

**Substitution humaner Seren
auf Basis der IgY-Technologie für die
immunologische *in vitro*-Diagnostik**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Dirk Heinrich
aus Wedel

Hamburg 2012

für

Nine und Elias Maximilian

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde von Januar 2008 bis Mai 2012 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie II des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Reinhard Bredehorst
2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Gutachter der Disputation: Prof. Dr. Reinhard Bredehorst
Prof. Dr. Sascha Rohn
Dr. Thomas Hackl

Tag der Disputation: 20. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	xi
1 Einleitung	15
1.1 Allergie	16
1.1.1 Mechanismus der IgE-vermittelten Soforttyp-Reaktion	17
1.2 Heparin-induzierte Thrombozytopenie und Thrombose	27
1.2.1 Pathophysiologischer Mechanismus der HIT II	27
1.3 Immunologische Diagnostik	29
1.3.1 Allergologie	29
1.3.2 Standardisierung	32
1.4 IgY-Technologie – Polyklonale Antikörper durch Immunisierung	34
1.4.1 Aviane lymphatische Organe	34
1.4.2 Aviane Leukozytenmarker	35
1.4.3 Aviane Antikörper	35
1.4.4 Diversität avianer Antikörper	37
1.4.5 Vorteile polyklonaler IgY	38
1.5 Zielsetzung	40
2 Material	41
2.1 Enzyme und Standards	41
2.2 Chemikalien und Bioreagenzien	41
2.3 Affinitätsmatrizes	41
2.4 Puffer und Lösungen	42
2.5 Medien	46
2.6 Kommerzielle Kits	47
2.7 Vektoren	47
2.8 Oligonukleotide	48
2.9 Antikörper	48
2.10 <i>E. coli</i> -Stämme	48
2.11 Zelllinien und Zellkultur	49
2.12 Verbrauchsmaterialien	49
2.13 Geräte	50
3 Methoden	53
3.1 Chemische Methoden	53
3.1.1 Kopplung von Proteinen mittels Glutardialdehyd	53
3.1.2 Glykospaltung nach MALAPRADE	53
3.1.3 Kopplung von IgY nach Glykospaltung	54

3.1.4	Biotinylierung mit TFPA-PEG ₃ -Biotin	54
3.1.5	Biotinylierung durch Umsatz mit dem BACH-Reagenz	54
3.1.6	Darstellung von <i>N</i> -2,4,6-Trinitrophenyl-1,10-decandiamin	55
3.1.7	Haptenmodifizierung mit TNBS	55
3.2	Molekularbiologische Methoden	56
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	56
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen mit Kitsystemen	56
3.2.3	PCR-Techniken	56
3.2.4	<i>Cycle</i> -Sequenzierung	58
3.2.5	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	60
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	61
3.2.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	61
3.2.8	Alkoholpräzipitation	62
3.2.9	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	62
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	63
3.2.11	Herstellung transformierbarer <i>E. coli</i> -Zellen	63
3.2.12	Transformation chemisch vorbehandelter <i>E. coli</i> -Zellen	64
3.2.13	Wachstum und Lagerung von Bakterienkolonien	65
3.3	Proteinbiochemische Methoden	65
3.3.1	Präzipitation avianer Immunglobuline aus dem Eigelb	65
3.3.2	Affinitätschromatographische Verfahren	67
3.3.3	Ni-IMAC	68
3.3.4	SDS-PAGE	69
3.3.5	<i>Western Blot</i>	70
3.4	Immunologische Methoden	71
3.4.1	ELISA-Analyse	71
3.4.2	Quantifizierende Sandwich-ELISA-Analyse	71
3.4.3	Immunblot	72
3.4.4	Expression in Mammalia-Zellen	73
3.4.5	Kultur und Passage adhärenter Zellen	75
3.4.6	Kryokonservierung und Auftauen von Mammalia-Zellen	76
3.4.7	Expression in prokaryotischen Systemen	76
3.5	Biophysikalische Methoden	78
3.5.1	SPR-Spektroskopie	78
4	Ergebnisse	81
4.1	Generierung spezifischer, polyklonaler Antikörper	81
4.1.1	Immunisierung von Hühnern	81
4.1.2	Isolierung und Reinigung der polyklonalen avianen Antikörper	82
4.2	Produktion rekombinanter Allergene	82
4.2.1	Rekombinante Produktion und Reinigung von Bet v 1a-MBP	83
4.2.2	Rekombinante Produktion und Reinigung des Maltose bindenden Proteins (MBP)	84
4.2.3	Rekombinante Produktion und Reinigung verkürzter Bet v 1a-Sequenzen	84
4.2.4	Rekombinante Produktion und Reinigung von Gly m 4	85

4.2.5	Rekombinante Produktion und Reinigung von Mal d 1-MBP	86
4.3	Charakterisierung der durch Immunisierung generierten IgY	87
4.3.1	Vergleich der Reaktivitäten prä- und postimmuner IgY	87
4.3.2	Spezifitätsanalyse der polyklonalen IgY	89
4.3.3	Einfluss des Blockierungsreagenzes auf die Reaktivität spezi- fischer polyklonaler Antikörper	90
4.3.4	Analyse der Interaktion spezifischer polyklonaler IgY und Bet v 1a-MBP	95
4.3.5	Bestimmung der Affinitäten mittels SPR-Spektroskopie	99
4.3.6	Affinitätschromatographische Anreicherung Bet v 1a-spezifi- scher IgY	103
4.4	Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch mo- difizierte Antikörper	105
4.4.1	Kopplung zweier Antikörper über Iminbindungen durch Um- satz mit Glutardialdehyd	106
4.4.2	Kopplung zweier Antikörper durch Iminbrücken nach MA- LAPRADE-Oxidation	109
4.4.3	Hapten-Derivatisierung allergenspezifischer Antikörper	110
4.4.4	Kopplung zweier Antikörper durch Ausnutzung der Strepta- vidin-Biotin-Bindungs-Charakteristik	116
4.5	Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch gene- tische Fusion	125
4.5.1	Darstellung eines rekombinanten verkürzten humanen Fc-Frag- mentes mit Spezifität für IgY/FcY	125
4.5.2	Spezifität von CHIR-AB1-huIgEC _H 2-4 für IgY	129
4.5.3	Affinität von CHIR-AB1-huIgEC _H 2-4	131
4.5.4	Anwendung von CHIR-AB1-huIgEC _H 2-4 im Festphasenassay	131
4.5.5	Weitere Formate rekombinanter, verkürzter humaner Fc-Frag- mente mit Spezifität für IgY/FcY	135
5	Diskussion	143
5.1	Rekombinante Darstellung und Reinigung allergener Zielproteine	145
5.2	Spezifische und polyklonale aviane Antikörper	146
5.2.1	Generierung polyklonaler avianer Antikörper durch Immuni- sierung	147
5.2.2	Isolierung polyklonaler IgY	147
5.2.3	Spezifität der polyklonalen avianen Antikörper	148
5.2.4	Effekt des Blockierungsreagenzes auf die Antikörper-Antigen- Bindung	150
5.2.5	Interaktion und Affinität der polyklonalen avianen Antikörper	152
5.3	Aviane Immunglobuline für die immunologische Diagnostik	159
5.3.1	Chemische Kopplung von Antikörpern	159
5.3.2	Hapten-Derivatisierung allergenspezifischer Antikörper	163
5.3.3	Kopplung durch Streptavidin-Biotin-Interaktion	165
5.4	Chimäre Antikörperkonstrukte mit Spezifität für IgY	167
5.5	Ausblick	173

Zusammenfassung	175
Abstract	177
Literatur	192
Anhang	193
A.1 Oligonukleotide	193
A.2 Sequenzdaten	195
A.2.1 VH3-64-leader, <i>Homo sapiens</i>	195
A.2.2 <i>Chicken immunoglobulin like receptor AB1 ecd</i>	195
A.2.3 Allergene	195
A.2.4 Primärsequenzalignment der Allergene	198
A.2.5 Maltose bindendes Protein (MBP)	201
A.2.6 CHIR-AB1-huFc-Konstrukte	202
A.3 Vergleich zwischen humanen Antikörpern und den CHIR-AB1-huFc-Konstrukten	208
A.4 Vektorkarten	211
A.5 Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren	212
A.6 Entsorgung	212
A.7 Gefahrstoffe und Sicherheitsdaten gemäß GHS	214
Danksagung	221

Abkürzungen

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BALT	Bronchien-assoziiertes Lymphgewebe (<i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>)
BAT	Basophilenaktivierungstest
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (auch: X-Phosphat)
bp	Basenpaare (<i>basepairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CALT	Bindehaut-assoziiertes Lymphgewebe (<i>conjunctival-associated lymphoid tissue</i>)
Carc. Cat.	Karzinogen Kategorie
cDNA	komplementäre DNA
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C _H	konstante Region der schweren Kette
CHIR	<i>chicken immunoglobulin-like receptor</i>
C _L	konstante Region der leichten Kette
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's <i>modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dt	deutsch
DTT	Dithiothreitol
ecd	extrazelluläre Domäne (<i>extracellular domain</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation (<i>electrospray ionization</i>)
F _{ab}	Antigen bindendes Fragment (<i>antigenbinding fragment</i>)

F _c	kristallisierbares Fragment (<i>crystallizable fragment</i>)
F _v	variables Fragment (<i>variable fragment</i>)
GALT	Darm-assoziiertes Lymphgewebe (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GDA	Glutardialdehyd
gDNA	genomische DNA
GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (<i>globally harmonized system for classification, labelling and packaging of chemicals</i>)
HAMA	Humane-Anti-Maus-Antikörper
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC/MS	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie <i>liquid chromatography/mass spectrometry</i>
MALT	Mucosa-assoziiertes Lymphgewebe (<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Mut. Cat.	Mutagen Kategorie
NBT	Nitroblau-Tetraazoliumsalz
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
OD _x	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PP	Polypropylen
PVA	Polyvinylalkohol
RAST	<i>radioallergosorbent test</i>
rcf	relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>)
Repr. Cat.	Reproduktionstoxisch Kategorie
RF	rheumatoider Faktor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response unit</i>
scFv	einzelkettiges Antikörperfragment (<i>single chain fragment variable</i>)

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
sIgE	spezifisches IgE
SOB	<i>salt optimized broth</i>
spez.	spezifisch
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
syn.	synonym
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Polymerase)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>Tcell receptor</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPBS	Tween-PBS
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNP	2,4,6-Trinitrophenyl
TNPA	N-(2,4,6-Trinitrophenyl)-1,10-decandiamin
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
	<i>time of flight</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Unit
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V _H	variables Fragment der schweren Kette
V _L	variables Fragment der leichten Kette
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

1 Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Dissertationsschrift ist die Evaluierung unterschiedlicher Möglichkeiten der Adaption der IgY-Technologie an die immunologische Labordiagnostik zur Substitution humaner Referenzseren. Hierzu wurde als Modellsystem und Vertreter inhalativ-allergischer Reaktionen die Birkenpollenallergie, genauer die Hypersensitivität gegenüber dem Majorallergen Bet v 1 gewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische, polyklonale aviane Antikörper durch Immunisierung des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) generiert und in einem immunologischen Festphasensystem analysiert. Durch unterschiedliche Ansätze der (bio)chemischen bzw. molekularbiologischen Modifikation sollten die aus der Immunisierung hervorgegangenen Antikörper für die Analyse humaner allergenspezifischer Immunglobuline im Festphasenassay adaptiert werden. Darüberhinaus wurden die Anwendbarkeit und die Anpassung der IgY-Technologie auch für andere Spezifitäten in der Allergologie, Autoimmunologie und Infektiologie angestrebt. Die folgenden Kapitel sollen daher zunächst einen Überblick über die Allergie und deren immunologische Mechanismen geben. Als Beispiel autoimmunologischer Erkrankungen wird kurz auf die Heparin-induzierte Thrombozytopenie II eingegangen. Weiter muss im Kontext der Diagnostik die Frage nach dem Wie beantwortet werden und Einblicke in die human-immunologische Labordiagnostik sowie eine Übersicht über die Verfahren selbiger gegeben werden. Ebenso wird die mit der Standardisierung in diagnostischen Analysemethoden verknüpfte Problematik beleuchtet. Abschließend wird auf die Generierung spezifischer Antikörper mit Hilfe der Immunisierung unter Berücksichtigung der IgY-Technologie und der Immunologie avianer Organismen eingegangen.

