem Allergen macht (Aas 1978), konnte bisher nur teilweise beantwortet werden. Ein Unterscheidungskriterium zwischen lediglich immunogenen und allergenen Proteinen stellt die Erkennung durch IgE-Antikörper dar, die im Zuge einer Sensibilisierung sezerniert werden. Eine Charakterisierung dieser IgE-Epitope beinhaltet daher die Möglichkeit spezifische Merkmale der Proteinstruktur und Oberflächengestaltung von Allergenen zu detektieren.

Monoklonale Antikörper erlauben eine gezielte molekulare Analyse der Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Antigenen. Ihre Darstellung mithilfe muriner Hybridom-Zelllinien ist gut etabliert und Affinitätsreifungen, ausgelöst durch mehrfache Immunisierungen der verwendeten Mäuse, führen zur Expression hochspezifischer Antikörper. Mithilfe rekombinanter Technologien durchgeführte Humanisierungen ermöglichen die Darstellung humaner Isotypen oder chimärer Antikörper, darunter auch allergenspezifische IgE-Antikörper (Christensen *et al.* 2008). Zur Charakterisierung der molekularen Antigen-Interaktion von Antikörpern, die im Zuge immunologischer Erkrankungen, wie z.B. einer Allergie eine Rolle spielen, sind sie jedoch durch die künstlich hervorgerufene Immunantwort nur begrenzt geeignet. Hier wäre es wichtig, die originären, im Kontext der Allergie relevanten IgE-Antikörper zu erhalten. Deren Verfügbarkeit ist aufgrund der geringen Konzentration im Serum jedoch begrenzt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf variable Domänen, die dem Immunrepertoire allergischer Spender entnommen und mithilfe einer kombinatorischen Phagenbibliothek dargestellt sowie anhand ihrer Reaktivtät mit dem jeweiligen Allergen selektiert worden waren, zurückgegriffen werden. Diese Bet v 1- bzw. Phl p 5-spezifischen scFv konnten im Format unterschiedlicher Antikörperkonstrukte exprimiert werden, wodurch monoklonale, authentische IgE-Antikörper für weiterführende Analysen, Bindungsstudien und eine Identifizierung der für die Interaktion benötigten Strukturen und Aminosäuren zur Verfügung standen.

5.1 Darstellung und Reinigung der Antikörperkonstrukte

scFv-Antikörperformate sind mit allen Informationen für die Bindungsspezifität ausgestattet. Die funktionelle Affinität gegenüber dem Allergen ist allerdings aufgrund der Monovalenz geringer. Zudem verfügen sie nicht über das Potential Rezeptorbindungen einzugehen, und sind somit für weiterführende Analysen nicht geeignet. Die Verknüpfung eines scFv mit den Fc-Domänen unterschiedlicher Antikörper-Isotypen bietet die Möglichkeit, eine erhöhte Affinität mit den natürlichen Fc-vermittelten Effektormechanismen zu kombinieren. Dadurch werden zelluläre Funktionsanalysen möglich, die sowohl die Spezifität der Bindung als auch deren Wirkung berücksichtigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Allergie-relevanten Isotypen IgE, IgA1,IgA2, IgG1 und IgG4 mit Spezifität für Bet v 1 bzw. Phl p 5 exprimiert.

In diesem Zusammenhang wurden für die Darstellung der Antikörper zwei unterschiedliche Formate gewählt. Zum einen wurde die Expression verkürzter, bivalenter homodimerer Antikörperkonstrukte angestrebt. Im Vergleich zu den nativen, bivalenten heterotetrameren Antikörpern kann die Reduktion des Molekulargewichts zu einer erhöhten Expressionsrate führen, da das Zellsystem einer geringeren Belastung ausgesetzt ist (Braren *et al.* 2007). Ein weiterer Vorteil dieser Antikörperformate liegt in dem geringeren erforderten Klonierungsaufwand, da sich die Sequenz des scFv in einem Schritt in den Expressionsvektor pcDNA3.1, in dem Bereits die Sequenz der schweren konstanten Kette vorhanden ist, insertieren lässt. Somit eignet sich dieses Format besonders gut für erste Untersuchungen hinsichtlich des Expressionsverhaltens und der Allergenspezifität von Selektanden einer scFv-Phagenbibliothek. Eine Bindung dieser Konstrukte an Fc-Rezeptoren auf Zelloberflächen, sowie die Fc-vermittelte Signal-Wirkung konnte in dieser Arbeit durch die Degranulationsanalysen mit dem Bet v 1-spezifischen αBetv1-scFv/IgE gezeigt werden. Der synthetische Peptidlinker, der in diesen Konstrukten die variablen Domänen der schweren und leichten Kette miteinander verbindet ist flexibel und kann die benötigte Stabilität für Bindungsanalysen im Rahmen einer Charakterisierung der natürlichen Eigenschaften möglicherweise nicht bereitstellen.

Es ist daher prinzipiell wünschenswert, die Antikörper im Format vollständiger heterotetramerer Moleküle mit originärer Immunglobulinfaltung darzustellen. Nachdem die Expression hetereotetramerer Antikörper für den IgA-Isotyp für beide scFv mit angemes-

senen Expressionsraten erzielt werden konnte, wurde für IgG-Antikörper auf die Expression verkürzter Formate verzichtet (s. S. 84).

Heterotetramere IgE-Antikörper konnten nur mit Spezifität für Phl p 5 erfolgreich rekombinant dargestellt werden. Für Bet v 1 musste hingegen auf verkürzte scFv-IgE-Formate zurückgegriffen werden. Eine Ursache für das Fehlschlagen der IgE-Expression könnte im synthetischen Ursprung der V_L-Domäne des selektierten scFv begründet sein. Phl p 5-spezifische Immunglobulindomänen lagen während der Selektion im Format eines Fab-Fragmentes vor und waren somit den gleichen Faltungsbedingungen wie bei einer späteren Expression als Antikörper unterworfen. Im Gegensatz dazu wurde das Bet v 1-spezifische Fragment als scFv selektiert. In einem vollständigen Antikörper ergeben sich dadurch neue sterische Anordnungen, auf die auch die Immunglobulindomänen schwerer konstanter Ketten einen Einfluss haben könnten. Ein erfolgter Austausch der κC_L im Bet v 1-spezifischen Antikörper konnte die Expression ebenso wenig induzieren. Phl p 5-spezifische Antikörper zeigten ein von κ- oder λC_L unabhängiges Expressionverhalten, sodass eine sterische Hinderung in diesem Kontext ausgeschlossen werden kann.

Die Beobachtung, dass sich Selektanden mit semi-synthetischen variablen Domänen, die der Griffin-Bibliothek entstammen zwar als IgG- und IgA-Antikörper, jedoch nicht im Format eines IgE-Antikörpers exprimieren lassen, konnte im Arbeitskreis vermehrt erfolgen. Da der Bet v 1-spezifische Antikörper über eine originiäre V_H-Domäne verfügt und nur die V_L-Domäne synthetisch ist, könnte in einer hypothetischen Annahme der Misserfolg einer IgE-Sezernierung mit der Inkompatibilität zwischen synthetischer V_L-Region und εC_H-Domänen in Verbindung gebracht werden. Es könnte jedoch auch sein, dass die verringerte Flexibilität der IgE-Gelenkregion in diesem Zusammenhang hinderlich ist.

Prinzipiell wäre die Verwendung einer originären V_L-Domäne, die ebenfalls einem allergischen Patienten entstammt, für den Erhalt der Authentizität des Antikörpers erstrebenswert. Die Wahrscheinlichkeit originäre IgE-V_L-Regionen zu amplifizieren, um sie der Bibliothek beizusteuern, ist jedoch selbst bei Verwendung der gleichen mRNA gering. Das liegt daran, dass sich für variable Domänen keine iIsotypenspezifische Eingrenzung durch Oligonukleotide vornehmen lässt und die Amplifikation der Sequenzen ungerichtet, nach der Prävalenz vorhandener Isotypen erfolgt. Hierbei werden größtenteils V_L-Domänen der überwiegend sekretierten IgG-Antikörper amplifiziert. Wenn die

authentische V_L in diesem *pool* enthalten sein sollte, wäre sie unterrepräsentiert und die Wahrscheinlichkeit einer Ligation mit der originaren V_H bei den üblichen Bibliotheksgrößen eher gering. Daher wurde die Domänenvielfalt der V_L für die hier verwendete Bibliothek synthetisch erzeugt. Es konnten vermehrt Hinweise darauf gefunden werden, dass im Transkriptom der IgE-variablen Antikörperdomänen nur ein begrenztes Repertoire an V_H Domänen zur Verfügung steht, welches sich mit einer höheren Variabilität an V_L-Domänen assembliert um so Paratope für die Binungen unterschiedlicher Allergene zu bilden (Andréasson *et al.* 2006; Persson *et al.* 2007; Marth *et al.* 2010). Ein Verlust der Authentizität des identifizierten Epitops durch Verwendung einer synthetischen V_L-Domäne ist daher nicht anzunehmen. Der CDR_H3-Region scheint bei der Definition der Spezifität eine übergeordnete Rolle zuzukommen (Barrios *et al.* 2004). In diesen Beobachtungen wird die Spezifität eines Antikörpers durch die V_H-Region definiert, eine „Feinabstimmung“ der Bindung, durch welche die Affinität konfiguriert wird, erfolgt hingegen anhand der V_L-Domäne. Dies wäre auch konform mit der in den SPR-spektroskopischen Messungen beobachteten geringeren Affinität des αBet v 1-Antikörpers von 43 nM.

Da durch Selektion eine spezifische V_H identifiziert und charakterisiert wurde, wäre es nun möglich, eine Bibliothek zu generieren, in der diese V_H und mit dem Repertoire unterschiedlicher V_L-Domänen eines Bet v 1-Allergikers kombiniert würde. Es wäre interessant ob die einstige Affinität des Antikörpers dadurch rekonstruiert werden könnte, ob also das natürliche Repertoire gegenüber einem synthetischen Vorzüge für die „Feinabstimmung“ aufweist.

Generell wünschenswert wäre es auch für zukünftige Bibliotheksklonierungen, eine Vorselektion durchzuführen. Hierfür könnten allergenspezifische B-Zellen mithilfe fluoreszenzmarkierter Moleküle und einem Durchflusszytometer, das über eine Sortierfunktion verfügt, isoliert werden. Dies würde die Eingrenzung des Repertoires von sowohl V_H- als auch V_L-Domänen auf Ketten, die eine Bindung an Allergene vermitteln, eingrenzen und könnte dadurch die Wahrscheinlichkeit der authentischen Assemblierung zweier variabler Domänen stark erhöhen. Die verringerte Bibliotheksgröße würde in diesem Fall nicht stören, da sie lediglich Ausdruck der bereits erfolgten Vorauswahl wäre. Neben allergenspezifischen IgE- wären auch IgA- und IgG-Subbibliotheken einzelner Patienten mit unterschiedlicher Therapie-Historie denkbar. Durch Charakterisierung der, mittels Selektionen erhaltenen, originären Antikörper könnten Aussagen über Diversität und Anzahl, sowie Affinitäten unterschiedlicher Antikörper gemacht und Un-

tersuchungen zur möglichen Verschiebung des Epitop-Profils während einer Immuntherapie durchgeführt werden.

Die Verfügbarkeit der dargestellten monoklonalen Antikörper ermöglicht neben den Epitopcharakterisierungen noch andere funktionelle Anwendungen. Für IgE wäre der Einsatz als Referenzantikörper für eine Generierung von Standardseren zur Anwendung in *in vitro*-Allergietests möglich. Diese basieren zum jetzigen Zeitpunkt auf *pool-S*eren eines Patientenkollektivs und sind dadurch natürlichen jahreszeitlichen Schwankungen des IgE-Spiegels unterworfen. Sie gewährleisten dadurch nur eine limitierte Reproduzierbarkeit und können für seltene Allergene oft gar nicht zur Verfügung gestellt werden.

Zur diagnostischen Evaluation einer Immuntherapie könnten IgG4 und IgA2-Antikörper eingesetzt werden, um die Zunahme blockierender Antikörperkonzentrationen zu bestimmen und eine verbesserte Beurteilung von Therapieerfolgen zu ermöglichen. Neben den Standardisierungen der Testsysteme wäre auch die Bestimmung des Gehalts ausgewählter Majorallergene in Allergenextrakten denkbar, da diese aufgrund des natürlichen Ursprungs der Extrakte ebenfalls starken Schwankungen unterworfen sind.

IgG4- und IgA2-Isotypen könnten in einer therapeutischen Applikation Anwendung finden und als Anti-inflammatorische Antikörper im Serum und mukosalem Gewebe Allergene blockieren, wodurch eine Bindung an die allergenspezifischen IgE-Antikörper verhindert werden könnte (Wachholz *et al.* 2003; Gadermaier *et al.* 2010). Antigen-gebundene IgG4-Antikörper binden zudem an Fcγ-Rezeptoren, wodurch eine Antikörper-vermittelte Aufnahme der Immunkomplexe und eine erhöhte Kreuzpräsentation auf MHC-I Molekülen ausgelöst wird. Eine solche Verschiebung des aktivierten T-Zell-Milieus hin zu T_H1 würde helfen, das Niveau allergenspezifischer IgE-Antikörper zu senken (Ackerman und Cresswell 2004).

Die erzielten Expressionsraten im Bereich von höchstens 500 ng/L müssten zur Evaluierung des Einsatzes weiterer Anwendungen gesteigert werden. Die konstitutive Expression in Säugerzell-Kulturen wird durch die zufällige Integration der Plasmid-DNA in die Chromosomen der Zellen erreicht. Die Expressionsrate stabiler Transfektanden hängt dabei stark vom Genlokus der Insertion ab, da eine Integration im inaktiven Heterochromatin eine verringerte Proteinexpression zur Folge hat (Wurm 2004). Bei einer Transfektion entsteht demnach eine heterogene Population transgener Zellen mit unterschiedlichen Expressionsraten. Die gleichzeitige Transfektion eines GFP-tragenden

(*green fluorescent protein*) Plasmides oder eines Plasmides, welches das GFP-Gen zusätzlich zu dem Zielgen und dem Selektionsmarker trüge, wäre denkbar. Dies würde es ermöglichen, eine Selektion einzelner Zellen mit hohen GFP-Expressionsraten anhand ihrer Fluoreszenz in einem Durchflusszytometer mit Sortierfunktion vorzunehmen. Eine hohe GFP-Expression würde in beiden Fällen mit einer hohen Antikörper-Expression einhergehen und wäre als Marker einsetzbar, da unterschiedliche Plasmide vor ihrer Integration in den Zellkern durch Ligasen fusioniert werden (Perucho *et al.* 1980). Eine Langzeit-Expression ist durch Transgene, die stabil in Chromosomen insertiert wurden, nicht möglich, da durch Effekte benachbarter Chromatin-Strukturen häufig Veränderungen in den Promotorregionen erfolgen und die Expression verringert wird. Dies kann mit einer zielgerichteten Integration in Bereiche, die vom Wirt aktiv transkribiert werden, umgangen werden und ist mithilfe von Rekombinasen möglich, wie z.B. der P1 Cre Rekombinase oder der Flp Rekombinase aus Hefen. Sie dirigieren den Einbau in aktive Bereiche durch die Erkennung sogenannter *attachment sites* in der Wirts-DNA (Wurm 2004).

Die affinitätschromatographischen Reinigungen der Antikörper erfolgten mittels unterschiedlicher Methoden. Reinigungen der Antikörper mittels IMAC zeigten Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen, die durch die Verwendung einer Protein-L oder einer Antigen-Matrix stark reduziert werden konnten. Hierbei konnte allerdings ein Funktionsverlust der IgE-Antikörper durch die Elution mittels Säure beobachtet werden. Die Verunreinigungen stellten für die, im Rahmen dieser Arbeit geplanten, Analysen kein Hindernis dar, da beispielsweise im Kulturmedium der RBLSX-38-Zellen, die für die Degranulationsanlysen eingesetzt wurden, ebenfalls 15 % FKS enthalten waren, sodass hier kein Effekt zu erwarten war. SPR-spektroskopische Messungen wurden zur Kontrolle mit einer 10 %-igen BSA-Lösung durchgeführt, wobei keinerlei unspezifische Bindung beobachten werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um den Reinheitsgrad der Antikörper z.B. für diagnostische oder therapeutische Anwendungen zu erhöhen, wäre ein zweiter Reinigungschritt sinnvoll. Die IMAC-Reinigung würde dann eine Vorstufe darstellen, der sich weitere Methoden anschließen könnten. Aufgrund des Größenunterschiedes zwischen den Antikörpern und dem BSA, würde sich hier eine Gelfiltration anbieten.

5.2 Interaktionsanalysen der Antikörperkonstrukte

5.2.1 SPR-spektroskopische Messungen

Die Ergebnisse der SPR-spektroskopischen Messungen lieferten Bindungskonstanten von 43 nM für die Bindung des αBetv1-scFv/IgE und 3,5 nM für die Bindung des humanisierten Hybridom-IgEs an Bet v 1a-MBP. Der Phl p 5a-spezifische IgE wies eine Bindungskonstante von 1 nM für die Bindung an Phl p 5a-MBP auf und zeigte somit die höchste Affinität zu seinem Allergen.

Affinitätsreifungen in Säugetieren erfolgen bei natürlichen oder künstlich hervorgerufenen Immunisierungen wenn Antikörper-sekretierende B-Zellen nach dem Isotypenwechsel erneut in Kontakt mit dem Antigen kommen. In diesem, als somatische Hypermutation bezeichneten Prozess, werden Punktmutationen in die V-Segmente der, während der VDJ-Rekombination entstandenen Gene variabler Antikörperdomänen eingefügt. Die selektive und wiederholte Aktivierung allergenspezifischer B-Zellen führt zu deren Wachstumsvorteil und einer positiven Rückkopplung, wodurch hoch-affine Antikörper sezerniert werden (Murphy *et al.* 2009). Bei der Generierung einer kombinatischen εV_H-Antikörper-Bibliothek, basierend auf dem Immunrepertoire allergischer Spender, würde man prinzipiell von einer vollzogenen Affinitätsreifung der IgE-Antikörper ausgehen. Gerade im Kontext einer Pollenallergie ist die Allergen-Karenz nur bedingt möglich, und es kommt saisonal regelmäßig zu erneutem Kontakt mit dem Allergen. Liegt eine Allergie gegen ein PR10-Protein vor, kann die Kreuzreaktivität der Antikörper zu homologen Proteinen die Häufigkeit der Stimulation noch erhöhen. Ein dominantes Epitop auf der Oberfläche des Bet v 1-Allergens, dargestellt durch einen konservierten Bereich unterschiedlicher homologer PR-10-Proteine, konnte bereits charakterisiert werden (Mirza *et al.* 2000).

Die Affinität des Bet v 1-spezifischen Antikörpers erscheint in diesem Zusammenhang eher gering. Das könnte zum einen daran liegen, dass für die Messungen das verkürzte scFv-IgEC_H2-4 Konstrukt verwendet wurde. Es handelt sich dabei um ein artifizielles Konstrukt, welches zwar eine Bindung an Bet v 1 sowie an den FcεRI auf RBL-Zellen zeigte, jedoch nicht zwingend über die gleichen Bindunseigenschaften wie ein heterotetrameres Konstrukt verfügen muss. Es ist möglich, dass die Stabilität des flexiblen Peptidlinkers nicht ausreicht, um die V_H- und V_L-Domänen für eine Allergenbindung ste-

risch auszurichten. Dieser Einfluss könnte in einem direkten Vergleich, bei dem ein Antikörper der gleichen Spezifität in unterschiedlichen Konstruktformaten SPR-spektroskopischen Analysen unterzogen würde, aufgeklärt werden. Die im Vergleich zu den Erwartungen geringe Affinität könnte auch darin begründet liegen, dass die V_L-Domäne des Antikörpers synthetischen Ursprungs ist, dieser somit zwar ein originäres Epitop erkennt, jedoch nicht mehr über die ursprüngliche Affinität verfügt (vgl. S. 113). Ähnliche Effekte wurden bei einer vermischten Assemblierung von V_H und V_L-Domänen Der p 2-spezifischer Hybridom-Antikörper beobachtet (Christensen *et al.* 2008).

Der Phl p 5-spezifische Antikörper besitzt im Vergleich zum Bet v 1-spezifschen Konstrukt eine Bindungskonstante, die um eine Großenordnung höher ist. Die Bibliothek, der dieser Antikörper entstammte wurde durch Verwendung natürlicher κ- und λ-V_L-Domänen und IgE-spezifisch-amplifizierter V_H-Domänen, unter Einsatz des gleichen B-Zell-Matierals generiert (Steinberger *et al.* 1996). Trotz der höheren Affinität ist eine Aussage, ob es sich hierbei um die authentische Paarung handelt, die zwar in der Bibliothek stark unterrepräsentiert aber durch die hohe Affinität leicht zu selektieren war, spekulativ.

Der Hybridom-Antikörper mit Spezifität für Bet v 1 liegt mit einer Bindungskonstante von 3,5 nM im Vergleich der Affinitäten aller analysierten Antikörper im höheren Bereich. Hier liegt eine authentische Assemblierung von V_H- und V_L-Domänen vor, wodurch der Wert in diesem Zusammenhang nicht beleuchtet werden muss. Generell hat durch die weite Verbreitung der Hybridomtechnologie auch eine Etablierung zur Untersuchung der Reaktivtäten vieler Zellklone für die Selektion hoch-affiner Antikörper einzug gehalten (Chiarella und Fazio 2008). Vermehrte Immunisierungen über lange Zeiträume wirken durch die vollzogenen somatischen Rekombinationen ebenfalls affinitätssteigernd.

Die Hypothese, dass sich IgE- und IgG-Antikörper generell in ihren Affinitäten zu Allergenen unterscheiden wurde mehrfach aufgestellt. In einer Studie zeigte sich, dass Zellen durch einen *in vitro* induzierten Klassenwechsel hoch-affine IgE-Antikörper mit Bindungskonstanten bis in den einstelligen picomolaren Bereich sezernieren, wohingegen IgG-Antikörpern Affinitäten bis zu 5 Größenordungen darunter nachgewiesen wurden. Analysen mit humanen polyklonalen allergenspezifischen Antikörpern zeigten übereinstimmende Tendenzen, jedoch mit weniger gravierenden Unterschieden (Hantusch *et al.* 2005). Diese SPR-spektroskopischen Messungen polyklonaler IgG- und IgE-Anti-

körper lassen zwar eine Aussage über die gemittelte Affinität der jeweiligen Immunglobulin-Klasse im Serum zu, wie die Verteilung der Einzel-Affinitäten ist, bzw. wie die gemittelten Affinitäten zustande kommen, kann dabei nicht evaluiert werden. Mithilfe kombinatorischer Phagen-Bibliotheken selektierte humane Fab-Fragmente zeigten hingegen nur geringe Unterschiede ihrer Affinitäten zu Bet v 1 (Jakobsen *et al.* 2004).

Bei einer Messung der Affinität muriner Antikörper ist der Wert als solcher informativ, die anfangs erwähnte mangelnde Übertragbarkeit artifiziell hervorgerufener muriner Immunantworten auf das natürliche humane System muss jedoch berücksichtigt werden. Unverfälschte Aussagen lassen sich daher letztlich nur mithilfe von monoklonalen humanen antikörperspezifischen Antikörpern treffen. Dies konnte bislang lediglich für einen Phl p 2-spezifischen IgE-Antikörper, der ebenfalls einer kombinatorischen Bibliothek entstammte, durchgeführt werden und zeigte eine Bindungskonstante von 0,1 nM (Padavattan *et al.* 2009). Vergleichswerte allergenspezifischer originirärer monoklonaler IgG-Antikörper liegen noch nicht vor.

Die hier gemessenen Werte konnten keine überaus hohen Affinitäten für IgE-Antikörper demonstrieren, müssen jedoch vor dem Hintergrund des Messverfahrens und der anschließenden Auswertung betrachtet werden. Zur Evaluierung der Übereinstimmung gemessener Werte mit einer Kurvenanpassung dient der Chi^2-Wert. Dieser statistische Wert gibt die Fläche zwischen dem gemessenen Sensorgramm und der über die Anpassung berechneten Kurve wieder. Je niedriger der Chi^2-Wert ist, umso besser stimmt die Kurvenanpassung mit den gemessenen Werten überein. Im Allgemeinen zeigen Chi^2-Werte unter 10, dass eine für die Kurvenanpassung gewählte Formel die Messwerte repräsentiert. Demnach sollten die Messungen und die mithilfe des bivalenten Bindungsmodells errechneten Bindungsaffinitäten für die beiden Bet v 1a-spezifischen Antikörper nur als erste, richtungsweisende Ergebnisse interpretiert werden, da sie Chi^2-Werte von 19 und 40 besaßen. Andere Bindungsmodelle wurden ebenfalls angewendet, lieferten jedoch weit höhere Chi^2-Werte (nicht gezeigt). Im Vergleich dazu erscheinen Affinitätsmessungen mit dem Phl p 5a-spezifischen Antikörper, dessen Chi^2 bei 0,2 lag durchaus valide. Die Messungen lassen demnach einen Vergleich der Antikörper untereinander und eine erste Einschätzung zu, sollten jedoch für genauere Aussagen mithilfe der gleichen Biosensoren und weiteren Konzentrationen wiederholt werden.

Es konnte keine Verstärkung von mono- zu bivalenter Bindung beobachtet werden, und in allen drei Fällen entspricht die K_D bi der K_D1 (s.S. 53). Aviditätseffekte spielen vor allem bei der Opsonierung von Viren und Bakterien durch pentamere IgM-Antikörper im frühen Stadium von Immunantworten eine Rolle. Die repetitiven Strukturen auf der Oberfläche dieser Pathogene bilden multivalente Epitope und werden durch mehrere Antikörperbindungsstellen gebunden. Die monovalente Affiintät dieser Bindungsstellen ist eher gering, da die Antikörper noch keine Affinitätsreifung durchlaufen haben. Kommt es zur Dissoziation einer Bindungsstelle, so bleibt das Pathogen aufgrund der anderen Bindungen in Reichweite der Bindungsstelle, und die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Assoziation wird stark erhöht. Die Reichweite spielt somit für Aviditätseffekte eine wichtige Rolle. Bei einer SPR-spektroskopischen Messung, in der ein Antigen als Ligand auf der Chipoberfläche immobilisiert wird, ist der Abstand zwischen zwei Antigenen durch die Dichte der immobilisierten Antigene bestimmt. Die Reichweite eines bivalenten Antikörpers entspricht etwa 115-150 Å (Crothers und Metzger 1972). Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils ca. 1000 RU des Allergens immobilisiert, was einer Dichte von 0,19 nmol/m^2 Bet v 1a-MBP und 0,14 nM/m^2 Phl p 5a-MBP entspricht. Das sind etwa 1 x 10^{14} Moleküle/m². Geht man von einer gleichmäßigen Verteilung aus, würde jedem Molekül dann eine Fläche von 1 x 10^{-14} m² zur Verfügung stehen das entspricht etwa 100 $Å^2$. Durch ungefähre Messungen an Strukturmodellen konnte für die maximale Ausdehnung eines Bet v 1a-Moleküls eine Fläche von ca. 3000 $Å^2$ berechnet werden. Das hieße, dass die Dichte der immobilisierten Moleküle auf dem Chip für eine bivalente Bindung prinzipiell ausreichen sollte. Störungen könnten sich allerdings aus der Fusion des Allergens mit MBP ergeben. Dieses könnte den Abstand zwischen den Allergen-Molekülen so erweitern, dass eine bivalente Bindung nicht mehr möglich wäre.

Die Konzentration der Antikörper hat ebenfalls Einfluss auf die die Valenz der Bindung. So fördern geringe Konzentrationen bivalente Bindungen, wohingegen bei hohen Konzentrationen eine Konkurrenz um die Epitope herrscht und es häufiger zu monovalenten Bindungen kommt. Verstärkende Effekte bivalenter Bindungen treten bei Verwendung niedrig-affiner Antikörper besser hervor.

In einer abschließenden Beurteilung der Messungen lässt sich somit schlussfolgern, dass für zukünftige Analysen von einer Immobilisierung der Allergene abzuraten ist. Nach weiteren Reinigungsschritten könnten die Antikörper in einem Reinheitsgrad erhalten werden, der eine Immobilisierung erlaubt. Wenn sich das Allergen in Lösung be-

findet und frei beweglich ist, lassen sich Aviditätseffekte umgehen. Die Bindung an einzelne Bindungsstellen der Antikörper erfolgt dann unabhängig von der Dichte oder sterischer Ausrichtungen der Bindungsstellen. Kurvenanpassungen mithilfe eines dann zugrundeliegenden 1:1 Bindungsmodells würden eine Bestimmung der Affinität mithilfe kinetischer Parameter oder durch ein Erreichen des Gleichgewichtszustand von Assoziation und Dissoziation und daraus abgeleiteten Berechnungen zulassen (Vgl. S. 52).

5.2.2 Rezeptorbindungen und Degranulationsanalysen

Die Bindung der rekombinanten Antikörperkonstrukte an die Rezeptoren FcεRI, FcγRI und des FcαR konnten die funktionelle Integrität der Antikörper exemplarisch demonstrieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der erwähnten *in vitro*-Anwendbarkeit der Antikörper vor dem Hintergrund immunologischer und diagnostischer Testsysteme nichts im Weg steht. Für IgE-Antikörperkonstrukte konnte eine Bindung an den FcεI-Rezeptor auf der Oberfläche von RBL-SX38-Zellen nachgewiesen werden, indem eine Quervernetzung durch einen Anti-IgE Antikörper induziert wurde. Phl p 5a-spezifische IgE-Antikörper konnten durch multimerisierte Allergene quervernetzt werden. Bei Verwendung eines zusätzlichen, humanisierten Hybridom-Antikörpers, der gleichzeitig an Phl p 5 binden konnte, also einer biklonalen Antikörperlösung, war es möglich, die Antikörper mit monovalentem Phl p 5a querzuvernetzten. Dies spiegelt die Prozesse während der allergischen Soforttypreaktion wieder und untermauert die Effektor-Funktionalität der rekombinanten heterotetrameren Antikörper sowie exprimierter Allergene.

Das artifizielle Bet v 1-spezifische Antikörperkonstrukt führte bei Applikation, auch ohne zusätzliche quervernetzende Moleküle konzentrationsabhängig zur Degranulation der Zellen. Dies stellt ein Indiz für die Tendenz zur Aggregation dieser Konstrukte dar. Dennoch konnte bei Verwendung niedriger Konzentrationen des Antikörpers eine Quervernetzung durch Anti-human IgE-Antikörper erfolgen. Die Allergen-induzierte Quervernetzung konnte weder mit multimerisiertem noch monovalentem Allergen bei zusätzlicher Applikation eines humanisierten Hybridom-IgE-Antikörpers erreicht werden.