1.1 Allergie

Der Begriff der Allergie (griech. *αλλεργία*) wurde erstmals im Jahre 1906 von dem österreichischen Kinderarzt Clemens Peter Freiherr VON PIRQUET geprägt und bezeichnet die deutlich übersteigerte und überschießende Reaktivität des Immunsystems auf ein normalerweise harmloses, nicht pathogenes Antigen unserer Umwelt. Dieser Definition nach umfasst die Allergie mehrere unterschiedliche pathologische Immunantworten. Im Laufe der Zeit wurde der Begriff „Allergie“ nicht immer in seiner ursprünglichen Definition genutzt und wird heute häufig synonym für die IgE-vermittelte allergische Reaktion verwendet [1]. VON PIRQUETS Ansinnen war es jedoch, diesen Begriff allgemein und unabhängig von irgendeinem Mechanismus auf die biologische Antwort eines Organismus zu beziehen, welche in der Immunität (nützlicher Effekt) oder eben der Allergie (gesundheitsbeeinträchtigender Effekt) gipfelt. Erst sechzig Jahre später wurde die beschriebene Abwehrreaktion entsprechend ihrer pathophysiologischen Mechanismen durch GELL und COOMBS in vier Typen eingeteilt [2]: die Typ-I-Allergie oder auch Soforttyp-Reaktion ist eine IgE-medierte, Mastzell-aktivierende Hypersensitivitätsreaktion, die infolge eines erneuten Kontaktes (Zweitkontakt) mit dem Allergen innerhalb von einigen Sekunden bis wenigen Minuten auftritt. Während der Erstkontakt symptomlos verläuft, kann beim Zweitkontakt die Ausprägung der Symptomatik von leichten Beschwerden bis hin zu lebensbedrohlichen Situationen reichen. Wird die allergische Reaktion nicht durch gelöstes Antigen/Allergen sondern durch Zell- bzw. Matrix-assoziiertes Antigen und IgG- bzw. IgM-vermittelt (Autoantikörper) hervorgerufen, so spricht man von einer Hypersensitivität des Typs II bzw. einer zytotoxischen Allergie. Diese Form der Allergie kann in zwei Untertypen kategorisiert werden: Typ IIa und Typ IIb. Letzterer unterscheidet sich von dem anderen Subtyp darin, dass die Interaktion von Antikörper und Antigen nicht zu einer Zellerstörung, sondern zur Aktivierung spezifischer Zellfunktionen führt. Auch die Bildung von Autoantikörpern gegen Zellrezeptoren wird diesem Typ zugerechnet. Bei der Typ III-Reaktion (Immunkomplextyp) sind ebenfalls Immunglobuline des Typs G Vermittler der allergischen Immunantwort, die durch lösliches Antigen ausgelöst wird. Die Allergie ist hierbei durch die Komplementaktivierung und damit verbundene Inflammationsphänomene nach vorangegangener Komplexbildung von Antikörper und Antigen charakterisiert. Klassische Vertreter dieses Typs sind z. B. die Serumkrankheit und die ARTHUS-Reaktion. Im Gegensatz zu den genannten Antikörper-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen werden die Allergien des Typs IV bzw. des Spättyps durch aktivierte T-Zellen vermittelt. Insgesamt

samt wird der Typ IV in drei Untergruppen klassifiziert. Bei den T-Zell-medierten allergischen Reaktionen kann sowohl lösliches als auch Zell-assoziiertes Allergen Auslöser der Immunantwort sein. Je nachdem welche T-Zellpopulationen bei der Spättyp-Reaktion aktiviert werden, unterscheidet man weiter Reaktionen der Typen IVa1 (T_H1-Zellen), IVa2 (T_H2-Zellen) und IVb (cytotoxische T-Lymphozyten).

1.1.1 Mechanismus der IgE-vermittelten Soforttyp-Reaktion

Wie bereits erwähnt, findet der Begriff „Allergie“ fälschlicherweise synonyme Anwendung im Kontext Immunglobulin Typ E-assoziiertes allergischer Reaktionen (Allergie vom Soforttyp). Ein weiterer Terminus, der oftmals im Zusammenhang einer Typ I-Allergie gebraucht wird, ist die „Atopie“ (griech. *ατοπία*, dt. Ortlosigkeit). Individuen mit einer Atopie, sind auf Grund ihrer genetischen Veranlagung für eine unnormale auftretende IgE-Produktion nach Kontakt mit unterschiedlichen Umweltallergenen prädisponiert. Infolge dieser Veranlagung können eine oder mehrere atopische Erkrankungen wie z. B. die allergische Rhinitis (Heuschnupfen), Asthma, das atopische Ekzem oder eine Form der Urtikaria auftreten. Im Gegensatz dazu existieren auch eine Reihe IgE-unabhängiger allergischer Erkrankungen wie die Kontaktdermatitis oder die exogen-allergische Alveolitis (syn. Hypersensitivitätspneumonitis) und werden daher als nicht-atopische Allergien subsumiert [1].

Im Folgenden soll bei der Betrachtung des pathophysiologischen Mechanismus der Allergie nur auf die atopische Allergie, d. h. die IgE-vermittelte Soforttyp-Reaktion eingegangen werden. Ferner werden die einzelnen Stationen der Allergie und ihrer Entstehung behandelt, die sich in die Phase der Sensibilisierung und die frühe und späte Phase der allergischen Inflammation untergliedert.

Alltäglich ist der menschliche Organismus einer Reihe von Substanzen der Umwelt ausgesetzt, die hauptsächlich als Inhalationsallergene oder Nahrungsallergene aufgenommen werden. Unter den Inhalationsallergenen sind vor allem diejenigen aus Pollen, Hausstaubmilben und Hautpartikeln von Haustieren zu nennen [1]. Gesunde Erwachsene und Kinder, die keine Anzeichen für eine Atopie zeigen, reagieren auf all diese Allergene mit einer leichten immunologischen Antwort. Ihr Körper produziert allergenspezifische Immunglobuline der Typen IgG₁ und IgG₄ [3]. *In vitro*-Studien mit Nicht-Atopikern haben gezeigt, dass T-Zellen infolge des Allergenkontaktes nur in geringem Ausmaße proliferieren und aktivierte T_H1-Zellen

die Bildung des Gewebshormons Interferon- γ und von Interleukin-2 initiieren [4–6]. Im Gegensatz dazu reagieren Atopiker auf den allergenen Kontakt mit einer überhöhten Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper. Hinsichtlich des Cytokinmusters werden hier durch aktivierte T-Helfer-Zellen des Typs II (T_H2 -Zellen) die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 ausgeschüttet, während keine erhöhten Spiegel an IL-2 und INF- γ gemessen werden [4, 6, 7]. Obgleich zahlreiche Beispiele zu nennen wären, in denen diese klare Trennung von atopischen und nicht-atopischen Allergikern versagt, ist dennoch als entscheidendes Kriterium die Aktivierung von gewebeinfiltrierenden T_H2 -Zellen in atopischen Allergikern festzuhalten.

Mechanismus der Sensibilisierung

Die Sensibilisierung eines Individuums und damit die Vorbereitung einer allergischen Reaktion hängt in starkem Maße von der Fähigkeit einer allergenen Substanz ab, eine T_H2 -Zellantwort und die Sekretion von IL-4 und IL-13 hervorzurufen und damit den zur IgE-Produktion führenden Klassenwechsel in B-Zellen zu initiieren [8–12].

Die Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Weg der Allergensensibilisierung in den Atemwegen. Die Aufnahme des Allergens kann in dieser Phase in unterschiedlichen Weisen erfolgen. Neben einigen allergenen Lipiden und Carbohydratstrukturen sind die meisten Allergene Proteine, darunter zahlreiche mit proteolytischer Aktivität wie beispielsweise das Majorallergen der Hausstaubmilbe Der p 1 [14, 15]. Diese Proteasen weisen die inhärente Eigenschaft auf, die parazelluläre Diffusionsbarriere (*tight junctions*) der Epithelzellschicht zu zerstören und an dendritische Zellen (DCs) zu binden [16]. Alternativ können (auch nicht proteolytisch wirksame) Allergene submucosale DCs durch das Passieren bereits geschädigter Epithelzellen erreichen (nicht gezeigt) oder die im Lumen residenten dendritischen Zellen binden. Durch die Interaktion zwischen invadierendem Allergen und dendritischen Zellen werden Letztere aktiviert und zur Reifung und Wanderung in regionale Lymphknoten bzw. die umgebende Schleimhaut (Mucosa) befähigt. Am Ziel angekommen präsentieren die DCs das prozessierte Allergen in Form peptidischer Fragmente in Assoziation mit MHC II-Molekülen gegenüber naiven T-Zellen. In Anwesenheit von frühem IL-4 (von einer ganzen Palette von Zellen wie z. B. Basophilen, Mastzellen, Eosinophilen, natürlichen Killer-Zellen und T-Zellen) reifen die naiven T-Zellen zu T_H2 -Zellen. Dieser Reifungsprozess kann zusätzlich durch die Aktivierung von *Notch* auf der T-Zelloberfläche durch den Liganden *Jagged* auf der