Dies könnte zum einen an der geringen einsetzbaren Konzentration dieses Antikörpers liegen. Ein Vergleich mit der anfangs erstellten Eichreiche zeigt, dass Konzentrationen von 0,05 µg/ml an sich schon eine reduzierte Degranulation hervorrufen. Eine Degra-

nulation, die durch einen Anti-human IgE-Antikörper hervorgerufen wurde, war jedoch auch bei solch niedrigen Konzentratioenen möglich. Ein Abgleich mit den ermittelten Affinitäten der Antikörper führt zu der Vermutung dass die physiolgisch notwendige Affinität des Antikörpers zur Vermittlung einer Degranulation nicht erreicht wurde. Die Annahme dass dies durch die Darstellung in Form eines verkürzten Konstrukts, mit veränderter Anordnung von V_H und V_L-Domänen oder durch die synthetische V_L hervorgerufen wird, wurde bereits erläutert. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die erwähnten Der p 2-spezifischen Hybridom-Antikörper beobachtet werden (Christensen *et al.* 2008). Hier wurde die Degranulation von basophilen Zellen stark vermindert, sobald in einem Gemisch von zwei IgE-Antikörpern ein niedrig-affininer (ca. 50-500nM) mit einem Antikörper mittler Affinität (5-50 nM) anstelle eines hochaffinen (0,05-5 nM) Antikörpers appliziert wurde.

5.3 Epitopcharakterisierungen

Die ELISA-Messungen zur Reaktivität der dargestellten Antikörper zeigten, dass der Bet v 1-spezifische Antikörper keine Affinität zu Mal d 1 aufwies (s.S.96). Die beiden Allergene zeigen eine Aminosäuresequenz-Homologie von 55-65 % je nach Apfelspezies (Holm *et al.* 2011). Kreuzreakvitäten, die zum oralen Allergie-Syndrom führen, werden in vielen aber nicht allen Fällen von Birkenpollenallergien beschrieben. Dabei muss auch berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Apfelsorten variierende Mal d 1-Expressionsraten zeigen, wodurch die Allergenität von Sorte zu Sorte variabel ist (Carnés *et al.* 2006). Inwieweit Kreuzallergien auftreten, hängt in erster Linie von den Ähnlichkeiten der Epitope auf der Oberfläche des Mal d 1- und des Bet v 1-Moleküls ab. Eine Studie konnte zeigen, dass der Austausch des Serin-Restes 111 im Mal d 1 bzw. 112 im Bet v 1 zu einem Prolin-Rest die Allergenität beider Moleküle stark herabsetzte und somit auch ein wichtiges Epitop der Kreuzreaktivität zerstörte (Son *et al.* 1999). Diese Position scheint im Epitop des monoklonalen Bet v 1-spezifschen Antikörpers in der hier vorliegenden Arbeit keine wichtige Funktion einzunehmen, da ein C-terminales Fragment der Aminosäurereste 125 bis 160, gebunden wurde. Es muss hierbei jedoch erwähnt werden, dass ein Austausch zu Prolin oftmals in einer generellen Strukturveränderung des Proteins resultiert und damit die Rolle des Serin-Restes 111 für die Kreuzreaktivität nicht zwingend nachgewiesen wurde. Eine weitere Erklärung könnte darin liegen, dass die Affinitäten kreuzreaktiver Antikörper zu Mal d 1 oftmals sehr viel geringer sind als zu Bet v 1 (Vieths *et al.* 1995). Die Bindungskonstante

lag für den Bet v 1-spezifischen Antikörper bei 43 nM. Würde dieser Antikörper mit einer sehr viel geringeren Affinität an Mal d 1 binden, so wäre es möglich, dass die Detektionsgrenze der Analysemethoden unterschritten wurde.

Allergenität-vermittelte Eigenschaften konnten bislang vor allem auf Ebene der Funktionalität von Allergenen demonstriert werden. So weisen viele Majorallergene mit hoher klinischer Relevanz eine Protease-Aktivität auf. Beim Der p 1 der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* beispielsweise handelt es sich um eine Cystein-Protease, die den niedrig-affinen FcεRII auf B-Zellen spaltet (Hewitt *et al.* 1995). Dieser ist an der Regulation der IgE-Produktion beteiligt. Es wurden auch Hinweise gefunden, dass die Protease-Aktivität von Allergenen die *tight junctions,* also die Zell-Zell verbindenden Moleküle intraepithelialer Dendritischer Zellen spaltet, was mit einer erhöhten Permeabilität des Epitheles für die Allergene einhergeht. Proteolytische Fähigkeiten können auch so genannte PARs (protease-activated receptors) auf der Oberfläche von Epithelialzellen stimulieren, und diese wiederum NF-κB und aktivieren und weitere Zytokine sekretieren, die Dendritische Zellen rekrutieren (Hammad und Lambrecht 2008). Es gibt weitere Beispiele in denen Allergene durch funktionelle Mimikry immunregulatorischer Proteine allergische Zellantworten begünstigen. Das Der p 2-Allergen aktiviert Zellen des innaten Immunsystems durch seine Fähigkeit mit TLR4-Rezeptoren zu interagieren (Karp 2010).

Die Vielzahl neu identifizierter Allergene, die verbesserte Verfügbarkeit und Vergleichbarkeit von Sequenzdaten mithilfe von Datenbanken sowie die Kristallisation einiger Allergene und Strukturmodellierungsprogramme konnten zur Aufdeckung vieler neuer Proteinfamilien führen, die mit allergischen Reaktionen assoziiert sind. Mittlerweile lassen sich neu identifizierte Proteine anhand ihrer Aminosäuresequenzen mit bioinformatischen Anwendungen auf ihre Allergenität testen. Der von der WHO (*world health organization*) festgelegte Schwellenwert, ab dem ein Protein mit großer Wahrscheinlichkeit als Allergen einzustufen ist, beträgt hierbei 35 % oder mehr Sequenzidentität mit einem bekannten Allergen bei einer Sequenzlänge von 80 Aminosäuren (Bindslev-Jensen 2003). Die Verwendung von *microarray*-Systemen, die einen hohen Durchsatz an zu testenden Seren und Allergenen erlauben, ermöglicht einen Abgleich der, durch Sequenzidentitäten vorhergesagten, mit den reellen IgE-Reaktivitäten (Scala *et al.* 2010) .

Auf der Ebene physikochemischer oder struktureller Charakteristika konnten jedoch keine ubiquitär vorkommenden Gemeinsamkeiten von Allergene, die sie von Nicht-Allergenen unterscheiden, gefunden werden (Bredehorst und David 2001). Durch Verglei-

che der dreidimensionalen Strukturen konnten zwar Motive identifiziert werden, die einige zunächst seltsam anmutende Beziehungen, wie z.B. die Latex-Bananen-Kreuzreaktivität aufklären konnten, diese beschränken sich jedoch auf wenige Allergene innerhalb einer Proteinfamilie (Schein *et al.* 2010).

Für ein- und dasselbe Allergen konnten unterschiedliche Isoformen identifiziert werden, die entweder hyperallergen, also Allergie-induzierend oder aber hypoallergen waren, und somit eine Toleranz im Rahmen einer Immuntherapie induzieren konnten (Valenta 2002). Das als hypoallergen beschriebene Bet v 1d unterscheidet sich nur durch den Austausch von sieben Aminosäureresten von Bet v 1a. Dieses Phänomen konnte durch das erhöhte Aggregationspotential der Bet v 1d-Molekülen und einer dadurch induzierten höheren Immunogenität, die eine Expression blockierender IgG und IgA-Antikörper zur Folge hat, erklärt werden (Zaborsky *et al.* 2010). Es gibt jedoch auch Studien, die Dimerisierungen mit einem erhöhten allergenen Potential assoziieren (Schöll *et al.* 2010).

Weitere Hinweise existieren, dass die Anordnung, Anzahl und Stabilität allergener Epitope auf der Oberfläche eines Proteins entscheidend für dessen Interaktion mit IgE-Antikörpern und der resultierenden Bindungsdynamik sind. Faltungsvarianten, die eine verminderte Allergenität aufweisen, stellen hierfür ein Beispiel dar (Kahlert *et al.* 2008). Diese und andere Ansätze mit rekombinanten Allergenen, bei denen, z.B. durch die Darstellung in Form von Mosaik-Proteinen, B-Zell-Epitope zerstört werden, implizieren, dass die Oberflächenstruktur und die Allergenität eng miteinander kombiniert sein müssen. (Campana *et al.* 2011; Bohle *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei B-Zell-Epitope authentischer IgE-Antikörper lokalisiert werden. Dies konnte mithilfe der rekombinant dargestellten Antikörper und durch Fragmentierung der Allergene sowie Austausch einzelner Aminosäuren und Übertragung der Epitop-tragenden Strukturen auf nicht-reaktive Allergene erreicht werden. Bislang konnten auf monoklonaler Ebene nur fünf weitere B-Zell-Epitope durch Kokristallisation mit Fab-Antikörperfragmenten genauer definiert werden. Bei drei dieser Antikörper handelt es sich um murine Hybridom-Antikörper, deren klinische Relevanz durch Inhibierung der Bindung spezifischer IgE-Antikörper belegt werden konnte. Hierunter fielen jeweils ein Antikörper mit Spezifität für Bet v 1 (Mirza *et al.* 2000), für Ap i m 2, ein Allergen aus dem Gift der Honigbiene *Apis mellifera* (Padavattan *et al.* 2007), und ein Bla g 2-spezifischer Antikörper mit Reaktivität für das Majorallergen der Kakerlake *Blattella germanica* (Li *et al.* 2008).

Bei den anderen Epitopen handelt es sich um originiäre IgE-Epitope, die ebenfalls mithilfe von Antikörpern aus kombinatorischen IgE-Bibliotheken identifiziert wurden. Hierunter fällt ein selektierter Antikörper mit hoher Affinität für das Lieschgras-Allergen Phl p 2 (Padavattan *et al.* 2009), sowie ein Antikörper gegen das β-Lactoglobulin Bos d 5, ein Allergen aus der Milch der Kuh *Bos domesticus* (Niemi *et al.* 2007). In diesen Analysen konnten IgE-Epitope in Form großflächiger Strukturen, die durch Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen in Kontakt mit den Fab treten, charakterisiert werden. Aminosäuren unterschiedlicher Sekundärstruktur-Elemtente bilden in beiden Fällen planar ausgerichtete, diskontinuierliche Epitope. Im Vergleich dazu handelt es sich bei den Epitopen der murinen IgG-Antikörper mit Spezifiät für Bet v 1 und Api m 2 um kurze, hervortretende Strukturen, was die Vermutung nahe legt, dass IgE- und IgG-Epitope sich generell unterscheiden (s. Abb. 5.1).

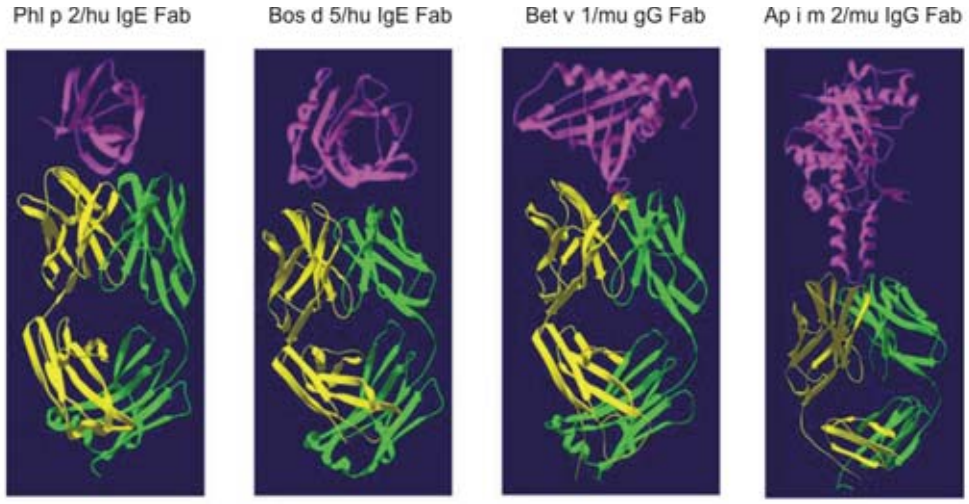


Abb. 5.1 Epitop-Paratop Interaktionen der Allergene Phl p 2, Bos d 5 und Bet v 1, Api m 2 mit Fab-Fragmenten.

Authentische IgE-Epitope auf den Allergenen Phl p 2 und Bos d 5 wurden durch Kokristallisationen mit Fab-Fragmenten, deren variable Domänen aus kombinatorischen εV_H-Fab- bzw. scFv-Bibliotheken stammten und die mithilfe der Phagendisplay-Technologie selektiert wurden, identifiziert. Murine IgG-Epitope der Allergene Bet v 1 und Api m 2 wurden mit Fab-Fragmenten der Hybridom-Antikörper kokristallisiert. Schwere variable Domänen der Antikörper sind grün, leichte variable Domänen gelb, die Allergene magenta gekennzeichnet (Abbildung aus Padavattan *et al.* 2007)

Das erst vor Kurzem identifizierte Epitop des murinen IgG-Antikörpers auf dem Allergen Bla g 2 bricht mit diesem Schema. Hier wird ebenfalls ein flächig-ausgerichtetes Epitop erkannt, das eher den beiden IgE-Epitopen ähnelt (s.Abb. 5.2). Dies ist konform mit den hier ermittelten Ergebnissen und zeigt, dass eine so klare Einteilung in unterschiedliche Strukturmotive für IgE- und IgG-Epitope nicht möglich ist.

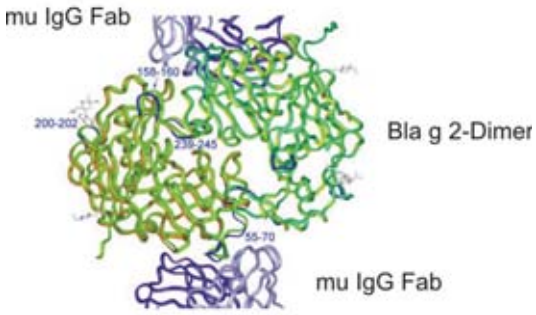


Abb. 5.2 Epitop-Paratop Interaktion des dimerisierten Allergens Bla g 2 mit murinen IgG-Fab-Fragmenten.
Durch Kokristallisation der Allergene mit den Fab-Fragmenten des murinen Hybridom-Antikörpers konnte ein diskontinuirliches Epitop identifiziert werden, welches den IgE-Epitopen ähnelt (Abbildung aus Li *et al.* 2008)

Sowohl für Phl p 5a als auch Bet v 1a konnten Epitope identifiziert werden, die eine Übertragung der Strukturen auf andere Moleküle erlaubten. Im Falle des Bet v 1 a-Allergens konnte die Reaktivität mit dem Antikörper trotz einer Verkürzung auf die C-terminale α-Helix erhalten bleiben. Der einzige Austausch eines Glutaminsäure-Restes zu Glycin an der Position 149 eliminierte hingegen die Allergen-Antikörper-Interaktion. Eine Visualisierung der Allergenoberfläche machte deutlich, dass der Verlust einer negativen Ladungsverteilung dafür verantwortlich war. Die Bedeutung dieser Ladungen für die Bindung konnte anhand einer nicht vorhandenen Kreuzreaktivität zu Mal d 1 untermauert werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich hierbei um ein sequenzabhängiges Epitop, dass im Mal d 1 durch andere Aminosäurereste maskiert wird.

Das durch Mirza *et al.* identifizierte murine IgG-Epitop auf dem Bet v 1, dessen Antikörper den Namen BV16 trägt, wird duch die Aminosäurereste 42-97, die ein sterisch ausladendes β-*turn*-Motiv formen, gebildet. Der negativ-geladene Glutaminsäure-Rest an Position 45 ragt weit heraus, tritt mit einer äquivalenten Vertiefung auf der Oberfläche des Fabs in Kontakt und spielt dadurch eine entscheidende Rolle für die Interaktion. (s. Abb. 5.3). Ob eine Punktmutation an dieser Stelle die Bindung zum Antikörper inhibieren würde, wie es im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte, ist rein spekulativ.

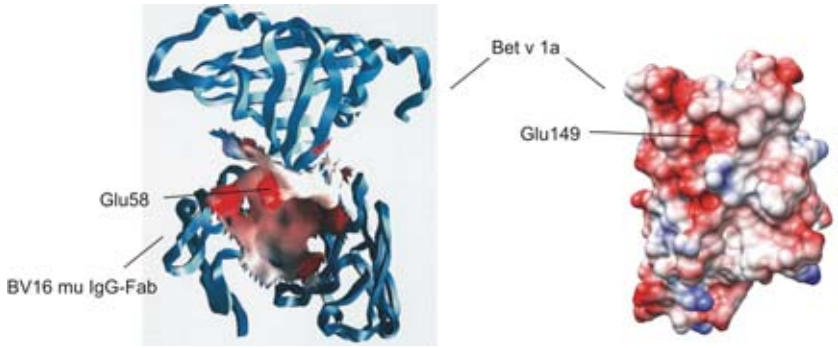


Abb. 5.3 Vergleich der Epitope auf dem Bet v 1a-Allergen des murinen IgG-BV16-Antikörpers sowie des im Rahmen dieser Arbeit dargestellten αBetv1-Antikörpers

Die Kokristallisation eines Fab-Fragmentes des murinen BV16-Antikörpers zeigte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Glutaminsäure-Restes der Position 58 des Bet v 1-Moleküls und dem Peptidrückgrat des Fabfragmentes (links, Abbildung aus Mirza et al, 2000). Im Bet v 1-Epitop des αBet v 1-Antikörpers führt die Mutation des Glutamisäure-Restes der Position 149 zu Glycin zum Verlust der Reaktivität mit dem Antikörper (rechts).

Die Beteiligung saurer oder basischer Aminosäuren an Protein-Protein-Wechselwirkungen liegt aufgrund ihres geladenen Charakters nahe. Die sauren Eigenschaften des Bet v 1-Allergens sind ebenfalls bereits lange bekannt. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider B-Zell-Epitopcharakterisierungen ist dennoch bemerkenswert.

Die Beteiligung geladener Aminosäuren an IgE-Epitopen konnte in unterschiedlichen Studien durch polyklonale IgE-Antikörper demonstriert werden. So scheinen basische Lysin-Reste im C-terminalen Fragment des Phl p5 b-Allergens zu dessen IgE-Reaktivität beizutragen (Gehlhar *et al.* 2006). In einer Studie mit den Allergenen des Wunderbaums *Ricinus communis,* der zur Gewinnung von Rizinusöl verwendet wird, konnten nur Ric c 1- und Ric c 3-Peptiden, die Glutaminsäure-Reste enthielten, IgE-Reaktivitäten nachgewiesen werden (Deus-de-Oliveira *et al.* 2011). Im Allergen Blo t 5 der Hausstaubmilbe *Blomia tropicalis* einer tropischen Spezies, die in Singapur, Malaysia und Brasilien mit allergischen Reaktionen assoziiert ist, konnten ebenfalls essentielle Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Reste für eine IgE-Reaktivität identifiziert werden (Chan *et al.* 2008).

Anhaltspunkte, dass IgE-Epitope nicht zwingend diskontinuirlich und planar ausgerichtet sein müssen, bietet auch die Tatsache, dass einige IgE-Antikörper nachweislich Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Allergenen erkennen (Altmann 2007). Diese Glykosylierungen bilden ebenfalls übertragbare Strukturen, so kann z.B. die Fukosylierung nicht-allergener Strukturen die Reaktivität mit allergischen Spenderseren, in denen IgE-Antikörper gegen diese CCD vorhanden sind, induzieren (Seismann *et al.* 2010).

Für eine Aussage, ob es sich bei dem identifizierten Bet v 1-Epitop um eine Struktur mit klinischer Relevanz handelt, müssten Reaktivitätsanalysen mit IgE-Antikörpern allergischer Patienten erfolgen. Die Inhibierung der Reaktivität durch den dargestellten Bet v 1a-spezifischen Antikörper würde diesbezüglich ein Hinweis auf ein häufig erkanntes Motiv darstellen. In Versuchen zur Aktivierung von T-Zellen allergischer Patienten konnte gezeigt werden, dass Zellen, die eine Spezifität für die Aminosäuren 142-156 des Bet v 1 aufwiesen sich besonders gut durch Bet v 1 und andere PR-10 Proteine aktivieren ließen (Jahn-Schmid *et al.* 2005).

Untersuchungen am Bet v 1, in denen IgE-Antikörper aus Patientenseren durch monoklonale murine Antikörper, die jeweils gegen definierte Peptide des Allergens gerichtet waren, inhibiert wurden, wiesen für viele, im Molekül unterschiedlich verteilte, Aminosäurereste eine Beteiligung an der IgE Bindung nach (Gieras *et al.* 2011). In dieser Studie wurde jedoch der C-terminale Bereich, dem hier ein IgE-Epitop zugewiesen werden konnte, nicht untersucht.

Die zentrale Aminosäure Glu 149, im Epitop des Bet v 1-spezifischen Antikörpers ist in 95 % der PR10-Proteine konserviert (Gajhede 1996). Dies könnte ein Hinweis auf die Rolle dieses Epitops für die hohe Kreuzreaktivität des Bet v 1-Allergens sein. Die Untersuchungen am Mal d 1 zeigen jedoch, dass ein Vorhandensein des Glutaminsäure-Restes an der Position 149 nicht unbedingt mit der Ausbildung des Epitops einhergehen muss, da sich andere elektrostatische Potentiale auf der Oberfläche ergeben können. Mithilfe von Strukturmodellierungen könnten diese für PR10-Allergene visualisiert werden. Eine abschließende Beurteilung der Kreuzreaktivität lässt sich jedoch nur durch direkte Reaktivitätsanalysen mit den Einzelallergenen vornehmen und ist von deren Verfügbarkeit abhängig.

Der Bereich des Phl p 5a-Allergens, der eine Wechselwirkung mit dem spezifischen Antikörper vermittelt, stellt ein konformationelles Epitop dar. Dieses wird durch die *loop*-Struktur der Aminoäuren 76-102 gebildet, benötigt für die exakte Ausrichtung jedoch die flankierenden, stabilisierenden α-Helices des N-terminalen 4-Helix-Bündels. Einen Anhaltspunkt zur klinischen Relevanz dieses Epitops liefern die Ergebnisse der Selektion von Peptidmimotopen, die eine Bindung an polyklonale IgE-Antikörper aufwiesen. Überlappende Peptide, die das hier identifizierte Epitop enthielten, interagierten mit Phl p 5a-spezifischen IgE-Antikörper allergischer Patienten (Hantusch *et al.* 2004).

Mithilfe der dargestellten monoklonalen IgE-Antikörper konnten nach Bindungsanalysen und einer Evaluierung der Funktionalität der Antikörper die Epitope beider verwendeter Allergene charakterisiert werden. Diese beinhalteten negativ-geladene Aminosäure-Seitenketten. Vergleiche mit den beiden weiteren bislang identifizierten IgE-Epitopen sowie den murinen IgG-Epitopen, zeigten jedoch keine generellen Merkmale, anhand derer sich eine Allergenität vorhersagen ließe, auf. Um auf struktureller Basis valide Vorhersagen treffen zu können bedarf es daher der Identifikation weiterer IgE-Epitope. Eine Kenntnis der Eigenschaften, die Wechselwirkungen unterschiedlicher Allergene mit Antikörpern induzieren, z.B. saure Aminosäure-Reste saurer Proteine, würde dazu beitragen, sowohl Vorhersagen über die Allergenität von Proteinen zu verbessern, als auch individuelle, dem IgE-Epitop-Profil angepasste Ansätze für Therapeutika zu erlauben.

5.4 Ausblick

Dargestellte Antikörper könnten für eine präzise Evaluierung des Therapieerfolgs durch genaue Bestimmung des Spiegels allergenspezifscher IgG-und IgA-Antikörper eingesetzt werden.

Für die Entwicklung therapeutischer und diagnostischer Anwendungen der hier dargestellten rekombinanten Allergen-Derivate und Antikörper bedarf es einer Evaluierung der klinischen Relevanz der charakterisierten Epitope durch Reaktvitäts- und Inhibitionsanalysen mit Seren von Birken- bzw. Graspollen-Allergikern. Eine Analyse vorhandener Kreuzreaktivitäten des Bet v 1a-spezifischen Antikörpers mit weiteren PR-10 Proteinen könnte essentielle Informationen über die Entwicklung von Kreuzreaktivitäten liefern.

Durch die Identifizierung weiterer IgE-Epitope könnte im Kontext therapeutischer Applikationen die Generierung definierter Allergenvarianten erfolgen. Dies könnte Nebenwirkungen während einer spezifischen Immuntherapie verringern und die Effektivität und Sicherheit der Therapie erhöhen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit monoklonaler IgE-Antikörper konnte bislang nur eine geringe Anzahl von IgE-Epitopen klinisch relevanter Allergene identifiziert werden. Informationen über Allergenitäts-vermitteltende Strukturen oder Eigenschaften von Antigenen sind daher zum jetzigen Zeitpunkt auf molekularer Ebene kaum vorhanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden variable Domänen, die zuvor dem Immunrepertoire allergischer Spender entnommen und im Format scFv-tragender Phagen anhand ihrer Reaktivität mit den Allergenen Bet v 1a bzw. Phl p 5a selektiert worden waren, auf das Format bivalenter Antikörper der Allergie-relevanten Isotoypen IgE, IgG, IgA übertragen. Die Expression in eukaryotischen HEK293-Zellen sowie affinitätschromatographische Reinigungen führten zum Erhalt verwendbarer Mengen authentischer IgE-Antikörper. Durch prokaryotische Expressionen konnten die Allergene für Interaktionsanalysen mit den Antikörpern bereitgestellt werden und mithilfe SPR-spektroskopischer Messungen wurden Bindungskonstanten der Antikörper im ein- und zweistelligen nanomolaren Bereich ermittelt. Die in anderen Studien gezeigten außerordentlich hohen Affinitäten von IgE-Antikörpern, konnten hier nicht verzeichnet werden.

Die Funktionalität der Antikörper konnte durch Bindungen an die jeweiligen Fc-Rezeptoren nachgewiesen werden und macht diese so immunologischen und diagnostischen Testsystemen zugänglich. Die Bindung von IgE-Antikörpern an den FcεRI sowie die Induktion der Signalkaskade konnten durch Degranulationsanalysen von Effektor-Zellen demonstriert werden. Hierbei konnte für den Phl p 5a-spezifischen IgE-Antikörper eine Allergen-induzierte Quervernetzung erreicht werden, was den *in vivio*-Mechanismus einer allergischen Soforttypreaktion reflektiert.

Mithilfe unterschiedliche Mutagenese-Strategien für die Expression der Allergene, anschließenden Immunblots und Visualisierungen der Allergene-Oberfläche konnten beide Epitope lokalisiert und essentielle, an der Bindung beteiligte Strukturelemente charakterisiert werden. Die Annahme, dass es sich bei IgE-Epitopen generell um flächige diskontinuirliche Epitope handelt konnte dabei nur bedingt demonstriert werden. Für beide Allergene konnten sequenzabhängige Strukturen identifiziert werden, die sich auf andere Proteine übertragen ließen. Ein einzelner Aminosäure-Austausch im Bet v 1a von Glu149, das in 95 % aller PR-10-Proteine konserviert vorliegt, führte zum Verlust der Reaktivität mit dem Antikörper. Bei dem Epitop des Phl p 5a-spezifischen Antikör-

pers handelt es sich um ein sterisch anspruchsvolles Helix-verbindendes Strukturelement, das ebenfalls Glutaminsäure-Reste trägt.

Die hier dargstellten originären allergenspezifischen IgE-, IgA- und IgG-Antikörper ermöglichten eine molekulare Analyse der Interaktion mit klinisch relevanten Majorallergenen sowie die Charakterisierung zweier authentischer B-Zell-Epitope. Diese Erkenntnisse sowie die Zugänglichkeit der Komponenten für weitere Anwendungen können einen Beitrag zum Verständnis der immunmodifizierenden Eigenschaften von Allergenen leisten. Ebenso können sie helfen, neue Ansätze zur Generierung verbesserter Wirkstoffe im Rahmen einer Immuntherapie zu entwickeln. Diese könnten erstmals auf der Kenntnis von IgE-Epitopen basieren, wodurch präzise defininierte Hypoallergene mit einer verminderten Anzahl an B-Zell Eptiotpen und gleichbleibender Immunogenität für eine sichere, hochwirksame allergenspezifische Immuntherapie entwickelt werden könnten.

7 ABSTRACT

The scarcity of monoclonal human IgE-antibodies with specificity for defined allergens is a bottleneck for the molecular characterisation of clinically relevant allergens and their epitopes. Thus identifying IgE-epitopes on a molecular level is currently a major challenge. Within the scope of this work it was possible to express variable antibody domains, which had been derived from the immunerepetoire of allergic patients and had been selected as scFv-displaying phages, with reactivity for the major pollen allergens Bet v 1a and Phl p 5a, as human IgE- IgG- and IgA-antibodies. Expression in eucaryotic HEK293-cells and purifications using different affinity chromatography techniques yielded in the acessibility of these genuine antibodies for further investigations. After procaryotic expression of the allergens, interaction analyses including initial SPR-spectroscopic measurements were carried out. Affinities with binding contstants in the medium nanomolar range could be detected which was contrary to very high affinities shown for other genuine IgE-antibodies.

It was possible to demonstrate the interaction of all antibody isotypes with their specific Fc-receptors, implicating functional integrity of the antibodies. This allows for their application in testsystems with diagnostic and immunulogcial backgrounds. Furthermore IgE-constructs binding to FcεRI on the surface of effector cells could be crosslinked and induced degranulation of the cells and a mediator release. For the Phl p 5-specific antibody, allergen-induced degranulation was acchieved, which reflects the *in vivo*-mechanism of an immediate Type I hypersensitivity reaction.

Different strategies for allergen mutagenesis followed by immunoblotting and visualisation of the molecular surfaces were applied by which both epitopes could be localized and essential structures for the interaction with the antibodies were characterized. The hypothesis that IgE-epitopes share a common feature of being laminar and discontigous was not observed. For both antibody epitopes sequence-dependent structures of the allergens, which could be transferred to non-reactive proteins, were identified. In the case of Bet v 1 a single amino acid exchange of the highly conserved Glu149 residue completely abolished antibody-binding of the allergen.