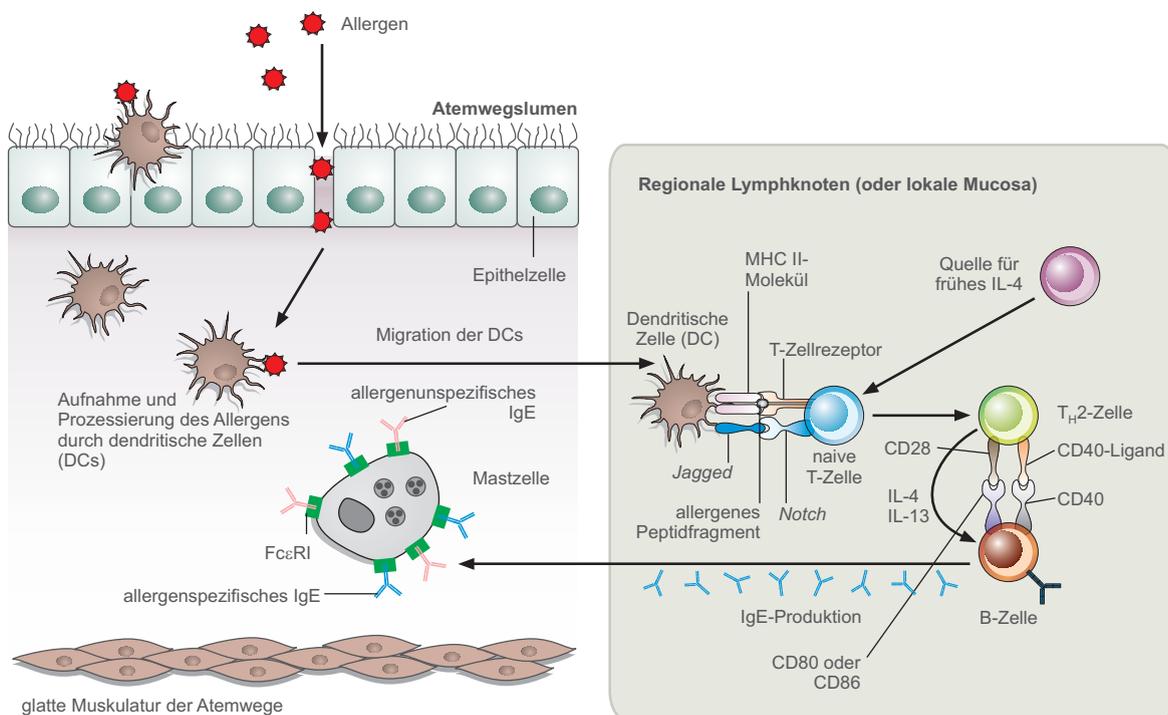


Abbildung 1.1: Mechanismus der Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene im Atemwegslumen. Nach Aufnahme des Allergens durch dendritische Zellen reifen diese und wandern in regionale Lymphknoten bzw. die umgebende Mucosa. Durch Präsentation des prozessierten Allergens in MHC II-assoziierten Peptidfragmenten gegenüber naiven T-Zellen und möglicher Unterstützung durch die Oberflächenproteine *Jagged* und *Notch* erfolgt eine Differenzierung zu IL-4 und IL-13 produzierenden T_H-Zellen. Infolge der Interleukinausschüttung und mittels der Wechselwirkung der Rezeptoren CD40 mit dem CD40-Liganden und CD80 bzw. CD86 mit CD28 erfolgt der Immunglobulin-Klassenwechsel Antikörper sezernierender B-Zellen, wodurch die Produktion allergenspezifischer Immunglobuline des Typs E initiiert wird. Der zunächst lokalen Diffusion innerhalb des Lymphsystems folgt die systemische Verteilung im Blutkreislauf. Nach Übergang in das Interstitium binden sowohl allergenspezifische als auch unspezifische IgE an ihren hochaffinen Rezeptor (FcεRI) auf dort residenten Mastzellen und schließen den Pfad der Sensibilisierung. MHC = *major histocompatibility complex*, nach [13].

Oberfläche der DC unterstützt werden [17–19] und führt zur Produktion von IL-4 und IL-13. Die Ausschüttung dieser Interleukine und die Interaktion geeigneter kostimulatorischer Moleküle wie CD40 mit dem CD40-Liganden und CD80 oder CD86 mit CD28 bewirken dann den Klassenwechsel innerhalb der Antikörper produzierenden B-Zellen. Durch Rekombination der Gensegmente, die die schweren Ketten der Immunglobuline kodieren, wird die Produktion von IgE-Antikörpern erreicht [11, 12]. Neben den T_H2-Zellen vermögen auch Basophile und Mastzellen IL-4 und IL-13 herzustellen und B-Zellen über CD40 zu stimulieren [20]. Die gebildeten IgE-Antikörper diffundieren zunächst lokal in die Lymphgefäße und treten anschließend in das Blutsystem über, wodurch die systemische Verteilung erreicht wird. In der interstitiellen Flüssigkeit binden dann sowohl allergenspezifische als auch unspezifische Immunglobuline des Typs E an den hochaffinen Rezeptor FcεRI auf der Oberfläche dort ansässiger Mastzellen [21–23]. Hervorzuheben ist, dass die Sensibilisierung der Mastzellen allein noch keine Symptomatik bedingt. Erst durch

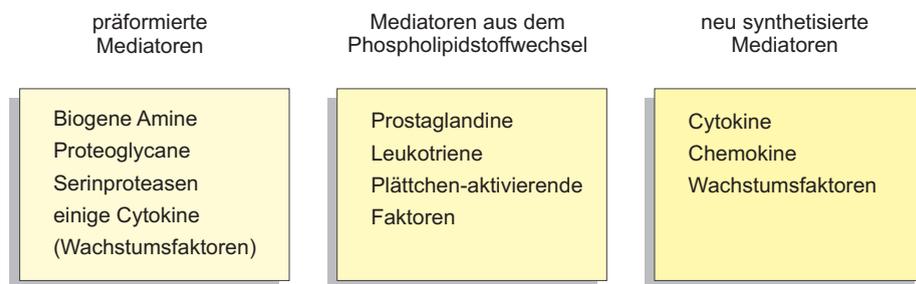


Abbildung 1.2: Sekretionsprodukte der Mastzellaktivierung. Die infolge der Mastzellaktivierung sekretierten Produkte werden häufig in drei Gruppen unterteilt: in Granula gespeicherte präformierte Mediatoren, aus dem Phospholipidstoffwechsel stammende Mediatoren und neu synthetisierte Mediatoren, nach [13].

erneuten Allergenkontakt können die einst sensibilisierten Mastzellen in den Ablauf der allergischen Entzündungsreaktion (Inflammation) eingreifen.

Frühe Phase der allergischen Inflammation

Die frühe Phase der allergischen Entzündungsreaktion, auch als Soforttyp- bzw. Typ I-Reaktion bezeichnet, tritt innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten nach Allergenexposition auf [1]. Dabei auftretende Effekte können einerseits lokale Symptome wie akute Rhinokonjunktivitis (bei allergischer Rhinitis), akute Asthmaanfälle, Urtikaria (Nesselsucht), gastrointestinale Beschwerden (Nahrungsalergien) oder systemische Symptome im Kontext des anaphylaktischen Schocks sein. Mechanistisch betrachtet (siehe Abb. 1.3) werden die durch den hochaffinen IgE-Rezeptor auf der Mastzelloberfläche gebundenen allergenspezifischen Immunglobuline durch ein bivalentes oder multivalentes Allergen quervernetzt. Durch eine in Gang gesetzte komplexe Signalkaskade im Zellinneren kommt es zur augenblicklichen Freisetzung einer Reihe biologisch aktiver Produkte (siehe Abb. 1.4), die eine Vasodilatation, die erhöhte vaskuläre Permeabilität einschließlich Ödembildung und die akute funktionale Störung betroffener Organe (z. B. Bronchokonstriktion, gesteigerte Schleimsekretion in den Atemwegen, Urtikaria, Erbrechen, Diarrhoe) nach sich zieht [24, 25]. Desweiteren konnte auch gezeigt werden, dass diese Mediatoren an Nocizeptoren der Sinneszellen in Nase [26], Haut [27] und den Atemwegen [28] binden und damit typische Anzeichen einer allergischen Sofortreaktion wie Niesen, Juckreiz und Hustenreiz hervorrufen. Abbildung 1.2 zeigt eine Übersicht der auftretenden Mediatoren, die entsprechend den Kategorien zugeordnet werden. Innerhalb der in den Granula gespeicherten Mediatoren findet man biogene Amine (Histamin, Serotonin etc.), Proteoglycane (hierunter als wichtigste Vertreter: Heparin und Chondroitinsulfat), Serinproteasen (z. B. Tryptase,

Chymase und Carboxypeptidase) und einige Cytokine sowie Granula-assoziierte Wachstumsfaktoren. Zu der zweiten Gruppe der Mediatoren zählen solche, die der Verstoffwechslung (Pfade der COX-/LOX-Aktivität) der Fettsäure Arachidonsäure entspringen: Prostaglandine (vor allem PGD_2), Leukotriene (hauptsächlich LTB_4), Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LTs) und in Einzelfällen auch Plättchenaktivierende Faktoren (PAFs) [29]. Eben diese Freisetzung der den ersten beiden Gruppen zugehörigen Mediatoren tragen maßgeblich zu den akuten Symptomen der IgE-vermittelten Sofortreaktion bei und sind charakteristisch für die frühe Phase [1, 30]. Über die genannten Effekte der Mediatorenausschüttung hinaus können Mastzellen teilweise auch zur Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und damit zum Übergang zur späten Phase der allergischen Inflammation beitragen [24]. Die letzte Gruppe umfasst die für die späte Phase relevanten *de novo* synthetisierten Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (s. Abb. 1.5).

Späte Phase der allergischen Inflammation

Die sich der frühen Phase der allergischen Entzündungsreaktion anschließende späte Phase tritt üblicherweise 2 bis 6 Stunden nach Allergenkontakt auf, erreicht ihr maximales Ausmaß etwa 6 bis 9 Stunden nach Exposition und verschwindet in 1 bis 2 Tagen vollständig [13]. Der detaillierte Mechanismus der späten Phase ist in weiten Teilen noch unklar. Zudem konnte bisher die Frage, warum die späte Phase nicht in allen sensibilisierten Individuen auftritt, nicht beantwortet werden. In vereinzelten Fällen ist auch der Übergang von der frühen zur späten Phase nicht deutlich unterscheidbar [1]. Abbildung 1.5 veranschaulicht schematisch die in zahlreichen Studien bereits erlangten Erkenntnisse zu Abläufen der verzögerten allergischen Inflammation. Neben den präformierten bzw. dem Lipidstoffwechsel entsprungenen Mediatoren, die während der frühen Phase der Allergie sofort freigesetzt werden, stellen die erst nach Synthese verfügbaren und daher nur verzögert sekretierten Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren eine dritte Gruppe der Mastzellmediatoren (vgl. Abb. 1.2) dar und kennzeichnen die späte Phase der Inflammation [1, 30]. Manche Mastzellpopulationen sind jedoch auch in der Lage, einige dieser späten Mediatoren (z. B. $\text{TNF-}\alpha$) sofort in präformierter Form freizusetzen [30]. Weitere Mediatoren (z. B. $\text{TNF-}\alpha$, LTB_4 , IL-8, CCL2) der Mastzellaktivierung besitzen die Fähigkeit, andere Immunzellen auf direktem oder indirektem Wege zu rekrutieren (vgl. hierzu auch Abb. 1.3). Andere wiederum dienen der Aktivierung von Granulozyten (Basophile, Eosinophile, Neutrophile) der immanenten