The epitope of the Phl p 5-specific antibody was composed by a sterically demanding helix-turn-helix motif, which also carried negatively charged glutamic acid residues.

The allergen-specific IgG, IgE and IgA antibody isotypes enabled detailed analysis on the molecular interactions of allergens with genuine human antibodies. The strategy pursued here might be adapted to a variety of settings and may contribute to a broader access to molecular components in order to dissect the immunmodulating characteristics of allergens. Furthermore the delineation of B-cell epitopes provides information, that assists in improving the production of engineered allergen variants with reduced IgE-reactivity but conserved T cell-reactivity for efficient and safe allergen-specific immunotherapy.

8 LITERATUR

Aas, K., 1978. What Makes an Allergen an Allergen. *Allergy*, 33(1), pp.3-14.

Ackerman, A.L. und Cresswell, P., 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature immunology*, 5(7), pp.678-84.

Akbari, O., DeKruyff, R.H. und Umetsu, D.T., 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature immunology*, 2(8), pp.725-31.

Akdis, C A *et al.*, 1996. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 98(7), pp.1676-83.

Akdis, M. und Akdis, C., 2009. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(8), pp.645-60.

Akkerdaas, J.H. *et al.*, 2003. How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents? *International archives of allergy and immunology*, 132(2), pp.132-40.

Altmann, F., 2007. The role of protein glycosylation in allergy. *International archives of allergy and immunology*, 142(2), pp.99-115.

Andersson, K., Areskoug, D. und Hardenborg, E., 1999. a. Exploring buffer space for molecular interactions. *J. Mol. Recognit.*, 12, pp.36-43.

Andréasson, U. *et al.*, 2006. The human IgE-encoding transcriptome to assess antibody repertoires and repertoire evolution. *Journal of molecular biology*, 362(2), pp.212-27.

Ansel, K.M. *et al.*, 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annual review of immunology*, 24, pp.607-56.

Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1994. Current Protocols inMolecularBiology.GreenePublishing AssociatesandWiley- Interscience, New York

Ball, T. *et al.*, 2009. Reducing allergenicity by altering allergen fold : a mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy*, (6), pp.569-580.

Barrios, Y., Jirholt, P. und Ohlin, M., 2004. Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor. *Journal of molecular recognition : JMR*, 17(4), pp.332-8.

Bartra, J. *et al.*, 2009. From pollinosis to digestive allergy. *Journal of investigational allergology und clinical immunology : official organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología*, 19 Suppl 1, pp.3-10.

Bauer, L. et al., 1997. Modulation of the allergic immune response in BALB/c mice by subcutaneous injection of high doses of the dominant T cell epitope from the major birch pollen allergen Bet v 1. *Clinical and experimental immunology*, 107(3), pp.536-41.

Bindslev-Jensen, C., 2003. Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods. *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), pp.81-87.

Blank, S *et al.*, 2011. Api m 10, a genuine A. mellifera venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy*, 2.

Boel, E. *et al.*, 2000. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *Journal of immunological methods*, 239(1-2), pp.153-66.

Bohle, B. *et al.*, 2006. Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118(1), pp.242-9.

Bousquet, J., Van Cauwenberge, P. und Khaltaev, N., 2001. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 108(5 Suppl), pp.S147-334.

Braren, Ingke *et al.*, 2007. Generation of human monoclonal allergen-specific IgE and IgG antibodies from synthetic antibody libraries. *Clinical chemistry*, 53(5), pp.837-44.

Bredehorst, R und David, K., 2001. What establishes a protein as an allergen? *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 756(1-2), pp.33-40.

Breiteneder, H. und Clare Mills, E.N., 2005. Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology advances*, 23(6), pp.395-9.

Bufe, A *et al.*, 1996. Crystallization and preliminary diffraction data of a major pollen allergen. Crystal growth separates a low molecular weight form with elevated biological activity. *The Journal of biological chemistry*, 271(44), pp.27193-6.

Bufe, A *et al.*, 1995. Major allergen PhZ p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. *Proteins*, 363, pp.6-12.

Bufe, Albrecht *et al.*, 2009. Safety and efficacy in children of an SQ-standardized grass allergen tablet for sublingual immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123(1), pp.167-173.e7.

Campana, R. *et al.*, 2011. Altered IgE epitope presentation: A model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. *Molecular immunology*, 48(4), pp.431-41.

Carnés, J., Ferrer, A. und Fernández-Caldas, E., 2006. Allergenicity of 10 different apple varieties. *Annals of allergy, asthma und immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, und Immunology*, 96(4), pp.564-70.

Casale, T.B. und Stokes, J.R., 2011. Future forms of immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(1), pp.8-15; quiz 16-7.

Casale, T.B. et al., 2006. Omalizumab pretreatment decreases acute reactions after rush immunotherapy for ragweed-induced seasonal allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117(1), pp.134-40.

Chan, S.L. *et al.*, 2008. Nuclear Magnetic Resonance Structure and IgE Epitopes of Blo t 5, a Major Dust Mite Allergen. *J. Immunol.*, 181(4), pp.2586-2596.

Chang, T.W., 2000. The pharmacological basis of anti-IgE therapy. *Nature Biotechnology*, pp.157-162.

Chiarella, P. und Fazio, V.M., 2008. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. *Biotechnology letters*, 30(8), pp.1303-10.

Christensen, L.H. *et al.*, 2008. Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 122(2), pp.298-304.

Constant, S. *et al.*, 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), pp.1591-6.

Corrigan, C.J. et al., 2005. Efficacy and safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six-grass pollen allergoid. *Allergy*, 60(6), pp.801-7.

Norman, P.S. et al., 1996. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(6 Pt 1), pp.1623-8.

Cromwell, Oliver, Häfner, D. und Nandy, A., 2011. Recombinant allergens for specific immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(4), pp.865-72.

Crothers, D.M. und Metzger, H., 1972. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry*, 9, pp.341-357.

Deus-de-Oliveira, N. *et al.*, 2011. Identification of Critical Amino Acids in the IgE Epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the Application of Glutamic Acid as an IgE Blocker. *PloS one*, 6(6), p.e21455.

Devereux, G., 2006. asthma and allergy : food for thought. *Nature*, 6(November), pp.869-874.

Didier, A. *et al.*, 2007. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(6), pp.1338-45.

Dmitriev, D. *et al.*, 2002. Analysis of bispecific monoclonal antibody binding to immobilized antigens using an optical biosensor. *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(12), pp.1356-65.

Durham, S R *et al.*, 1996. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 97(6), pp.1356-65.

Durham, Stephen R und Leung, D.Y.M., 2011. One hundred years of allergen immunotherapy: time to ring the changes. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(1), pp.3-7.

Ebo, D.G. *et al.*, 2004. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(1), pp.137-44.

Egger, M. *et al.*, 2006. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy*, 61(4), pp.461-76.

Fallon, P.G. und Mangan, N.E., 2007. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nature reviews. Immunology*, 7(3), pp.220-30.

Flicker, Sabine *et al.*, 2000. A Human Monoclonal IgE Antibody Defines a Highly Allergenic Fragment of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 5: Molecular, Immunological, and Structural Characterization of the Epitope-Containing Domain 1. *Pharmacia*, (27).

Gadermaier, E. *et al.*, 2010. Analysis of the antibody responses induced by subcutaneous injection immunotherapy with birch and Fagales pollen extracts adsorbed onto aluminum hydroxide. *International archives of allergy and immunology*, 151(1), pp.17-27.

Gajhede, M., 1996. xray and nmr structure of Betv1. *nature structural biology*.

Galli, S.J., Tsai, M. und Piliponsky, A.M., 2008. The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.445-54.

Geha, R.S., 2003. Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. *Curr Opin Immunol*, 15(6), pp.603-608.

Gehlhar, K. *et al.*, 2006. Lysine as a critical amino acid for IgE binding in Phl p 5b C terminus. *International archives of allergy and immunology*, 140(4), pp.285-94.

Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A. (1963) The classification of allergicreactions underlying disease. *In Clinical Aspects of Immunology* Blackwell Science

Georas, S.N. *et al.*, 2005. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 26(6), pp.1119-37.

Gieras, A. *et al.*, 2011. Mapping of Conformational IgE Epitopes with Peptide-Specific Monoclonal Antibodies Reveals Simultaneous Binding of Different IgE Antibodies to a Surface Patch on the Major Birch Pollen Allergen, Bet v 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(9), pp.5333-5344.

Grevers, G., Röcken, M. und Wirth, J., 2008. *Taschenatlas Allergologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik [Broschiert]*, Thieme, Stuttgart.

Gri, G. *et al.*, 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*, 29(5), pp.771-81.

Griffin, H.M. und Ouwehand, W.H., 1995. A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (P1A1, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. *Blood*, 86(12), pp.4430-6.

Grote, M., 1991. Immunogold electron microscopy of soluble proteins: localization of Bet v I major allergen in ultra-thin sections of birch pollen after anhydrous fixation techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 39(10), pp.1395-401.

Grönlund, H. und Gafvelin, G., 2010. Recombinant Bet v 1 vaccine for treatment of allergy to birch pollen. *Human vaccines*, 6(12), pp.970-7.

Hammad, H. und Lambrecht, B.N., 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature reviews. Immunology*, 8(3), pp.193-204.

Hantusch, B. *et al.*, 2004. Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, pp.1294-1300.

Hantusch, B. *et al.*, 2005. Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: discrepancy between IgE and IgG binding strength. *Immunology letters*, 97(1), pp.81-9.

Henmar, H. *et al.*, 2008. Allergenicity, immunogenicity and dose-relationship of three intact allergen vaccines and four allergoid vaccines for subcutaneous grass pollen immunotherapy. *Clinical and experimental immunology*, 153(3), pp.316-23.

Herrick, C. a und Bottomly, Kim, 2003a. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), pp.405-12.

Herrick, C. a und Bottomly, Kim, 2003b. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), pp.405-12.

Hewitt, C.R. *et al.*, 1995. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), pp.1537-44.

Holm, J. *et al.*, 2011. Epitope Grafting, Re-creating a Conformational Bet v 1 Antibody Epitope on the Surface of the Homologous Apple Allergen Mal d 1. *The Journal of biological chemistry*, 286(20), pp.17569-78.

Hufnagl, K. et al., 2005. Intranasal tolerance induction with polypeptides derived from 3 non-cross-reactive major aeroallergens prevents allergic polysensitization in mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(2), pp.370-6.

Ishizaka, K., Ishizaka, T. und Hornbrook, M.M., 1966. Physico-Chemical Properties of Human Reaginic Antibody: IV. Presence of a Unique Immunoglobulin as a Carrier of Reaginic Activity. *J. Immunol.*, 97(1), pp.75-85.

Jacobsen, L. *et al.*, 2007. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy*, 62(8), pp.943-8.

Jahn-Schmid, B. *et al.*, 2005. Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(1), pp.213-9.

Jakobsen, C.G. *et al.*, 2004. Isolation of high-affinity human IgE and IgG antibodies recognising Bet v 1 and Humicola lanuginosa lipase from combinatorial phage libraries. *Molecular immunology*, 41(10), pp.941-53.

Jarolim, E. *et al.*, 1989. IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of Betula verrucosa. *Allergy*, 44(6), pp.385-95.

Jutel, M. und Akdis, C. a, 2008. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chemical immunology and allergy*, 94(II), pp.158-77.

Jutel, M. et al., 2005. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(3), pp.608-13.

Kahlert, H. *et al.*, 2008. Characterization of a hypoallergenic recombinant Bet v 1 variant as a candidate for allergen-specific immunotherapy. *International archives of allergy and immunology*, 145(3), pp.193-206.

Karp, C.L., 2010. Guilt by intimate association: what makes an allergen an allergen? *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(5), pp.955-60; quiz 961-2.

Larché, M., 2010. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy: are oral Langerhans cells the masters of tolerance? *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(3), pp.646-7.

Larché, M., 2007. Immunotherapy with allergen peptides. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 3(2), pp.53-9.

Larché, M., Akdis, C. und Valenta, R., 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature*, 6, pp.761-771.

Li, M. *et al.*, 2008. Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *The Journal of biological chemistry*, 283(33), pp.22806-14.

Ling, E.M. *et al.*, 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*, 363(9409), pp.608-15.

Linhart, B. et al., 2008. A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6. *Biological chemistry*, 389(7), pp.925-33.

Marković-Housley, Z. *et al.*, 2003. Crystal Structure of a Hypoallergenic Isoform of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 and its Likely Biological Function as a Plant Steroid Carrier. *Journal of Molecular Biology*, 325(1), pp.123-133.

Marogna, M. *et al.*, 2010. Long-lasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15-year prospective study. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(5), pp.969-75.

Marshall, J.S. *et al.*, 1996. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *The Journal of clinical investigation*, 97(4), pp.1122-8.

Marth, K. *et al.*, 2010. Tracing antigen signatures in the human IgE repertoire. *Molecular immunology*, 47(14), pp.2323-9.

Mazzoni, A. *et al.*, 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *The Journal of clinical investigation*, 108(12), pp.1865-73.

Meiler, F. *et al.*, 2008. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *The Journal of experimental medicine*, 205(12), pp.2887-98.

Midoro-Horiuti, T, Brooks, E.G. und Goldblum, R M, 2001. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Annals of allergy, asthma und immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, und Immunology*, 87(4), pp.261-71.

Mirza, O. *et al.*, 2000. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *The Journal of Immunology*, 165(1), p.331.

Movérare, R. *et al.*, 2002. Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System. *Allergy*, 57(5), pp.423-30.

Mudde, G.C. *et al.*, 1990. IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture? *Immunology today*, 11(12), pp.440-3.

Müller, U. et al., 1998. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 101(6 Pt 1), pp.747-54.

Mullis, K. *et al.*, 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, pp.263-73.

Murphy, K.M., Travers, P. und Walport, M., 2009. *Janeway Immunologie (German Edition)*, Spektrum Akademischer Verlag.

Nakanishi, K. *et al.*, 1995. IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG1 production in vitro and in vivo. *International immunology*, 7(2), pp.259-68.

Neerven, R.J.J.V. und Bufe, Albrecht, 1999. Identification of isoform-specific T-cell epitopes in the major timothy grass pollen allergen , Phl p 5. *Science*, 29, pp.1614-1625.

Niederberger, V. et al., 2004. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 Suppl , pp.14677-82.

Niemi, M. *et al.*, 2007. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. *Structure (London, England : 1993)*, 15(11), pp.1413-21.

Noon, L., 1911. Prophylactic inoculation against hayfever. *Lancet*.;1:1572.

Norman, P.S. et al., 1996. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(6 Pt 1), pp.1623-8.

Ohkawara, Y. *et al.*, 1996. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *The Journal of clinical investigation*, 97(7), pp.1761-6.

Oldfield, W.L.G., Larché, M. & Kay, A.B., 2002. Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomised controlled trial. *Lancet*, 360(9326), pp.47-53.

Ozdemir, C., Akdis, M. und Akdis, C. a, 2009. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clinical und Experimental Allergy*, 39(5), pp.626-639.

O'Shea, J.J. *et al.*, 2011. Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. *Nature reviews. Immunology*, 11(4), pp.239-50.

Padavattan, S. *et al.*, 2009. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(4), pp.2141-51.

Padavattan, S. *et al.*, 2007. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *Journal of molecular biology*, 368(3), pp.742-52.

Pauli, G. et al., 2008. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *Clinical Immunology*, pp.951-960.

Persson, H. *et al.*, 2007. Delineating the specificity of an IgE-encoding transcriptome. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(5), pp.1186-92.

Perucho, M., Hanahan, D. und Wigler, M., 1980. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell*, 22(1 Pt 1), pp.309-317.

Pilette, C. *et al.*, 2007. Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *Journal of immunology*, 178(7), pp.4658-66.

Plückthun, A. und Pack, P., 1997. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology*, 3(2), pp.83–105.

Pomés, A., 2010. Relevant B cell epitopes in allergic disease. *International archives of allergy and immunology*, 152(1), pp.1-11.

Pène, J. *et al.*, 1988. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *Journal of immunology* , 141(4), pp.1218-24.

Pree, I. et al., 2010. Inhibition of CD23-dependent facilitated allergen binding to B cells following vaccination with genetically modified hypoallergenic Bet v 1 molecules. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(9), pp.1346-52.

Rajashankar, K. *et al.*, 2002. Structure of the functional domain of the major grass-pollen allergen Phlp 5b. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(7), pp.1175-1181.

Ring, Johannes, 2003. Angewandte Allergologie, Urban und Vogel.

Des Roches, A. *et al.*, 1997. Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 99(4), pp.450-3.

Rocklin, R.E. *et al.*, 1980. Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. *The New England journal of medicine*, 302(22), pp.1213-9.

Saarne, T. *et al*., 2011. Treatment with a Fel d 1 hypoallergen reduces allergic responses in a mouse model for cat allergy. *Allergy*, 66(2), pp.255-63.

Sambrook, J. et al.,1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5463-7.

Scadding, G.K. und Brostoff, J., 1986. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite. *Clinical allergy*, 16(5), pp.483-91.

Scala, E. *et al.*, 2010. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(6), pp.911-21.

Schein, C.H. *et al.*, 2010. An Allergen Portrait Gallery: Representative Structures and an Overview of IgE Binding Surfaces. *Bioinformatics and biology insights*, 4, pp.113-25.

Schuck, P., 1997. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 26, pp.541-66.

Schöll, I. *et al.*, 2010. Dimerization of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 Is Important for its In Vivo IgE-Cross-Linking Potential in Mice. *The Journal of Immunology*.

Seismann, Henning *et al.*, 2010. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Molecular immunology*, 47(4), pp.799-808.

Son, D.Y. *et al.*, 1999. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *European journal of nutrition*, 38(4), pp.201-15.

Spangfort, Michael D. *et al.*, 1999. Crystallization and preliminary X-ray analysis of birch-pollen allergen Bet v 1 in complex with a murine monoclonal IgG Fab′ fragment. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 55(12), pp.2035-2036.

Steinberger, P, Kraft, D und Valenta, R, 1996. Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. *J. Biol. Chem.*, 271, pp.10967-10972.

Swoboda, In. *et al.*, 1995. Isoforms of Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen, Analyzed by Liquid Chromatography, Mass Specrometry and cDNA Cloning.

Taketomi, E.A. *et al.*, 2006. Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 72(4), pp.562-7.

Tanaka, H. *et al.*, 2000. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *The Journal of experimental medicine*, 192(3), pp.405-12.

Till, S.J. *et al.*, 2004. Mechanisms of immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113(6), pp.1025-34; quiz 1035.

Valenta, R und Kraft, D, 2001. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunological reviews*, 179, pp.119-27.

Valenta, Rudolf, 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature reviews. Immunology*, 2(6), pp.446-53.

Verhagen, J. *et al.*, 2006. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: T-regulatory cells and more. *Immunology and allergy clinics of North America*, 26(2), pp.207-31, vi.

Vieths, S *et al.*, 1995. Isolation and characterization of the 18-kDa major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v I). *Allergy*, 50(5), pp.421-30.

Vieths, Stefan, Scheurer, Stephan und Ballmer-Weber, B., 2002. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964, pp.47-68.

Vrtala, S, 2008. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy*, 63(3), pp.299-309.

Vrtala, S *et al.*, 1999. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (Phleum pratense) pollen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), pp.5489-96.

Wachholz, P.A. *et al.*, Mechanisms of allergy Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *Clinical Immunology*.

Wahn, Ulrich *et al.*, 2009. Efficacy and safety of 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123(1), pp.160-166.e3.

Wallner, M. et al., 2009. The influence of recombinant production on the immunologic behavior of birch pollen isoallergens. *PloS one*, 4(12), p.e8457.

Webber, C.M. und England, R.W., 2010. Oral allergy syndrome: a clinical, diagnostic, and therapeutic challenge. *Annals of allergy, asthma und immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, und Immunology*, 104(2), pp.101-8; quiz 109-10, 117.

Weber, R.W., 2003. Patterns of pollen cross-allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112(2), pp.229-39; quiz 240.

Williams, A., Henzgen, M. & Rajakulasingam, K., 2007. Additional benefit of a third year of specific grass pollen allergoid immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinitis. *European annals of allergy and clinical immunology*, 39(4), pp.123-6.

Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), pp.1393-8.

Yamanaka, K.-ichi *et al.*, 2009. Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(4), pp.842-5.e7.

Yang, T. *et al.*, 2003. Investigations of bivalent antibody binding on fluid-supported phospholipid membranes: the effect of hapten density. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), pp.4779-84.

Zaborsky, N. *et al.*, 2010. Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(2), pp.725-35.

Zielen, S., Kardos, P. & Madonini, E., 2010. Steroid-sparing effects with allergen-specific immunotherapy in children with asthma: a randomized controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(5), pp.942-9.

Zhu, D. et al., 2005. A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nature medicine*, 11(4), pp.446-9.

9 ANHANG

9.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5`-3`-Richtung angegeben.

Oligonukleotide für die cDNA-Synthese aus mRNA:

Oligo-dT-24: ttttttttttttttttttttttt

Oligonukleotide für Punktmutationen mithilfe des *Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kits:*

IgAQC Xho for : gcaccgaccggccctggaggacctgctctt

IgAQC Xho back: taagagcaggtcctccagggccggtcggtgc

Oligonukeotide für prokaryotische Expresionvektoren:

18 for: gatccatatg gcaggtaaggcgacgaccgag

19 back: gatcgctcttccgcagccggcgatgatgcggag

20 for: gatccatatgaagtacaggacgttcgtcgcaacc

21 back: gatcgctcttccgcacttgtaggcggcgtcgagctt g

37 for: gaccacacaaacttcaaatacaattacagcgtga tcggggacggtccc

38 for: gatcaagctttcaaacggccctcaaaagtgtctcg cccatttctttacttgccttaacctgc

39 for: gatcgaattcggtgtatttaattatgagactgagac cacc

40 back: ctttacttgccttaacctgctctgccttcacctcatgg tcgcctttggtg

41 for: cctttcaagtacgtgaaggacagagttggaggtg gaccacacaaacttc

42 for: gatcgaattcagctttcccgaggcttccctttcaa gtacgtg

44 for: atcgagggcggtcccataggcgacacattgga gaagatctccaacgagata

45 back: gtaggcatcggagtgtgccaagaggtagctctc aacggccctcaaaag

46 back: gatcaagctttcaatggtgatggtggtgatggttg taggcatcagagtgtg

59 back: atcggagtgtgccaagaggtagctcccaac

60 for: gatcgaattccccataggcgacacattggaga ag

61 for: gatcgaattcgatggaggatccatcttgaagatc agcaac

63 for: gatcgaattcaaaggcgaccatgaggtgaagg cag

64 back: cggcggcgcccttgggctcgcccgagaggcc ctccgcgaaggccttgttggaggccgagggaa ggcggcctcg

65 for: cccaagggcgccgccgaatccagctccaagg ccgcgctcacctccctcgacgccgcctacagcg

66 back: gatcgctcttcggcagccggcgatgacgcgg ag

67 for: gatcgaattcggtgtctacacatttgagaacgag tac

Oligonukleotide für eukaryotische Expressionsvektoren:

V_H SmiEVQLVES for:	gatcatttaaatgtgtccagtgtg aggtgcagctggtggagtc	IgA His Xba back:	gatctctagatcaatggtggtgat ggtagcaggtgccgtccacc
V_H B1-2-xho-back:	gatcctcgagacggtgaccggg gttc	IgA2 hinge sgs for:	gatcggcgcgccctgccgagttc ccccacctccc
V_H Valenta xho back:	gatcctcgagacggtgaccagg gtac	IgA xho for:	gatcctcgagcgcatccccgac cagcc
V_L val-sda-for:	gatccctgcagggtgccagatgt gagctcacccagtctccatc	IgA Sfi His back:	gatcggcccagccggcctcaat ggtggtgatggtagcaggtgccgt ccacc
V_L AsiSI back:	gatcgcgatcgcacgtttgatttcc cc	IgG1Sfi His back:	gatcggcccagccggcctcaatg gtggtgatgtttacccggagacag gga
V_L sbf QSVLT for:	gatccctgcagggtgccagatgtc agtctgtgctgactc	IgG4Sfi His back:	gatcggcccagccggcctcaatg gtggtgatgtttacccagagacag gga
C_L lambda AsiSI for:	gatcgcgatcgcacagcccaagg ctgccc	IgG Xho for:	gatcctcgagcgcctccaccaag ggccc
C_L xba lambda back:	gatctctagactatgaacattctg taggggc	V_L v375 Asis back:	gatcgcgatcgcacctaggacgg tcagcttggt
IgA1Sgs for:	gatcggcgcgcccgttccctcaac tccacctaccccatctc		

9.2 Sequenzdaten

Sequenzen der scFv

Bet v 1a-spezifisches scFv:

```
atggccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctg
 M  A  E  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L
agactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgc
 R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R
caggctccaggcaaggggctggaatgggtggcagttatatcatatgatggaagtaataaa
 Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  S  Y  D  G  S  N  K
tactatgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaactccaagaacacg
 Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T
ctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaa
 L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
tttgggactcaaagtaggaaattcgacccctggggccagggaaccccggtcaccgtctcg
 F  G  T  Q  S  R  K  F  D  P  W  G  Q  G  T  P  V  T  V  S
agtggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtagtgcacttcagtctgtgctg
 S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  S  A  L  Q  S  V  L
actcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcttgttctgga
 T  Q  P  P  S  A  S  G  T  P  G  Q  R  V  T  I  S  C  S  G
agcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccagcagctcccaggaacggcc
```

```
 S  S  S  N  I  G  S  N  Y  V  Y  W  Y  Q  Q  L  P  G  T  A
cccaaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctct
 P  K  L  L  I  Y  R  N  N  Q  R  P  S  G  V  P  D  R  F  S
ggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccggtccgaggatgag
 G  S  K  S  G  T  S  A  S  L  A  I  S  G  L  R  S  E  D  E
gctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgggtacgtttttggtattcggcgga
 A  D  Y  Y  C  A  A  W  D  D  S  L  G  T  F  L  V  F  G  G
gggaccaagctgaccgtcctaggt
 G  T  K  L  T  V  L  G
```

Phl p 5a-spezifisches scFv:

```
atggccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctg
 M  A  E  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L
agactctcctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgaaatatactgggtccgc
 R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  E  I  Y  W  V  R
caggctccaggcaaggggtgggtggcaatgatatcaattgatgaaaccaataaacattac
 Q  A  P  G  K  G  W  V  A  M  I  S  I  D  E  T  N  K  H  Y
gcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
 A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcaagatggaac
 L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  N
aactggaaccaccgggggatggtttttgcttttgatctctggggccaaggtaccctggtc
 N  W  N  H  R  G  M  V  F  A  F  D  L  W  G  Q  G  T  L  V
accgtctcgagtggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtagtgcacttgag
 T  V  S  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  S  A  L  E
ctcacccagtctccatcttccgtgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgc
 L  T  Q  S  P  S  S  V  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C
cgggcgagtcagggtattagcagttggttagcctggtatcagcagaaaccagggaaagcc
 R  A  S  Q  G  I  S  S  W  L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A
cctaaactcctgatctattctgcatccagtttgcaaagtggggtcccgtcaaggttcagc
 P  K  L  L  I  Y  S  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S
ggcagtggatctgggacagatttcagtctcaccatcagcagcctgcaacctgaagatttt
 G  S  G  S  G  T  D  F  S  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F
gcaacttactattgtcaacaggctaacagtttcccgtacacttttggccaggggaccaag
 A  T  Y  Y  C  Q  Q  A  N  S  F  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K
gtggaaatcaaacgtg
 V  E  I  K  R
```

Sequenzen schwerer konstanter Immunglobulin-Domänen

$\varepsilon C_H 1\text{-}4$:

```
gcctccacacagagcccatccgtcttccccttgacccgctgctgcaaaaacattccctcc
 A  S  T  Q  S  P  S  V  F  P  L  T  R  C  C  K  N  I  P  S
aatgccacctccgtgactctgggctgcctggccacgggctacttcccggagccggtgatg
 N  A  T  S  V  T  L  G  C  L  A  T  G  Y  F  P  E  P  V  M
gtgacctgggacacaggctccctcaacgggacaactatgaccttaccagccaccaccctc
 V  T  W  D  T  G  S  L  N  G  T  T  M  T  L  P  A  T  T  L
acgctctctggtcactatgccaccatcagcttgctgaccgtctcgggtgcgtgggccaag
 T  L  S  G  H  Y  A  T  I  S  L  L  T  V  S  G  A  W  A  K
cagatgttcacctgccgtgtggcacacactccatcgtccacagactgggtcgacaacaaa
 Q  M  F  T  C  R  V  A  H  T  P  S  S  T  D  W  V  D  N  K
accttcagcgtctgctccagggacttcaccccgcccaccgtgaagatcttacagtcgtcc
 T  F  S  V  C  S  R  D  F  T  P  P  T  V  K  I  L  Q  S  S
tgcgacggcggcgggcacttccccccgaccatccagctcctgtgcctcgtctctgggtac
 C  D  G  G  G  H  F  P  P  T  I  Q  L  L  C  L  V  S  G  Y
accccagggactatcaacatcacctggctggaggacgggcaggtcatggacgtggacttg
 T  P  G  T  I  N  I  T  W  L  E  D  G  Q  V  M  D  V  D  L
tccaccgcctctaccacgcaggagggtgagctggcctccacacaaagcgagctcaccctc
 S  T  A  S  T  T  Q  E  G  E  L  A  S  T  Q  S  E  L  T  L
agccagaagcactggctgtcagaccgcacctacacctgccaggtcacctatcaaggtcac
 S  Q  K  H  W  L  S  D  R  T  Y  T  C  Q  V  T  Y  Q  G  H
acctttgaggacagcaccaagaagtgtgcagattccaacccgagaggggtgagcgcctac
 T  F  E  D  S  T  K  K  C  A  D  S  N  P  R  G  V  S  A  Y
ctaagccggcccagcccgttcgacctgttcatccgcaagtcgcccacgatcacctgtctg
 L  S  R  P  S  P  F  D  L  F  I  R  K  S  P  T  I  T  C  L
gtggtggacctggcacccagcaaggggaccgtgaacctgacctggtcccgggccagtggg
 V  V  D  L  A  P  S  K  G  T  V  N  L  T  W  S  R  A  S  G
aagcctgtgaaccactccaccagaaaggaggagaagcagcgcaatggcacgttaaccgtc
 K  P  V  N  H  S  T  R  K  E  E  K  Q  R  N  G  T  L  T  V
acgtccaccctgccggtgggcacccgagactggatcgaggggggagacctaccagtgcagg
 T  S  T  L  P  V  G  T  R  D  W  I  E  G  E  T  Y  Q  C  R
gtgacccacccccacctgcccagggccctcatgcggtccacgaccaagaccagcggcccg
 V  T  H  P  H  L  P  R  A  L  M  R  S  T  T  K  T  S  G  P
cgtgctgccccggaagtctatgcgtttgcgacgccggagtggccggggagccgggacaag
 R  A  A  P  E  V  Y  A  F  A  T  P  E  W  P  G  S  R  D  K
cgcaccctcgcctgcctgatccagaacttcatgcctgaggacatctcggtgcagtggctg
 R  T  L  A  C  L  I  Q  N  F  M  P  E  D  I  S  V  Q  W  L
cacaacgaggtgcagctcccggacgcccggcacagcacgacgcagccccgcaagaccaag
 H  N  E  V  Q  L  P  D  A  R  H  S  T  T  Q  P  R  K  T  K
ggctccggcttcttcgtcttcagccgcctggaggtgaccagggccgaatgggagcagaaa
 G  S  G  F  F  V  F  S  R  L  E  V  T  R  A  E  W  E  Q  K
gatgagttcatctgccgtgcagtccatgaggcagcgagcccctcacagaccgtccagcga
```

```
 D  E  F  I  C  R  A  V  H  E  A  A  S  P  S  Q  T  V  Q  R
gcggtgtctgtaaatcccggtaaa
 A  V  S  V  N  P  G  K
```