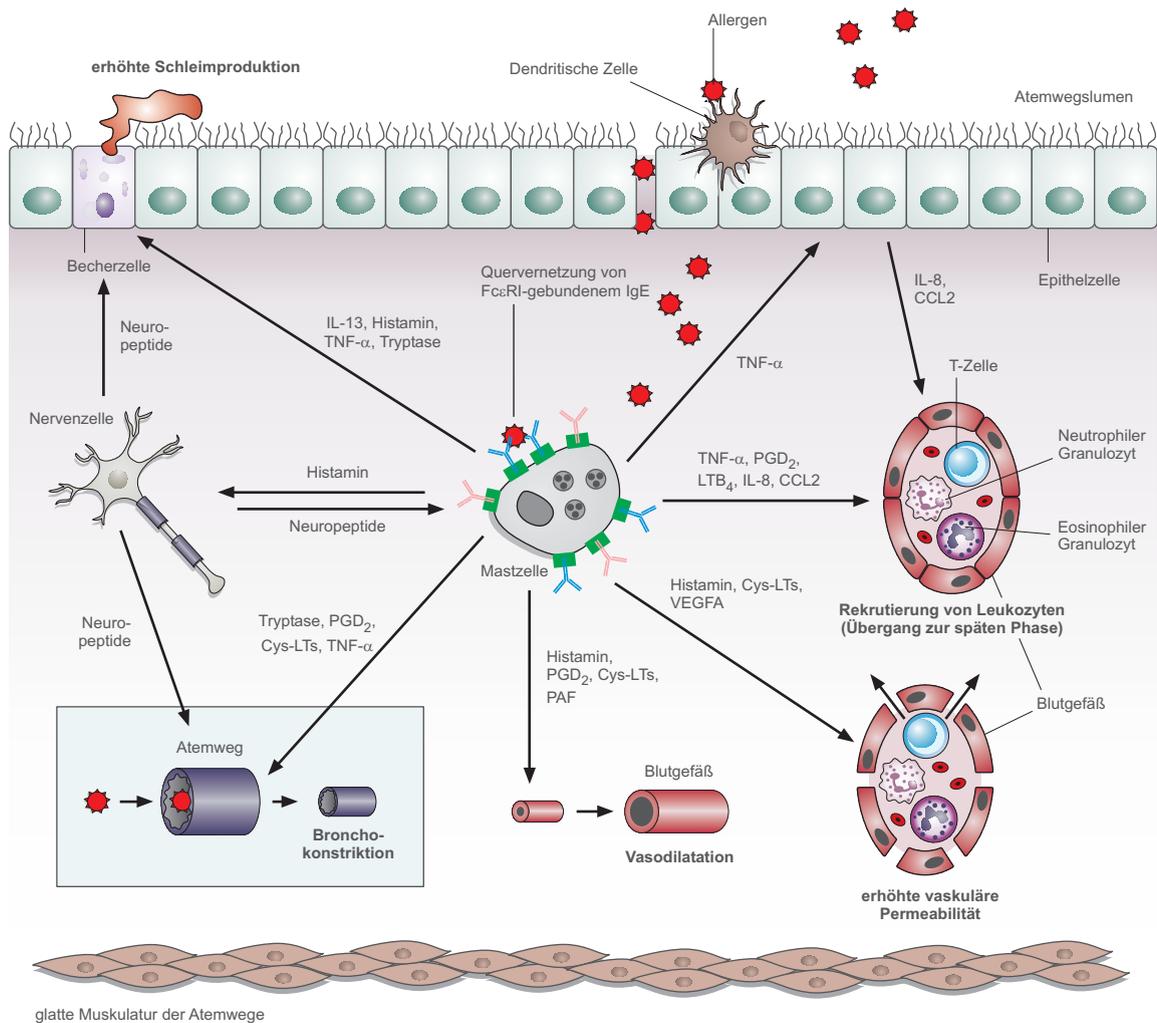


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der frühen Phase der allergischen Entzündungsreaktion. Die auf Mastzellen über den FcεRI gebundenen IgE-Antikörper können für verschiedene Antigene spezifisch sein. Die Erkennung des Allergens durch allergenspezifische IgE führt schließlich zur Quervernetzung der Fcε-Rezeptoren, wodurch die Mastzellen aktiviert werden. Infolge der Aktivierung sekretieren die Mastzellen präformierte und dem Phospholipidstoffwechsel entstammende Mediatoren. Zudem wird die Synthese einiger Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren gesteigert. Die augenblickliche Freisetzung dieser Mediatoren ist Ursache für die Bronchokonstriktion, die Vasodilatation, die erhöhte vaskuläre Permeabilität und die vermehrte Schleimproduktion. Darüber hinaus tragen die Mastzellen zum Übergang zur späten Phase der allergischen Entzündungsreaktion bei, indem sie den Einstrom inflammatorischer Leukozyten durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen endothelialer Zellen (z. B. durch TNF-α) und durch Sekretion chemotaktischer Mediatoren (LTB₄ und PGD₂) und von Chemokinen (IL-8 und CCL2). CCL2 = CC-Chemokinligand 2, Cys-LT = Cysteinyl-Leukotrien, LTB₄ = Leukotrien B₄, PAF = Plättchen-aktivierender Faktor, PGD₂ = Prostaglandin D₂, TNF-α = Tumornekrosefaktor-α, VEGFA = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A, nach [13].

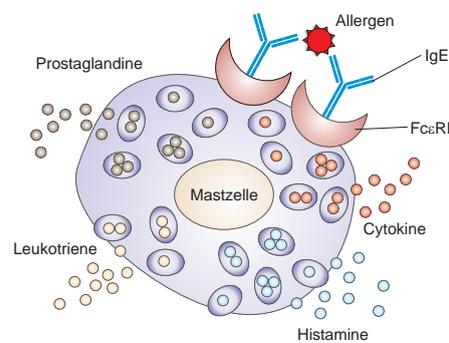


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Degranulation einer Mastzelle und die Freisetzung allergierelevanter Mediatoren. Die im Schritt der Sensibilisierung produzierten allergenspezifischen Immunglobuline des Typs E sind über den hochaffinen IgE-Rezeptor Fc ϵ RI auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden. Die Quervernetzung der rezeptorgebundenen Antikörper löst eine lokale Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus.

Immunität durch Ausschüttung von IL-3, IL-8, TNF- α , GM-CSF etc. Rekrutierte bzw. aktivierte Leukozyten sind ihrerseits in der Lage ebenfalls Mediatoren zu produzieren und weitere Effekte in Gang zu setzen [30]. Neutrophile Granulozyten beispielsweise produzieren Elastase, ein Enzym, das die Aktivierung sogenannter Matrix-Metalloproteinasen und indirekt den Abbau von Typ III-Kollagen bewirkt. Basische Proteine aktivierter Eosinophiler tragen zur Zerstörung der Epithelzellschicht bei. Darüber hinaus können rekrutierte wie auch residente Zellen durch Ausschüttung von TNF- α , Cysteinyl-Leukotrienen oder IL-13 eine Bronchokonstriktion der Atemwege und eine erhöhte Schleimabsonderung verursachen [13]. Neben Mastzellen als Quelle freigesetzter Botenstoffe werden auch allergenstimulierte und rekrutierte T-Zellen diskutiert [1, 30]. Auch T_H17-Zellen und das von ihnen produzierte IL-17 stehen im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen der späten Phase [31–33].

Chronische allergische Entzündungsreaktion

Bei andauernder oder sich wiederholender Allergenexposition kommt es zu zahlreichen Effekten, die von einer akuten zu einer chronischen allergischen Entzündungsreaktion führen. Die Folgen sind morphologische Veränderungen der Zellverbände und Funktionsbeeinträchtigungen betroffener Organe [13]. Bei Asthmatikern, in denen sich die Einflüsse über die gesamten Atemwegswände und den Bronchialbaum erstrecken und die einem steten Allergenkontakt ausgesetzt waren, konnten folgenden Effekte beobachtet werden: Veränderung der Epithelzellen (höhere Fragilität) mit erhöhter Cytokin- und Chemokinfreisetzung sowie hyperplasierende Becherzellen mit erhöhter Schleimproduktion [34, 35]. Ebenso finden

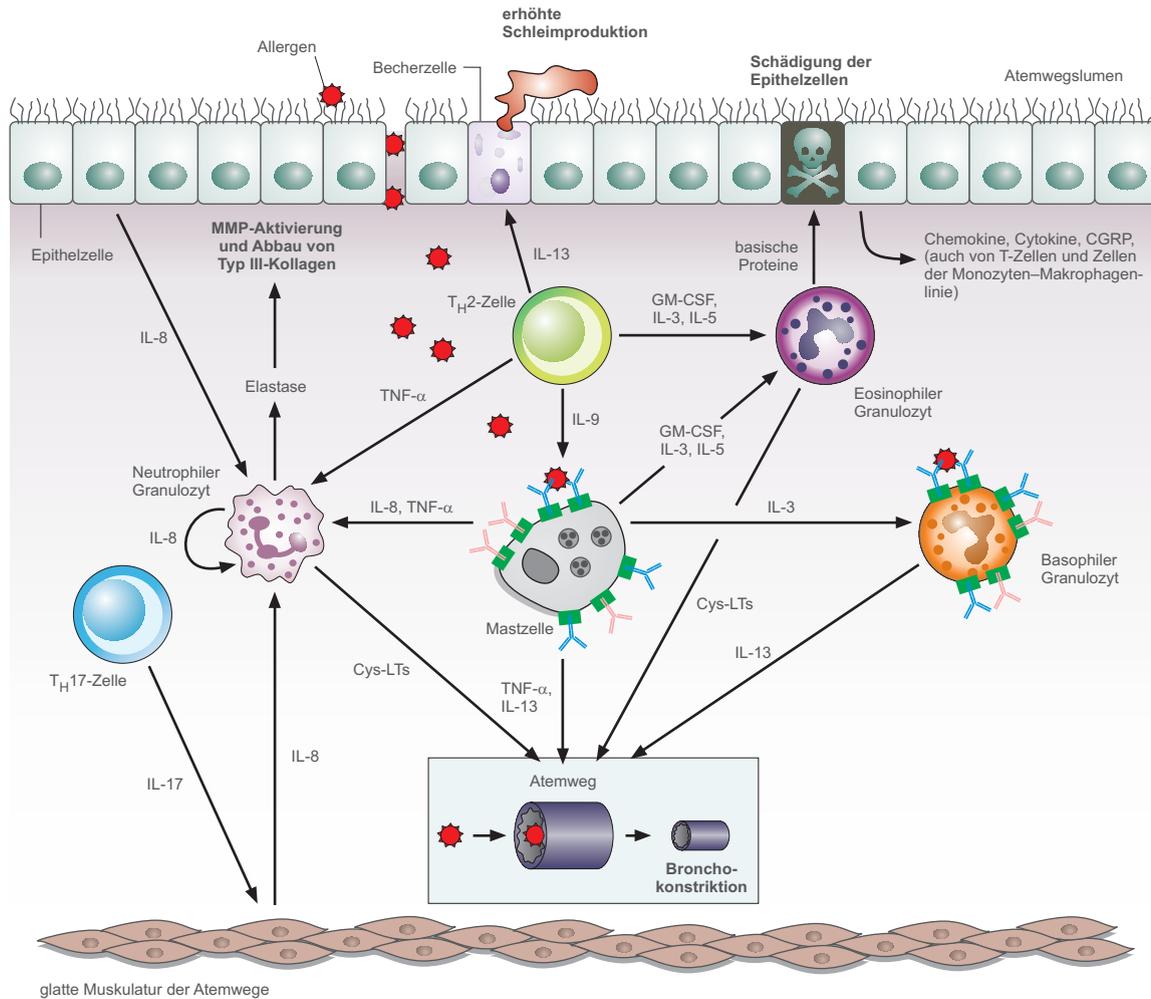


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der späten Phase der allergischen Inflammation. Die erst Stunden nach der Allergenexposition auftretende späte Phase spiegelt vermutlich das Wechselspiel inhärenter und erworbener Immunzellen wider, welche durch Zirkulation und Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch gewebeansässiger Zellen rekrutiert werden. Die Zellen der angeborenen Immunität umfassen Neutrophile, Monozyten (nicht gezeigt), Eosinophile und Basophile. Ebenfalls inflammatorische Mediatoren ausschüttende Zellen sind Mastzellen, die durch IgE- und allergenabhängige Rezeptor-Quervernetzung aktiviert wurden, und rekrutierte T-Zellen, die peptidische Fragmente des Allergens erkennen. Die Freisetzung von z. B. Elastase durch Neutrophile veranlasst die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und den Abbau von Typ-III-Kollagen. Zusätzlich können basische Proteine der Eosinophilen die Epithelzellen verletzen. Einige durch residente oder rekrutierte Zellen freigesetzte basische Proteine können ebenfalls zu einer Bronchokonstriktion führen. CGRP = *calcitonin-gene-related peptide*, Cys-LT = Cysteinyl-Leukotrien, GM-CSF = *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, T_H17-Zelle = IL-17 produzierende T_H-Zelle, TNF- α = Tumornekrosefaktor- α , nach [13].

sich Bereiche zerstörter und reparierter Epithelzellen. Entzündungen submucosaler Bereiche bedingen in erster Linie die Verdickung der retikulären Basalmembran (*lamina reticularis*) und Ablagerungen darunter befindlicher Matrixkomponenten [36]. Durch eine Zellhypertrophie wird die übermäßige Zellproliferation der glatten Muskulatur hervorgerufen, die das Zellvolumen bis auf das Zweifache anwachsen lässt. Desweiteren sind ödematöse Schwellungen der Atemwegswände und eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität Ergebnis der chronischen Inflammation. Die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität führt zu Schwellungen außerhalb der glatten Muskulatur und dadurch zu einem Druckverlust des elastischen Lungenwiderstands, so dass letztendlich eine Hyperreagibilität der Atemwege gegenüber Histamin und Cysteinyl-Leukotrienen resultiert [13, 36, 37].