$\alpha 1C_H 1$-3:

```
gcatccccgaccagccccaaggtcttcccgctgagcctctgcagcacccagccagatggg
 A  S  P  T  S  P  K  V  F  P  L  S  L  C  S  T  Q  P  D  G
aacgtggtcatcgcctgcctggtccagggcttcttcccccaggagccactcagtgtgacc
 N  V  V  I  A  C  L  V  Q  G  F  F  P  Q  E  P  L  S  V  T
tggagcgaaagcggacagggcgtgaccgccagaaacttcccacccagccaggatgcctcc
 W  S  E  S  G  Q  G  V  T  A  R  N  F  P  P  S  Q  D  A  S
ggggacctgtacaccacgagcagccagctgaccctgccggccacacagtgcctagccggc
 G  D  L  Y  T  T  S  S  Q  L  T  L  P  A  T  Q  C  L  A  G
aagtccgtgacatgccacgtgaagcactacacgaatcccagccaggatgtgactgtgccc
 K  S  V  T  C  H  V  K  H  Y  T  N  P  S  Q  D  V  T  V  P
tgcccagttccctcaactccacctaccccatctccctcaactccacctaccccatctccc
 C  P  V  P  S  T  P  P  T  P  S  P  S  T  P  P  T  P  S  P
tcatgctgccacccccgactgtcactgcaccgaccggccctcgaggacctgctcttaggt
 S  C  C  H  P  R  L  S  L  H  R  P  A  L  E  D  L  L  L  G
tcagaagcgaacctcacgtgcacactgaccggcctgagagatgcctcaggtgtcaccttc
 S  E  A  N  L  T  C  T  L  T  G  L  R  D  A  S  G  V  T  F
acctggacgccctcaagtgggaagagcgctgttcaaggaccacctgaccgtgacctctgt
 T  W  T  P  S  S  G  K  S  A  V  Q  G  P  P  D  R  D  L  C
ggctgctacagcgtgtccagtgtcctgccgggctgtgccgagccatggaaccatgggaag
 G  C  Y  S  V  S  S  V  L  P  G  C  A  E  P  W  N  H  G  K
accttcacttgcactgctgcctaccccgagtccaagaccccgctaaccgccacccctctca
 T  F  T  C  T  A  A  Y  P  E  S  K  T  P  L  T  A  T  L  S
aaatccggaaacacattccggcccgaggtccacctgctgccgccgccgtcggaggagctg
 K  S  G  N  T  F  R  P  E  V  H  L  L  P  P  P  S  E  E  L
gccctgaacgagctggtgacgctgacgtgcctggcacgtggcttcagccccaaggatgtg
 A  L  N  E  L  V  T  L  T  C  L  A  R  G  F  S  P  K  D  V
ctggttcgctggctgcaggggtcacaggagctgccccgcgagaagtacctgacttgggca
 L  V  R  W  L  Q  G  S  Q  E  L  P  R  E  K  Y  L  T  W  A
tcccggcaggagcccagccagggcaccaccaccttcgctgtgaccagcatactgcgcgtg
 S  R  Q  E  P  S  Q  G  T  T  T  F  A  V  T  S  I  L  R  V
gcagccgaggactggaagaaggggacaccttctcctgcatggtgggccacgaggccctg
 A  A  E  D  W  K  K  G  D  T  F  S  C  M  V  G  H  E  A  L
ccgctggccttcacacagaagaccatcgaccgcttggcgggtaaacccacccatgtcaat
 P  L  A  F  T  Q  K  T  I  D  R  L  A  G  K  P  T  H  V  N
gtgtctgttgtcatggcggaggtggacggcacctgctac
 V  S  V  V  M  A  E  V  D  G  T  C  Y
```

$\alpha 2C_H 1\text{-}3$:

```
gcatccccgaccagccccaaggtcttcccgctgagcctcgacagcacccccaagatggg
 A  S  P  T  S  P  K  V  F  P  L  S  L  D  S  T  P  Q  D  G
aacgtggtcgtcgcatgcctggtccagggcttcttcccccaggagccactcagtgtgacc
 N  V  V  V  A  C  L  V  Q  G  F  F  P  Q  E  P  L  S  V  T
tggagcgaaagcggacagaacgtgaccgccagaaacttcccacctagccaggatgcctcc
 W  S  E  S  G  Q  N  V  T  A  R  N  F  P  P  S  Q  D  A  S
ggggacctgtacaccacgagcagccagctgaccctgccggccacacagtgcccagacggc
 G  D  L  Y  T  T  S  S  Q  L  T  L  P  A  T  Q  C  P  D  G
aagtccgtgacatgccacgtgaagcactacacgaattccagccaggatgtgactgtgccc
 K  S  V  T  C  H  V  K  H  Y  T  N  S  S  Q  D  V  T  V  P
tgccgagttcccccacctcccccatgctgccacccccgactgtcgctgcaccgaccggcc
 C  R  V  P  P  P  P  P  C  C  H  P  R  L  S  L  H  R  P  A
ctcgaggacctgctcttaggttcagaagcgaacctcacgtgcacactgaccggcctgaga
 L  E  D  L  L  L  G  S  E  A  N  L  T  C  T  L  T  G  L  R
gatgcctctggtgccaccttcacctggacgccctcaagtgggaagagcgctgttcaagga
 D  A  S  G  A  T  F  T  W  T  P  S  S  G  K  S  A  V  Q  G
ccacctgagcgtgacctctgtggctgctacagcgtgtccagtgtcctgcctggctgtgcc
 P  P  E  R  D  L  C  G  C  Y  S  V  S  S  V  L  P  G  C  A
cagccatggaaccatggggagaccttcacctgcactgctgcccaccccgagttgaagacc
 Q  P  W  N  H  G  E  T  F  T  C  T  A  A  H  P  E  L  K  T
ccactaaccgccaacatcacaaaatccggaaacacattccggcccgaggtccacctgctg
 P  L  T  A  N  I  T  K  S  G  N  T  F  R  P  E  V  H  L  L
ccgccgccgtcggaggagctggccctgaacgagctggtgacgctgacgtgcctggcacgt
 P  P  P  S  E  E  L  A  L  N  E  L  V  T  L  T  C  L  A  R
ggcttcagccccaaggatgtgctggttcgctggctgcaggggtcacaggagctgccccgc
 G  F  S  P  K  D  V  L  V  R  W  L  Q  G  S  Q  E  L  P  R
gagaagtacctgacttgggcatcccggcaggagcccagccagggcaccaccaccttcgct
 E  K  Y  L  T  W  A  S  R  Q  E  P  S  Q  G  T  T  T  F  A
gtgaccagcatactgcgcgtggcagccgaggactggaagaaggggggacaccttctcctgc
 V  T  S  I  L  R  V  A  A  E  D  W  K  K  G  D  T  F  S  C
atggtgggccacgaggccctgccgctggccttcacacagaagaccatcgaccgcttggcg
 M  V  G  H  E  A  L  P  L  A  F  T  Q  K  T  I  D  R  L  A
ggtaaacccacccatgtcaatgtgtctgttgtcatggcggaggtggacggcacctgctac
 G  K  P  T  H  V  N  V  S  V  V  M  A  E  V  D  G  T  C  Y
```

$\gamma 1C_H 1\text{-}3$:

```
gcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
 A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S  K  S  T  S  G
ggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
 G  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctca
 W  N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S
ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
```

```
 G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  Q  T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccc
 Y  I  C  N  V  N  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  K  V  E  P
aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggga
 K  S  C  D  K  T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G
ccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct
 P  S  V  F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P
gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgg
 E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  H  E  D  P  E  V  K  F  N  W
tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaac
 Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N
agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
 S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K
gagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgag
 K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E
ctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
 L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I
gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg
 A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V
ctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg
 L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W
cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T
cagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
 Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K  -
```

γG4C$_H$1-3:

```
gcttccaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgag
 A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  C  S  R  S  T  S  E
agcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
 S  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagkcctca
 W  N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  X  S
ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacc
 G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  K  T
tacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcc
 Y  T  C  N  V  D  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  E  S
aaatatggtcccccatgcccatcatgcccagcacctgagttcctgggggggaccatcagtc
 K  Y  G  P  P  C  P  S  C  P  A  P  E  F  L  G  G  P  S  V
ttcctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggacccctgaggtcacg
 F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T
tgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggat
 C  V  V  V  D  V  S  Q  E  D  P  E  V  Q  F  N  W  Y  V  D
```

```
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtac
 G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  F  N  S  T  Y
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgarcggcaaggagtacaag
 R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  X  G  K  E  Y  K
tgcaaggtctccarcaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaamgccama
 C  K  V  S  X  K  G  L  P  S  S  I  E  K  T  I  S  X  A  X
gggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgaccaag
 G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  Q  E  E  M  T  K
aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggag
 N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
 W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S
gacggctccttcttcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagktggcaggagggg
 D  G  S  F  F  L  Y  S  R  L  T  V  D  K  S  X  W  Q  E  G
aatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
 N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S
ctctccctgtctctgggtaaa
 L  S  L  S  L  G  K
```

Sequenzen leichter konstanter Immunglobulin-Domänen

κC_L:

```
cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S
ggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q
tggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggac
 W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E  Q  D
agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E
aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag
 K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K
agcttcaacaggggagagtgt
 S  F  N  R  G  E  C
```

λC_L:

```
ctccagccgccctcagtgtctgcggccccaggacagaaggtcatcatctcctgctccgga
 L  Q  P  P  S  V  S  A  A  P  G  Q  K  V  I  I  S  C  S  G
agcagctcccacactggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcc
 S  S  S  H  T  G  Q  P  K  A  A  P  S  V  T  L  F  P  P  S
tctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccg
 S  E  E  L  Q  A  N  K  A  T  L  V  C  L  I  S  D  F  Y  P
ggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagacc
```

```
 G  A  V  T  V  A  W  K  A  D  S  S  P  V  K  A  G  V  E  T
accacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgacg
 T  T  P  S  K  Q  S  N  N  K  Y  A  A  S  S  Y  L  S  L  T
cctgagcagtggaagtcccacaaaagctacagttgccaggtcacgcatgaagggagcacc
 P  E  Q  W  K  S  H  K  S  Y  S  C  Q  V  T  H  E  G  S  T
gtggagaagacagtggcccctacagaatgttca
 V  E  K  T  V  A  P  T  E  C  S
```

Sequenzen der Allergene

Bet v 1a:

```
ttcggtgtatttaattatgagactgagaccacctctgttatcccagcagctaggctgttc
 F  G  V  F  N  Y  E  T  E  T  T  S  V  I  P  A  A  R  L  F
aaggcctttatcctcgatggcgataatctcattccaaaggttgcaccccnagccattagc
 K  A  F  I  L  D  G  D  N  L  I  P  K  V  A  P  X  A  I  S
agtgttgaaaacattgaaggaaatggagggcctggaaccattaagaagatcagctttccc
 S  V  E  N  I  E  G  N  G  G  P  G  T  I  K  K  I  S  F  P
gaaggcttccctttcaagtacgtgaaggacagagttgatgaggtggaccacacaaacttc
 E  G  F  P  F  K  Y  V  K  D  R  V  D  E  V  D  H  T  N  F
aaatacaattacagcgtgatcgagggcggtcccataggcgacacattggagaagatctcc
 K  Y  N  Y  S  V  I  E  G  G  P  I  G  D  T  L  E  K  I  S
aacgagataaagctagtggcaacccctgatggaggatccatcttgaagatcagcaacaag
 N  E  I  K  L  V  A  T  P  D  G  G  S  I  L  K  I  S  N  K
taccacaccaaaggcgaccatgaggtgaaggcagagcaggttaaggcaagtaaagaaatg
 Y  H  T  K  G  D  H  E  V  K  A  E  Q  V  K  A  S  K  E  M
ggcgagacactttgagggccgttgagagctacctcttggcacactccgatgcctacaac
 G  E  T  L  L  R  A  V  E  S  Y  L  L  A  H  S  D  A  Y  N
```

Bet v 1iso:

```
ttcggtgttttcaattacgagagtgagaccacctctgttatcccagcagctaggctgttc
 F  G  V  F  N  Y  E  S  E  T  T  S  V  I  P  A  A  R  L  F
aaggcctttatcctcgatggcgataatctcattccaaaggttgcaccccaagccattagc
 K  A  F  I  L  D  G  D  N  L  I  P  K  V  A  P  Q  A  I  S
agtgttgaaaacattgaaggaaatggagggcctggaaccatcaagaagatcacatttccc
 S  V  E  N  I  E  G  N  G  G  P  G  T  I  K  K  I  T  F  P
gaagacagccctttcaagtacgtgaaggaggggggttgatgaggtggaccacgcaaacttc
 E  D  S  P  F  K  Y  V  K  E  G  V  D  E  V  D  H  A  N  F
aaatacagctacagcatgatcgagggtggtgcgctgggcgacacattggagaagatctgc
 K  Y  S  Y  S  M  I  E  G  G  A  L  G  D  T  L  E  K  I  C
aacgagataaagctagtggcaacccctgatggaggatccatcttgaagatcagcaacaag
 N  E  I  K  L  V  A  T  P  D  G  G  S  I  L  K  I  S  N  K
taccacaccaaaggcgaccatgagatgaaggcagggcatatgaaggttattaaagaaaag
 Y  H  T  K  G  D  H  E  M  K  A  G  H  M  K  V  I  K  E  K
```

```
ggcgaggcacttttgagggccgttgggagctacctcttggcacactctgatgcttacaac
 G  E  A  L  L  R  A  V  G  S  Y  L  L  A  H  S  D  A  Y  N
```

Mal d 1:

```
ttcggtgtctacacatttgagaacgagtacacctctgagattccaccaccaagattgttc
 F  G  V  Y  T  F  E  N  E  Y  T  S  E  I  P  P  P  R  L  F
aaggcctttgtcctcgatgctgataacctcatccccaagattgcaccccaggcaatcaag
 K  A  F  V  L  D  A  D  N  L  I  P  K  I  A  P  Q  A  I  K
catgctgagatccttggaggagacggtggccctggaaccatcaagaagatcacttttggt
 H  A  E  I  L  G  G  D  G  G  P  G  T  I  K  K  I  T  F  G
gaaggcagccaatacggctacgtgaagcacaagatcgactcggttgacgaggcaaactac
 E  G  S  Q  Y  G  Y  V  K  H  K  I  D  S  V  D  E  A  N  Y
tcatacgcctacactttgattgaaggagatgctttgacagacaccattgagaaggtctct
 S  Y  A  Y  T  L  I  E  G  D  A  L  T  D  T  I  E  K  V  S
tacgagaccaagctggtggcatctggaagtggttccatcatcaagagtatcagccactac
 Y  E  T  K  L  V  A  S  G  S  G  S  I  I  K  S  I  S  H  Y
cacaccaagggtgatgttgagaccaaggaagagcacgtcaaggctggcaaagagaaggct
 H  T  K  G  D  V  E  T  K  E  E  H  V  K  A  G  K  E  K  A
catggtttgttcaagcttattgagagctaccttaagggccaccccgacgcatacaac
 H  G  L  F  K  L  I  E  S  Y  L  K  G  H  P  D  A  Y  N
```

Phl p 5a:

```
gccgatctaggctacggcccggccaccccagctgccccggccgccggctacacccccgcc
 A  D  L  G  Y  G  P  A  T  P  A  A  P  A  A  G  Y  T  P  A
gccccggccggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaagctgatcgag
 A  P  A  G  A  E  P  A  G  K  A  T  T  E  E  Q  K  L  I  E
aagatcaacgccggcttcaaggcggccttggccgctgccgccggcgtcccgccagcggac
 K  I  N  A  G  F  K  A  A  L  A  A  A  A  G  V  P  P  A  D
aagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcggcctccaacaaggccttcgcggagggc
 K  Y  R  T  F  V  A  T  F  G  A  A  S  N  K  A  F  A  E  G
ctctcgggcgagcccaagggcgccgccgaatccagctccaaggccgcgctcacctccaag
 L  S  G  E  P  K  G  A  A  E  S  S  S  K  A  A  L  T  S  K
ctcgacgccgcctacaagctcgcctacaagacagccgagggcgcgacgcctgaggccaag
 L  D  A  A  Y  K  L  A  Y  K  T  A  E  G  A  T  P  E  A  K
tacgacgcctacgtcgccaccctaagcgaggcgctccgcatcatcgccggcaccctcgag
 Y  D  A  Y  V  A  T  L  S  E  A  L  R  I  I  A  G  T  L  E
gtccacgccgtcaagcccgcggccgaggaggtcaaggttatccctgccggcgagctgcag
 V  H  A  V  K  P  A  A  E  E  V  K  V  I  P  A  G  E  L  Q
gtcatcgagaaggtcgacgccgccttcaaggtcgctgccaccgccgccaacgccgcgccc
 V  I  E  K  V  D  A  A  F  K  V  A  A  T  A  A  N  A  A  P
gccaacgacaagttcaccgtcttcgaggccgccttcaacaacgccatcaaggcgagcacg
 A  N  D  K  F  T  V  F  E  A  A  F  N  N  A  I  K  A  S  T
```

```
ggcggcgcctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgccgtcaagcaggcc
 G  G  A  Y  E  S  Y  K  F  I  P  A  L  E  A  A  V  K  Q  A
tacgccgccaccgtcgccaccgcgccggaggtcaagtacaccgtctttgagaccgcgctg
 Y  A  A  T  V  A  T  A  P  E  V  K  Y  T  V  F  E  T  A  L
aaaaaggccatcaccgccatgtccgaggcccagaaggctgccaagcccgctgccgctgcc
 K  K  A  I  T  A  M  S  E  A  Q  K  A  A  K  P  A  A  A  A
accgccaccgcaactagtgccgtcggcgctgccaccgccgctaccggtggctataaagtc
 T  A  T  A  T  S  A  V  G  A  A  T  A  A  T  G  G  Y  K  V
```

Phl p 5b:

```
gccgatgccggctacgccccggccaccccggctgcggccggagcggaggcagggaaggcg
 A  D  A  G  Y  A  P  A  T  P  A  A  A  G  A  E  A  G  K  A
acgaccgaggagcagaagctgatcgaggacatcaacgtcggcttcaaggcggccgtggcc
 T  T  E  E  Q  K  L  I  E  D  I  N  V  G  F  K  A  A  V  A
gccgccgccagcgtccctgcggcagacaagttcaagaccttcgaggccgccttcacctcg
 A  A  A  S  V  P  A  A  D  K  F  K  T  F  E  A  A  F  T  S
tcatccaaggccgctaccgccaaggcgcccggcctcgttcccaagctcgacgccgcctac
 S  S  K  A  A  T  A  K  A  P  G  L  V  P  K  L  D  A  A  Y
agcgtcgcctacaaggccgccgtcggcgccacccccgaggccaagttcgactccttcgtc
 S  V  A  Y  K  A  A  V  G  A  T  P  E  A  K  F  D  S  F  V
gcctccctcaccgaggcgctccgcgtcatcgccggcgcccttgaggtccacgccgtcaag
 A  S  L  T  E  A  L  R  V  I  A  G  A  L  E  V  H  A  V  K
cccgtcaccgaggagcccggcatggccaagatccccgccggcgagctgcagatcatcgac
 P  V  T  E  E  P  G  M  A  K  I  P  A  G  E  L  Q  I  I  D
aagatcgatgccgccttcaaggtcgccgccaccgccgcggccaccgccccagccgacgac
 K  I  D  A  A  F  K  V  A  A  T  A  A  A  T  A  P  A  D  D
aagttcaccgtcttcgaggccgccttcaacaaggccatcaaggagagcaccggcggcgcc
 K  F  T  V  F  E  A  A  F  N  K  A  I  K  E  S  T  G  G  A
tacgacacctacaagtgcatcccatccctcgaggccgccgtcaagcaggcctacgccgcc
 Y  D  T  Y  K  C  I  P  S  L  E  A  A  V  K  Q  A  Y  A  A
accgtcgcggccgcgccgcaggtcaaatacgccgtctttgaggccgcgctgaccaaggcc
 T  V  A  A  A  P  Q  V  K  Y  A  V  F  E  A  A  L  T  K  A
atcaccgccatgtccgaggtacagaaggtcagccagcccgccaccggtgctgcaaccgtc
 I  T  A  M  S  E  V  Q  K  V  S  Q  P  A  T  G  A  A  T  V
gccgccggtgctgcaaccaccgccactggtgctgcctccggcgctgccaccgtcgctgcc
 A  A  G  A  A  T  T  A  T  G  A  A  S  G  A  A  T  V  A  A
ggtggctataaagtc
 G  G  Y  K  V
```

9.3 Verwendete Vektoren

In Abbildung 9.1 sind die verwendeten Vektoren dargestellt.

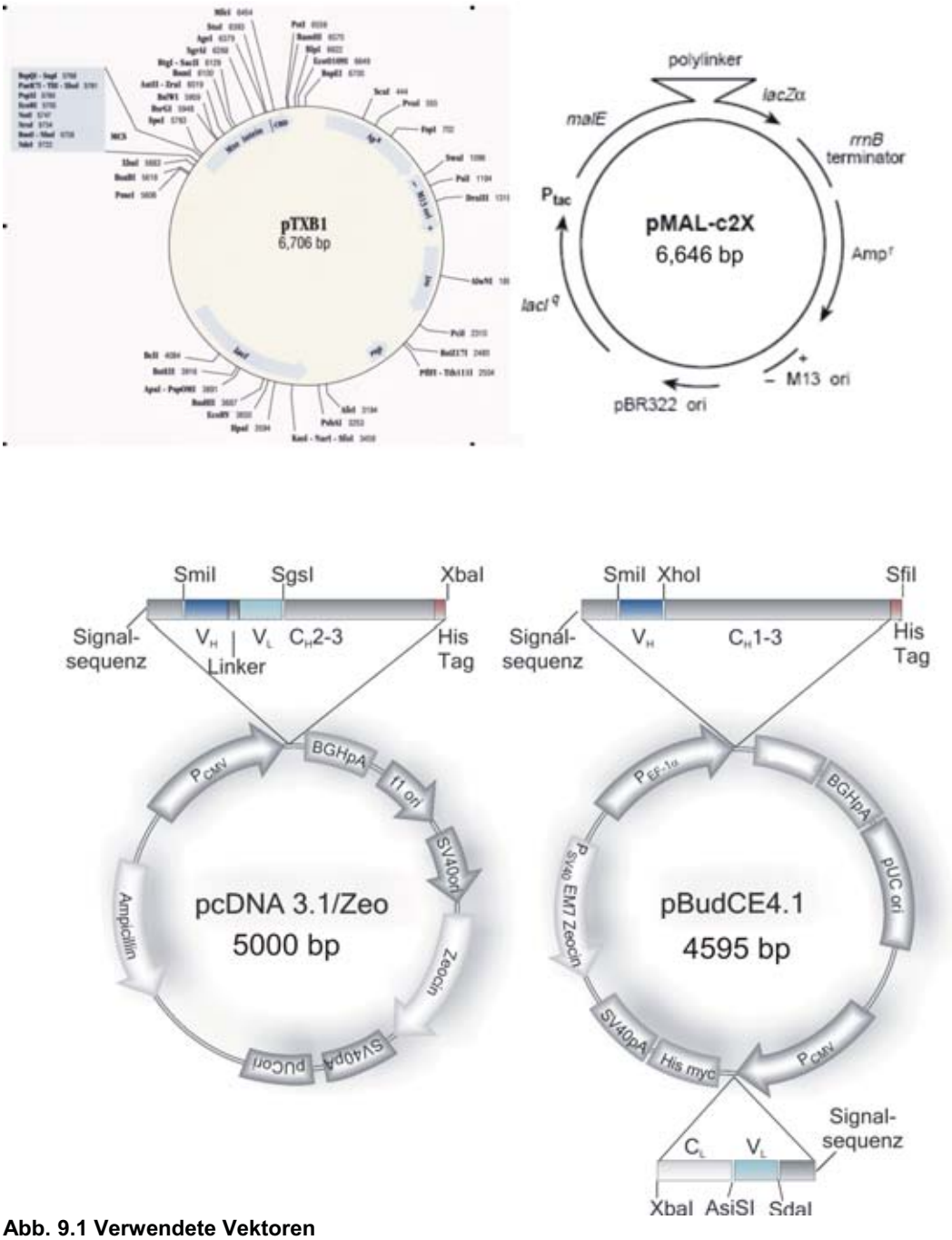


Abb. 9.1 Verwendete Vektoren

Die Vektoren pTXB1 und pMAL-c2X wurden zur prokaryotischen Expression in *E. coli* verwendet, die Vektoren pcDNA3.1/Zeo und pBudCE4.1 für die eukaryotische Expression in HEK293-Zellen.

GEFAHRSTOFFE UND SICHERHEITSDATEN

Gefahrensymbole, Gefahrenhinweise (H-Sätze, *Hazard Statements)* und Sicherheitsratschläge (P-Sätze, *Precautionary Statements)* verwendeter Substanzen nach dem GHS-System:

Verbindung:	**Gefahrensymbole:**	**H-Sätze:**	**P-Sätze:**
ABTS	GHS07	315/319/335	261/305+351+338
Acrylamid	GHS06/08	350/340/361/301/372 332/312/319/317	201/280/301/310/ 305+351+338/308+313
Ammoniumpersulfat	GHS02/07/08	272/302/315/319/335/ 334/317	280/305+351+338/302+ 352/304+341/342+311
Ampicillin	GHS07/08	315/317/319/334/335/	261/280/305+351+338/ 342+311
EDTA	GHS07	319	305/351/338
Eisessig	GHS02/05	226-314	280-301+330+331/307 310
Ethanol	GHS02	225	210
Ethidiumbromid	GHS06/08	341/330/302	281/302/352/ 305+351+338/304+340 309/310
Imidazol	GHS05/07/08	302/314/361d	280/301+331/ 305+351+338/309/310
Kanamycinsulfat	GHS08	360d	281/201/ 305+351+338 308+313
Methanol	GHS02/06/08	225/331/311/301/370	210/233/280/302+352
Natronlauge	GHS05	314	280/ 301+330+331/310 305+351+338
Nickelsulfat	GHS08/07/09	350i/341/360d/372/ 332/302/315/334/317	201/280/273/308+313 342+311/302+352 301+330+331/309/310 305+351+338
2-Propanol	GHS02/07	225/319/336	210/233/305+351+338
Salzsäure	GHS05/07	314/335	260/301+330+331 361+353/305+351+338 405/501
SDS	GHS06/02	228/331/302/335/315 319	210/280/304+340/ 305+351+338/309+310
TEMED	GHS02/05/07	225/332/302/314	210/233/280 301+330+331 305+351+338/309+310
Tris	GHS07	315/319/335	216/305+351+338
Wasserstoffperoxid	GHS03/05/07	271/332/302/314	220/261/280 305+351+338/310
Zitronensäure	GHS05	318	305+351+338

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis und unter seiner Betreuung durchzuführen, bedanken. Herrn Prof. Dr. U. Hahn danke ich für die Übernahme des Koreferats. Bei der Firma PLS-Design möchte ich mich für die Finanzierung bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Edzard Spillner, der durch sein stets vorhandenes Interesse, die kreativen Ideen und Strategien und sein fundiertes Fachwissen eine große Unterstützung war.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, die interessanten, witzigen und manchmal sogar tiefgründigen Gespräche und die schönen Pausen zwischendurch bedanken. Danke, Yvonne, Andrea, Dana, Steffi, Melanie, Thorsten, Kerstin, Ingke, nochmal Edzard, Dirk, Maria, Tim, Thomas, Simon, Henning, Franky, Helene und Connie!

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Arbeitskreises, die in schwierigen Zeiten hilfreich und stärkend zur Seite standen.

Ein großes Dankeschön geht an die Helfer und Helferinnen, die im Rahmen ihres Studiums oder ihrer Ausbildung Praktika absolviert oder Bachelor- bzw. Diplomarbeiten geschrieben und durch ihren Fleiß und ihre Bemühungen viel zu dieser Arbeit beigetragen haben, ganz besonders möchte ich mich hier bei Andrea und Daniela bedanken.

Bei Amir möchte ich mich für die Vorarbeit bedanken, auf der ich diese Arbeit aufbauen konnte. Anna und Jan danke ich für die Einweisungen in den Umgang mit Biosensoren.

Ich danke Lars für seine Liebe und seine Unterstützung.

Meinem Vater und der Omi danke ich für ihre Motivation. Elke danke ich für ihre Hilfe und ihre Ermunterungen auf der Zielgeraden. Bei Anne, Nina, Mandy und Fine möchte ich mich für die tolle freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter gedenken und ihr ebenfalls danken. Sie hat mir durch ihre liebevolle Erziehung so viel Kraft, Optimismus und Lebensfreude mit auf den Weg gegeben, dass ich trotz aller Widrigkeiten immer nach vorne schauen und die „Öhrchen steif halten“ konnte.