Aus immuncytologischer Sicht ist die chronische Phase der allergischen Inflammation durch das komplexe Wechselspiel von Zellen sowohl der immanenten als auch der adaptiven Immunität gekennzeichnet (s. Abb. 1.6). Infolge des wiederholten Allergenkontakts siedeln sich eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten sowie Zellen der Monocyten-Makrophagenlinie (angeborene Immunität) und unterschiedliche Typen der T- und B-Zellen (erworbene Immunität), darunter auch T-Helfer-Lymphozyten des Typs 2, in den betroffenen Geweben an, deren interzelluläre Interaktionen durch eine Reihe präformierter und neu synthetisierter Mediatoren aufrecht erhalten wird [13]. Zusätzlich findet eine vermehrte Entwicklung IgE-tragender (via FcεRI) Mastzellen statt [13]. Weitere am Gesamtprozess der chronischen Entzündungsreaktion beteiligten Zellen sind zudem Epithelzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen der Atemwege [13]. Die durch die chronische, allergische Inflammation andauernde Schädigung der Epithelzellschicht kann darüber hinaus durch die Einwirkung viraler oder bakterieller Pathogene, Zigarettenrauch, umweltrelevanter Faktoren oder oxidativen Stress verstärkt werden. Eine daraufhin ausgelöste Antwort zur Reparatur dieser Zellen führt zu der Ausbildung einer sogenannten trophischen Einheit Epithel-Mesenchym, deren Beteiligung an der T_H2-Zell-vermittelten Inflammation und der dadurch bewirkten Sensibilisierung gegen weitere Allergene oder allergene Epitope und der strukturellen Veränderung der Atemwege diskutiert wird [34]. Abbildung 1.6 zeigt hierzu das Beispiel einer durch das Cytokin TSLP hochregulierten Expression co-stimulatorischer Moleküle dendritischer Zellen.

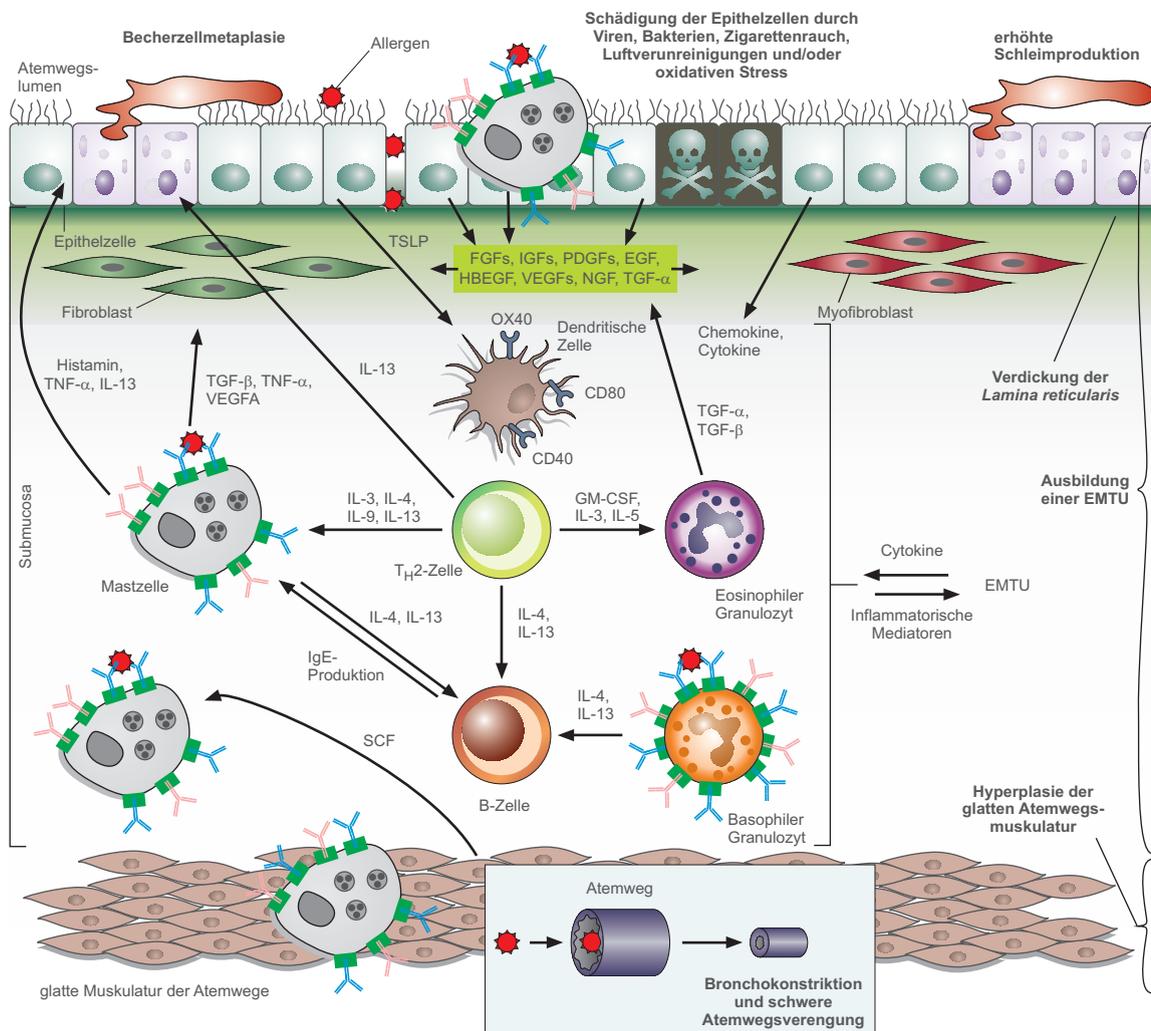


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der chronischen Phase der allergischen Atemwegsinfektion. Die wiederkehrende oder persistierende Allergenexposition hat unterschiedliche Effekte in der chronischen Phase der allergischen Entzündungsreaktion zur Folge. Zellen der immanenten Immunabwehr (Eosinophile, Basophile, Neutrophile und Monozyten-Makrophagen-Zelllinien) und der adaptiven Immunität (T_H2 -Zellen und andere T-Zelltypen sowie B-Zellen) siedeln sich im Gewebe an. Zudem nimmt die Entwicklung von Mastzellen, die eine riesige Anzahl an $Fc\epsilon R1$ -gebundener IgE-Antikörper präsentieren, im betroffenen Gewebe zu. Zwischen rekrutierten als auch geweberesidenten Zellen der immanenten und erworbenen Immunabwehr, Epithelzellen und Strukturzellen sowie den lymphatischen und Blutgefäßen und Nerven (nicht gezeigt) wird ein komplexes Wechselspiel unterschiedlicher Funktionen initiiert. Die fortwährende Zerstörung der Epithelzellschicht auf Grund der chronischen Inflammation kann durch den Kontakt mit anderen Pathogenen oder Umweltfaktoren verschlimmert werden. Die Reaktion des Organismus auf diese Zerstörung mit der steten Reparatur betroffener Zellschichten führt schließlich zur Bildung einer epithelialen-mesenchymalen trophischen Einheit (EMTU). Diese Einheit unterhält vermutlich eine T_H2 -Zellvermittelte Entzündungsreaktion, begünstigt die Sensibilisierung auf weitere Allergene oder allergene Epitope und reguliert den Remodelling-Prozess der Atemwegsgewebe. Diese Umstrukturierung der betroffenen Gewebe umfasst die Verdickung der Atemwegswände, die vermehrte Ablagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix und die Hyperplasie von Becherzellen verbunden mit einer erhöhten Schleimproduktion. Die Schwellung der Atemwegswände kann die ohnehin schon auftretende Bronchokonstriktion durch weitere Gefäßverengung dramatisch verschlimmern. EGF = epidermaler Wachstumsfaktor, FGF = Fibroblastenwachstumsfaktor, HBEGF = Heparin bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor, IGF = insulinähnlicher Wachstumsfaktor, NGF = *nerve growth factor*, PDGF = *platelet-derived growth factor*, SCF = Stammzellfaktor, TGF = transformierender Wachstumsfaktor, VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, nach [13].

1.2 Heparin-induzierte Thrombozytopenie und Thrombose

In Europa wie auch den USA ist unter den Antikörper-mediierten und durch Medikamentengabe induzierten Thrombozytopenien die sogenannte Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) die am häufigsten auftretende [38, 39]. Die HIT tritt bei ca. 1-2% der Patienten auf, denen im Rahmen einer therapeutischen oder prophylaktischen Maßnahme Heparin-Präparate verabreicht wurden. 10-20% dieser Patienten entwickeln nach Heparinkontakt sogar eine Extremitäten gefährdende und lebensbedrohliche Thrombose [40]. Obgleich tatsächlich viele Patienten Heparin/PF4-Komplex-reaktive Antikörper nach Heparin-gabe aufweisen, zeigt nur ein geringer Anteil dieser Individuen ein klinisch relevantes Krankheitsbild. Ursache hierfür ist die Ausbildung von Autoantikörpern gegen Komplexe aus dem heterologen Mucopolysaccharid Heparin und dem endogenen Protein Plättchenfaktor 4 (PF4). Trotz einiger ätiologischer Erkenntnisse ist der Mechanismus der HIT bisher nicht vollständig aufgeklärt und in weiten Teilen noch unverstanden. Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie stellt daher ein Modell einer ernst zu nehmenden und weit verbreiteten Autoimmunerkrankung immunologisch ansonsten unauffälliger Individuen dar.

Da in der vorliegenden Arbeit aviane spezifische Antikörper durch Immunisierung mit einem Heparin/PF4-Komplex-analogen Reagens generiert wurden und diese für den Einsatz in HIT-spezifischen Assaysystemen untersucht wurden, soll im Folgenden kurz auf den pathophysiologischen Mechanismus der HIT eingegangen werden.

1.2.1 Pathophysiologischer Mechanismus der HIT II

Der pathophysiologische Mechanismus einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie des Typs II ist in vereinfachter Darstellung in Abbildung 1.7 schematisch gezeigt. Aktivierte Thrombozyten setzen aus ihren α -Granulae Plättchenfaktor 4 (PF4) frei, welcher an freies Heparin bindet. Sobald ein kritisches stöchiometrisches Verhältnis zwischen Plättchenfaktor 4 und Heparin erreicht wird, kommt es zu einer Konformationsänderung des gebildeten Komplexes und Freilegung neuer Epitope. Der daraufhin als Immunogen fungierende PF4/Heparin-Komplex führt schließlich zur Bildung spezifischer Immunglobuline des Typs G (IgG₁ >

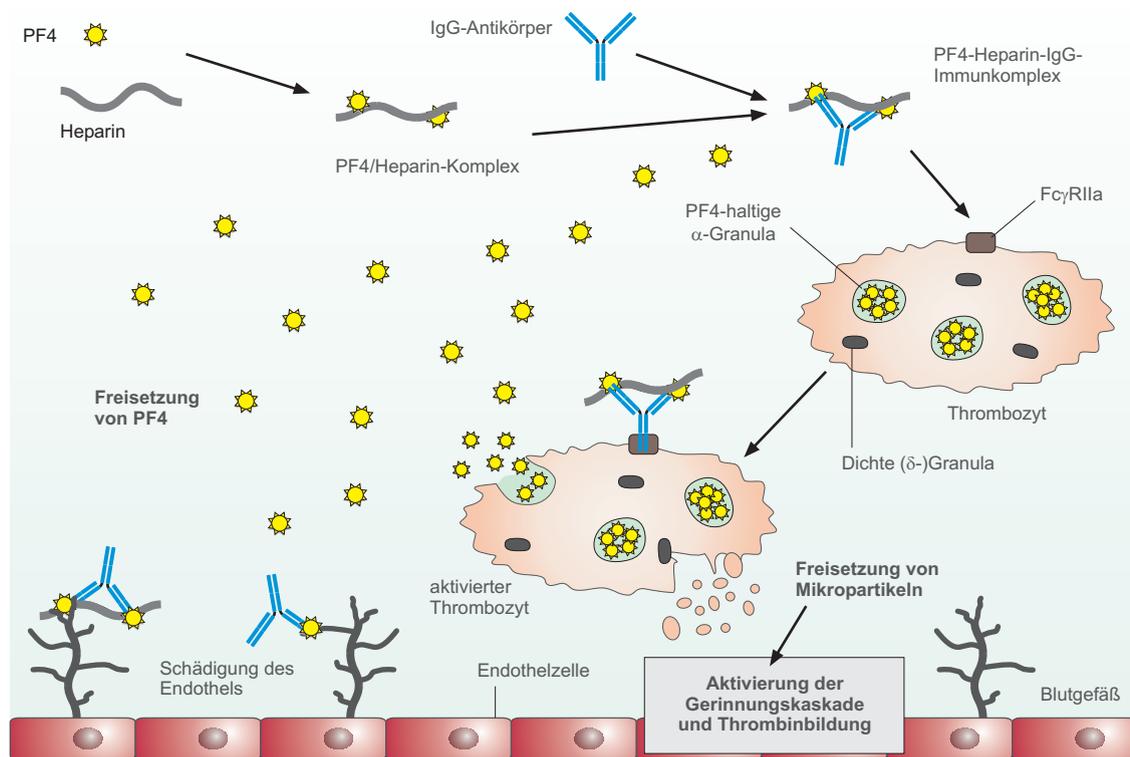


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des pathophysiologischen Mechanismus bei einer HIT II.

IgG₂ [41]). Die Interaktion der spezifischen Antikörper mit dem immunogenen Komplex führt schließlich zur Bildung eines multimolekularen PF4-Heparin-IgG-Immunkomplexes, der im konstanten Bereich der Antikörper über den niedrigaffinen Rezeptor Fc γ RIIIa auf Thrombozyten immobilisiert wird. Infolgedessen kommt es erneut zur Aktivierung von Thrombozyten und zur Ausschüttung weiterer PF4-Moleküle. Zusätzlich setzt die Auflösung der Thrombozyten (Thrombozytopenie) und die dadurch bedingte Bildung thrombozytärer Mikropartikel ein [42, 43]. Letztere besitzen die Eigenschaft, eine übermäßige Thrombinbildung zu initiieren, welche nicht selten zu einer akuten Thrombose führt. Neben den oben beschriebenen Interaktionen des multimolekularen Immunkomplexes treten auch Wechselwirkungen desselben mit heparinähnlichen Strukturen auf der Oberfläche von Monozyten und dem Endothel auf, was in der Produktion von Gewebefaktoren und der Schädigung epithelialer Zellen resultiert [42]. Beide Prozesse stehen im Verdacht, ebenfalls zur weiteren Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Thrombinproduktion beizutragen [42]. Ein in den thrombozytären Fc γ IIa-Rezeptoren auftretender Polymorphismus beeinflusst maßgeblich die Reaktivität der Thrombozyten, und die Gefahr, der phänotypischen Vielfalt der Rezeptoren wegen eine heparininduzierte Thrombozytopenie zu entwickeln, wird diskutiert [41].

1.3 Immunologische Diagnostik

1.3.1 Allergologie

Immunologische Erkrankungen auf Grund IgE-vermittelter allergischer Inflammationsprozesse oder autoreaktiver Immunglobuline des Typs G können individuell unterschiedliche Ausprägungen der Symptomatik und ihrer Folgen haben. Angefangen bei leichtem Nies- und Juckreiz und Hautrötungen bis hin zu schweren Atemwegsbeschwerden, Gewebnekrosen oder anaphylaktischen Schocks stellen derartige Erkrankungen Einschränkungen der Lebensqualität oder gar eine ernst zu nehmende Lebensbedrohung dar. Im Bereich der Allergie konnte in den vergangenen Jahren eine zunehmende Prävalenz diverser allergischer Erkrankungen in sowohl Industrienationen als auch Entwicklungsländern festgestellt werden. Und immer wieder werden neue Allergene entdeckt und kommen neue allergene Quellen hinzu. Der *World Allergy Organization* (WAO) zufolge sind ungefähr 20% der Bevölkerung der meisten entwickelten Länder von einer Allergie betroffen [44]. Die am häufigsten festgestellten allergischen Erkrankungen mit chronischer Manifestation sind hierbei die allergische Rhinitis, Asthma, Nahrungs(mittel)allergien und die Urticaria [44]. Der weltweit rasant ansteigenden Prävalenz der Allergie wegen muss diese als eines der hauptsächlich globalen Gesundheitsprobleme betrachtet werden. Und es müssen weltweit weitere Anstrengungen zur Verbesserung einer ausreichenden Allergiediagnostik zur Senkung der allergiebedingten Morbidität und Mortalität unternommen werden [45]. Nicht diagnostizierte und unbehandelte Allergien können beträchtliche Auswirkungen auf die Lebensqualität der Betroffenen und ihrer Familien aber auch hinsichtlich sozioökonomischer Aspekte haben. Jedem potentiellen Allergiker muss diesbezüglich eine kompetente medizinische Versorgung und Therapie zugesichert werden können. Die WHO (*World Health Organization*) schätzt, dass so beispielweise 250 000 Todesfälle infolge asthmatischer Erkrankungen jährlich vermieden werden könnten [45].

Zur Abklärung einer vermuteten allergischen Erkrankung stehen derzeit diverse Methoden der immunologischen (allergologischen) Diagnostik zur Verfügung. Der zu Beginn einer Diagnose sehr häufig eingesetzte Test ist der Skin-Prick-Test, mit dessen Hilfe eine Substanz auf Grund ihrer Eigenschaft, eine Entzündungsreaktion auszulösen, identifiziert werden kann [46]. Dieser Hauttest wurde erstmals im 19. Jahrhundert von Charles BLACKLEY angewendet und durch MANTOUX als Intrakutantest weiterentwickelt [47]. In seiner heutigen Form basiert er auf der

Methode nach LEWIS und GRANT [48]. Für die Durchführung werden wässrige Extrakte der zu untersuchenden allergenen Substanzen als Tropfen auf die Haut des Unterarmes oder des Rückens aufgebracht und durch Anritzen derselben mittels einer Lanzette in die Haut gebracht. Die Entwicklung eventueller Hautrötungen und -schwellungen (Quaddeln) wird als positive allergische Reaktion auf den entsprechenden allergenen Extrakt gewertet. Zwar besitzt diese Methode die Vorteile der einfachen Durchführbarkeit, eines schnell erzielbaren Resultats und eines geringen Kostenaufwands, jedoch sind quantitative Aussagen in Bezug auf die im Kontext der Allergie relevanten spezifischen IgE-Antikörper (sIgE) nicht möglich. Andere und in ähnlicher Weise durchgeführte Hauttests der Allergologie sind der Patch-Test oder Epikutantest [49], der Scratch-Test [50] und der 1911 von COOKE eingeführte Intrakutantest [51, 52], bei dem das Allergen in die Haut injiziert wird. Zusätzlich oder alternativ liefern auch Provokationstests durch orale oder nasale Applikation oder Inhalationstests (bronchiale Applikation) weitere Informationen [53–55]. Werden durch diese nicht-quantitativen Tests Hinweise auf das Vorliegen einer Allergie deutlich oder müssen beim Auftreten typischer klinischer Merkmale negative Ergebnisse der Haut- und/oder Provokationstests verifiziert werden, so finden eine Reihe serologischer und teils auch quantifizierender *in vitro*-Tests Anwendung [51]. Der erste dieser Bluttests ist der 1967 entwickelte *radioallergosorbent test* oder kurz RAST. Hierbei wird das zu untersuchende Allergen an eine unlösliche Polymerkomponente gebunden und mit dem zu untersuchenden Serum eines Patienten inkubiert. Liegen allergenspezifische Immunglobuline des Typs E vor, so binden diese an das immobilisierte Allergen. Nach Detektion mit radioaktiv markierten IgE-spezifischen Sekundärantikörpern (s. Abb. 1.8 A) und Entfernen nicht gebundener Antikörper, kann die gemessene Radioaktivität direkt mit der Menge spezifischer IgE (sIgE) korreliert werden [56]. Im Zuge der Etablierung des RAST wurde auch eine Klassifizierung vorgenommen, nach der bestimmte Zählraten der Radioaktivität in Korrelation mit Konzentrationsbereichen einer entsprechenden RAST-Klasse zugeordnet werden. Hierbei entspricht 0 einer nichtallergischen und 6 einer in starkem Maße sIgE-enthaltenden Serumprobe.

Seit der ersten Anwendung des RAST und der Kommerzialisierung hat die Assay-technologie zahlreiche Verbesserungen und Neuerungen erfahren, zu der eine bessere Charakterisierung der Allergen-Festphase, die Verfügbarkeit vieler monoklonaler Antikörper, deutlich verringerte Zeiten zur Durchführung des Assays, eine kostengünstigere Instrumentation, die Automation der Technologie und der Ersatz radioaktiver Marker durch Enzymlabel (z. B. EIA, FEIA und ELISA) zählen [51].

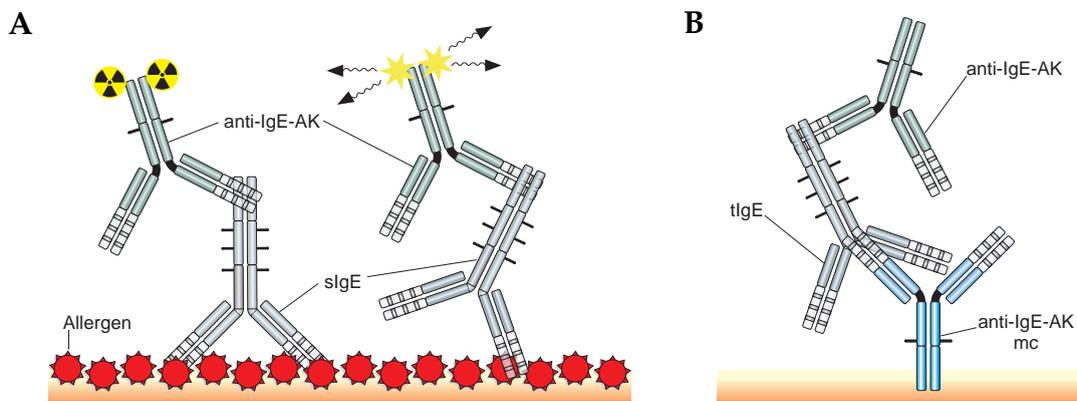


Abbildung 1.8: Darstellung von *in vitro*-Diagnosemethoden in RAST und ELISA..

Ein weiterer *in vitro*-Test ist der Basophilen-Aktivierungs-Test (BAT), bei dem die basophilen Granulozyten eines Patienten hinsichtlich Degranulation und Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren (häufig Histamin) nach Allergenkontakt untersucht werden können [57, 58]. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass ausschließlich die auf der Oberfläche von Basophilen präsentierten Immunglobuline der Klasse IgE in die Analyse einbezogen werden.

Die Quantifizierung spezifischer IgE-Antikörper erfolgt heutzutage durch Verwendung einer auf bekannte sIgE-Mengen bezogenen Eichkurve mittels heterologer Interpolation [59]. In der Praxis werden hierbei künstlich definierte Einheiten verwendet oder eine in Relation mit dem internationalen WHO-Standard 75/502 für humanes Serum-Gesamt-IgE [60] gesetzte Eichkurve zur Quantifizierung der sIgE-Titer zugrunde gelegt [61, 62]. In letzterem Fall definiert die WHO hierzu die Internationale Einheit (engl. *international unit*, IU) für jedes der bekannten humanen Immunglobuline der Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE der entsprechenden *International Reference Preparation of Human Serum Immunoglobulin* [60, 63]. So kann nach diesem Standard eine absolute Konzentrationsbestimmung des Gesamt-IgE in Internationalen Einheiten pro Milliliter erfolgen, wobei 1 IU 2.42 ng IgE entsprechen [64, 65]. Der Gesamt-IgE-Wert ist im Rahmen der allergologischen Diagnostik als Interpretationshilfe für die Beurteilung der spezifischen IgE-Konzentration von Bedeutung. Desweiteren spielt der Gesamt-IgE-Wert eine Rolle bei der Abklärung von Parasitosen und angeborener bzw. erworbener Immundefekte wie beispielsweise T-Zell-Defekten oder dem Hyper-IgE-Syndrom [62, 66]. In der Durchführung der Gesamt-IgE-Konzentrationsbestimmung werden zum einen immunologische Assays mit kompetitiver oder immunometrischer Verfahrensweise und einem Lumineszenz-, Fluoreszenz, Enzym- oder radioaktiv markierten IgE-spezifischen Sekundärantikörper herangezogen [62]. Andererseits kann die Bestimmung auch

mit der auf dem Tyndall-Effekt beruhenden Nephelometrie (Tyndallometrie) erreicht werden [67]. Für die Bestimmung der sIgE-Konzentrationen stehen diverse Methoden mit ähnlichem Prinzip zur Verfügung, bei denen spezifische Allergenextrakte oder – sofern verfügbar – rekombinante Einzelallergene in flüssiger Phase bzw. in fester Phase immobilisiert zum Einsatz kommen [68]. Eine Übersicht gängiger verfügbarer Testmethoden zur Bestimmung allergenspezifischer IgE-Antikörper findet sich in Renz *et al.* [62]. Unter den Blotverfahren sind der Dot-Blot, bei dem eine semiquantitative Bestimmung durch Vergleich mit einer standardisierten Farbskala erfolgt, und der Western Blot zu nennen. Letzterer ist jedoch eher aufwendig in der Durchführung und keine Methode der allergologischen Routinediagnostik. Zudem ergeben sich Probleme bei der Standardisierung und Quantifizierung. Die derzeit am weitesten verbreitete Anwendung finden die beiden Methoden, die auf dem Phadebas-RAST-System bzw. dem aus diesem hervorgegangenen ImmunoCAP-System (Phadia) basieren [69]. Auf Grund der breiten und langfristigen Erfahrung mit beiden Systemen werden diese sehr häufig als Referenzsysteme betrachtet. Die Vorteile des ImmunoCAP-Systems sind in der enorm hohen Gesamtbindefähigkeit der eingesetzten dreidimensionalen Zelluloseeinheiten zu sehen. Sie erlauben unabhängig von der Antikörperaffinität die Bindung aller relevanten Antikörper bei Gewährleistung einer geringen unspezifischen Reaktivität [70]. Ein weiterer Vorteil der verwendeten Zellulosekapseln ist der Erhalt der nativen Struktur des immobilisierten Allergens, so dass eine räumliche Abschirmung oder Zerstörung eines Epitops nahezu ausgeschlossen werden kann. Allerdings hängen Validität, Linearität, Parallelität und Reproduzierbarkeit von unterschiedlichen Parametern ab, die in alle *In vitro*-sIgE-Bestimmungsmethoden mehr oder minder stark einfließen [62].

1.3.2 Standardisierung

Bereits auf Basis des Gesamt-IgE-Spiegels sollen in der Atopie-Diagnostik Aussagen über das Vorliegen allergischer Erkrankungen getroffen werden. Die Angabe von Referenzbereichen für Gesamt-IgE-Werte unterliegt allerdings einer breiten Variation, da die Bestimmung dieser Werte in Abhängigkeit der verwendeten Methode bzw. der zugrunde gelegten Datenbasis erfolgt und Schwankungen unterliegt [62, 71]. Ebenso ist es schwierig, Normalwerte hinsichtlich Gesamt-IgE anzugeben, da diese in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und anderen Einflüssen niedriger oder höher ausfallen können [72, 73]. Das Vorliegen einer Atopie bzw. Allergie ist

nicht allein durch ein erhöhtes Gesamt-IgE beweisbar; ebenso schließt das Unterschreiten eines Grenzwertes eine Allergie nicht aus [74]. Zusätzlich wird daher die Bestimmung des spezifischen IgE herangezogen. Die derzeitige Bestimmung des spezifischen IgE durch Relation zu heterologen Gesamt-IgE-Referenzwerten ist eine erste Anstrengung zu einer in standardisierter Form erfolgenden Methode. Dennoch ergeben sich auch aus dieser Vorgehensweise Schwierigkeiten [75–79]. Diese resultieren ebenfalls aus der Verwendung unterschiedlicher Messmethoden und zudem durch Verwendung verschiedener nicht-standardisierter Reagenzien. Darüber hinaus sind die derzeitig definierten Reaktivitätsklassen zur Klassifizierung einer allergischen Erkrankung zu reformieren. OLLERT *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass die Festlegung der unteren Quantifizierungsgrenze – durch die heutige Gerätetechnologie realisierbar – auf 0.1 kIU/L statt z. Zt. 0.35 kIU/L eine optimierte Korrelation von Hauttestanalysen mit den spezifischen IgE-Werten ergab [80]. Für die Vergleichbarkeit unter allen diagnostischen Laboratorien und Praxen müssen nationale wie auch internationale Standards etabliert werden. Außerdem muss eine Standardisierung der zur Erstellung der Referenzkurven eingesetzten Reagenzien vorgenommen werden, um weitere Schwankungen mit Auswirkung auf die Variation der Messergebnisse auszuschließen.

Im Zuge einer authentischen Standardisierung versagt die sIgE-Quantifizierung mittels heterologer Interpolation streng genommen, da sie dem Bindungsverhalten allergenspezifischer IgE-Antikörper an das Antigen nicht Rechnung trägt. Aus dieser Sicht sollten bevorzugt allergen-spezifische IgE-Antikörper als Referenzmaterial bevorzugt werden. Die Verwendung von Poolseren, die aus einer Vielzahl spezifischer humaner IgE bestehen, wirft allerdings Probleme auf. So muss in erster Linie geklärt werden, wie solche Referenzpoolseren zusammengestellt und wie die Bereitstellung ausreichender Mengen garantiert werden soll. Weitere Einschränkungen ergeben sich aus der Verfügbarkeit von Seren für seltene Allergenspezifitäten, wie beispielsweise im Zusammenhang mit Nahrungsmittelallergien bei Kindern. Hier stehen ausreichende Serummengen für die Validierung eines Assaysystems praktisch nicht zur Verfügung. Die Chargenabhängigkeit und die dadurch bedingten Abweichungen der Poolseren untereinander sind ebenfalls kritisch zu betrachten.

1.4 IgY-Technologie – Polyklonale Antikörper durch Immunisierung

Alternativ zu humanen Poolseren können polyklonale spezifische Antikörper durch die Immunisierung von Tieren erhalten werden. Hervorzuheben ist vor allem die IgY-Technologie, die durch Immunisierung von Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) die gezielte Initiierung einer Immunantwort mit der Bildung polyklonaler spezifischer Antikörper erlaubt.

1.4.1 Aviane lymphatische Organe

Die zentralen (primären) lymphatischen Organe avianer Organismen sind der Thymus und die *Bursa fabricii*. Der Thymus ist lappenartig aufgebaut und seitlich der Luftröhre angeordnet. Die genauere Untersuchung der Thymusstruktur zeigt durch feines Bindegewebe verbundene Läppchen, in denen Rinde (*Cortex*) und Mark (*Medulla*) unterschieden werden können. In der Rinde finden sich dicht gepackte kleine Lymphozyten, während das Mark weniger dicht gepackte Lymphozyten, retikuläre Zellen und Inseln epithelialer Zellen (HASSALL-Körperchen), welche eine variable Anzahl an Granulozyten aufweist, beherbergt. Im Thymus findet die Entwicklung der T-Helfer- und T-Suppressorzellen statt, welche die Antikörperproduktion regulieren. Weitere Funktionen des Thymus sind verspätete Hypersensibilitätsreaktionen, Transplantat-Wirt-Reaktionen sowie cytotoxische Reaktionen und die Aktivierung von Makrophagen [81–83].

Die *Bursa fabricii* besitzt ein sackförmiges Aussehen und befindet sich am Dach der Kloake. Sie ist aus einigen tausend lymphatischen (bursalen) Follikeln aufgebaut, welche durch ein feines Bindegewebe zusammengehalten werden [84]. Die Follikel weisen ähnlich dem Thymus Rinde und Mark auf, mit dicht gepackten bzw. weniger dicht gepackten Lymphozyten und retikulären Zellen. Zu den Aufgaben der *Bursa* zählt vor allem die Diversifikation und Verstärkung Antikörper produzierender Zellen. Bereits zwei bis drei Wochen nach Schlüpfen des Kükens verlassen täglich etwa 5% der bursalen oder B-Zellen die *Bursa*, von wo aus sie zunächst in den Blutkreislauf gelangen, um sich dann in den B-Zellbereichen der Milz, des Thymus und zökalen Tonsillen anzusiedeln [81–83]. Neben der Rolle als primäres Lymphorgan kommt der *Bursa fabricii* auch eine Funktion als sekundäres lymphatisches Organ als Bestandteil des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes zu [85].

Zu den peripheren (sekundären) lymphatischen Organen zählen die Milz, die HARDER-Drüsen, das Knochenmark, das Conjunctiva-assoziierte lymphatische Gewebe (CALT), das Bronchien-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) und das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) [85]. Im diffusen Lymphgewebe, das sich im Parenchym vieler Organe wie Leber, Bauchspeicheldrüse oder Leber findet, existieren die sogenannten Keimzentren (engl. *germinal centers*). Diese beinhalten Populationen großer unreifer sowie mittelgroßer und kleiner reifer Lymphozyten. Durch eine feine Bindegewebskapsel sind die Keimzentren von dem umgebenden Gewebe getrennt. Zellen der Keimzentren und der Plasmazellen entstammen der *Bursa* und werden daher als *Bursa*-abhängiges Gewebe bezeichnet.

1.4.2 Aviane Leukozytenmarker

Zu Beginn der 1990er Jahre wurde durch ein neu gegründetes Komitee die Etablierung einer weitestgehend auf dem mammaliären CD-System basierenden avianen CD-Nomenklatur beschlossen. Neben einigen Ausnahmen zur Bezeichnung der Antigene, erfolgte die Bezeichnung derjenigen Antigene, von denen die Homologie zu den Mammalia-Analoga angenommen wurde, mit derselben für das Mammalia-CD-System verwendeten Zahl [86]. Seitdem konnten eine Reihe avianer Leukozytenantigene kloniert und deren signifikante Homologie zu den Mammalia-Antigenen gezeigt werden. Unter diesen zählen zu den wichtigsten Leukozytenantigenen CD3 [87], CD4 [88, 89], CD5 [90], CD8 [88], CD28 [91] und CD57 [92]. Mit Hilfe polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen funktionell wichtige T-Zellantigene konnten zudem T-Zellrezeptoren identifiziert und entsprechend ihrer Abstammung als TCR1, TCR2 und TCR3 (engl. *T cell receptor*) bezeichnet werden [93]. Trotz niedriger Homologie ihrer Gene zu den entsprechenden Säugetiergenen zeigen die TCRs hinsichtlich ihrer Entwicklung Parallelen zu den T-Zellrezeptoren der Mammalia [85].

1.4.3 Aviane Antikörper

Die Antikörper avianer Organismen werden den drei Immunglobulinklassen IgM, IgY und IgA zugeordnet [94]. Strukturell sind sie ähnlich den Mammalia-Antikörpern aus vier Ketten – zwei identische schwere Ketten und zwei identische leichte Ketten – aufgebaut, wobei jeweils eine schwere und eine leichte Kette paarweise

angeordnet sind. Jede der Ketten besteht zudem aus einem variablen und einem konstanten Bereich, wobei die variablen Domänen zusammen die antigenbindende Einheit bilden [95]. Avianes IgM ist der erste Antikörper, der nach erstmaliger Auslösung einer spezifischen Immunantwort beobachtet werden kann und zählt zu den hochmolekularen Antikörpern. IgM wird auf der Oberfläche der meisten avianen B-Zellen präsentiert [96]. Die Homologie zu Mammalia-IgM beträgt etwa 28–36% [85]. IgA ist der primäre Immunglobulinisotyp der Schleimhaut-assoziierten Immunabwehr. Klonierungsstudien mit der cDNA von HARDER-Zellen haben gezeigt, dass die C α -Kette aus vier Domänen besteht, von denen drei eine Homologie von 32–41% zu der humanen C α -Kette aufweisen [97]. Das humane IgA-Pendant besteht hingegen aus drei Domänen und einer *hinge*-Region. Von letzterer wird vermutet, dass sie im Laufe der Evolution durch Deletionen der C α 2-Domäne des ursprünglichen C α -Gens entstanden ist und in Hühnern stärker konserviert blieb [85]. Das auch als Serum-IgG bezeichnete IgY der Hühnervögel (*Galliformes*) weist ein Molekulargewicht von 180 kDa auf und besitzt in der konstanten Kette vier Domänen. In Gänsevögeln (*Anseriformes*), den nächsten Verwandten der Hühnervögel, einigen Reptilien (vor allem Schildkröten) und Lungenfischen kommt zudem eine verkürzte Variante von IgY (120 kDa) vor, welcher die C ν 3 und C ν 4 fehlen [98, 99]. Strukturell ähnelt diese Form dem F(ab')₂ [94]. Während das Volllängen-IgY in Hühnervögeln ausschließlich vorkommt, können beide Varianten in manchen Spezies der Gänsevögel existieren; einige Schildkrötenarten besitzen lediglich die verkürzte Variante [94]. Studien zur Phylogenetik haben gezeigt, dass die avianen und zu mammaliären IgG homologen IgY sowohl Ähnlichkeiten zu IgE und IgG aus Mammalia aufweisen. IgY ist der vorherrschende Serumantikörper, der nach IgM infolge einer Immunantwort gebildet wird, und der häufigste Isotyp im Rahmen einer sekundären Antwort [100]. Untersuchungen zur Präzipitation in Salzlösungen konnten zeigen, dass trotz der funktionellen Homologie zu Mammalia-IgG IgY andere biochemische Eigenschaften aufweisen. So können IgY auf Grund ihrer eingeschränkten Flexibilität unter physiologischen Bedingungen keine Antigene präzipitieren. Die beiden Arme des Antikörpers sind möglicherweise derart ausgerichtet, dass eine Quervernetzung über die Epitope großer Antigene verhindert wird [94]. Die in den Mammalia-IgG vorhandene *hinge*-Region ist vermutlich aus der C ν 2-Domäne hervorgegangen. Strukturell ähneln die IgY den IgE-Antikörpern aus Mammalia, da sie eine ähnliche Organisation der fünf Domänen und der Disulfidbrücken zeigen (s. Abb. 1.9) [101]. Zudem wurde die Eigenschaft von IgY beschrieben, anaphylaktische Reaktionen auslösen zu können [102]. Obgleich Berichte über die Existenz eines homologen gallinen IgD-Antikörpers in den frühen 1980er Jahren zu finden

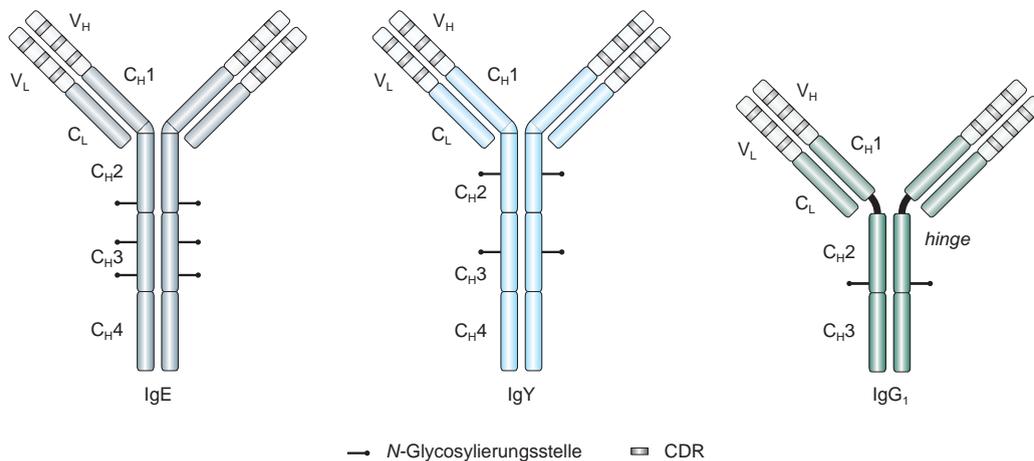


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der humanen Antikörper IgE und IgG₁ im Vergleich mit dem avianen Antikörper IgY

sind [103], besteht heutzutage Einvernehmen über den Mangel eines solchen. In gleicher Weise wird das Nichtvorhandensein avianer IgE-Antikörper übereinstimmend angenommen [104]. Da aviane IgY sowohl Eigenschaften und Funktionen der IgE und IgG aus Mammalia besitzen, werden sie als Vorläufer beider Antikörper angesehen [94].

1.4.4 Diversität avianer Antikörper

Die für die Expression der Immunglobulingene notwendige Genumlagerung (Rearrangement) des Huhns ist auf molekularer Ebene von der in Säugetieren nicht zu unterscheiden [105]. Dennoch existieren einige auffällige Unterschiede. In Mäusen und Menschen wird die Diversität des Antikörperrepertoires unter anderem durch die somatische Rekombination einiger variabler, diversifizierender (nur schwere Kette) und junktionaler Segmente erreicht [106]. Im Gegensatz dazu existieren im Huhn nur jeweils eine V- und J-Genregion für die leichte und schwere Kette [107, 108]. Während des Rearrangements der leichten Kette tritt somit nur eine Kombination von V_L und J_L auf. In ähnlicher Weise werden bei der Rekombination der schweren Kette zunächst sechzehn mögliche D_H-Segmente mit dem einen J_H-Segment verknüpft. Die so rearrangierten D_H-J_H-Komplexe werden im abschließenden Schritt mit der V_H-Region verbunden [109]. Durch die Verknüpfung der singulären V- und J-Regionen und wegen der hohen Sequenzhomologie der D-Segmente resultiert eine stark eingeschränkte minimale rekombinatorische Diversität. Um dennoch eine hohe Diversität zu erreichen, werden die V(D)J-Komplexe durch somatische Genkonversion in der *Bursa fabricii* prozessiert. Hierbei erfolgt

ein intrachromosomaler Transfer aus dem V_L - und V_H -Gen vorgelagerten Pseudogenen in die rekombinierten V(D)J-Gene [108, 110]. Die direkte Rekombination von ΨV_L und $\Psi V_D H$ mit dem J-Segment und anschließende Transkription ist nicht möglich [85].

1.4.5 Vorteile polyklonaler IgY

Die Wahl des domestizierten Haushuhns als Immunisierungsorganismus gegenüber anderen Labortieren ist von mehreren Vorteilen begleitet. Aus immunologischer Sicht sind Hühner auf Grund ihrer Phylogenese attraktiver für die Generierung polyklonaler Antikörper (vgl. Tabelle 1.1) [111, 112]. Durch die phylogenetische Distanz zum Menschen ist die Immunantwort im Gegensatz zu Kaninchen, Maus etc. gesteigert und die Produktion spezifischer Antikörper gegen konservierte Mammaliaproteine deutlich erfolgreicher [113, 114]. Darüber hinaus bedingt die stammesgeschichtliche Differenz, dass aviane IgY nicht nur eine größere Anzahl an Epitopen als ihr IgG-Analogon auf Mammaliaproteinen erkennen, sondern zusätzlich auch andere Epitope [114]. Dies ist vor allem auch im allergologischen Bereich von Interesse, wenn durch polyklonale IgY die Bandbreite potentieller Spezifitäten gegen ein bestimmtes Allergen abgedeckt werden sollen. Im autoimmunologischen Kontext ist, insbesondere wenn das zur Immunisierung eingesetzte Antigen ein intrazelluläres Säugerprotein ist, das Huhn das Labortier der Wahl, da intrazelluläre homologe Proteine innerhalb der Mammalia stärker konserviert sind als die extrazellulären Homologe [115]. Ein weiteres Problem beim Einsatz von Kaninchen, Maus u. a. Säugern ist die Gefahr der Kreuzreaktivität oder der Fc-abhängigen Effektorfunktionen, da hierdurch die potentielle Interaktion mit den Zielantikörpern besteht [112]. Ein generelles Problem bei der Verwendung von IgG in der immunologischen Diagnostik sind störende Interferenzen mit Bestandteilen humaner Serumproben. So können Mammalia-IgG die Aktivierung von Komplementfaktoren im Serum hervorrufen und zu verfälschten Ergebnissen führen [116]. Im Gegensatz zu IgG vermögen IgY das humane Komplementsystem nicht zu aktivieren [117]. Zudem binden IgY nicht an den humanen rheumatoiden Faktor (RF) [118] und an humane anti-Maus-Antikörper (HAMA) [119], welche ebenfalls Bestandteile des humanen Serums sind.

Auch aus wirtschaftlicher Sicht sind die Antikörper oviparer Tiere von großem Vorteil. Hühner transferieren über einen rezeptorvermittelten Mechanismus IgY zu großen Teilen in das Eigelb [120], so dass durch Sammeln und Aufarbeiten der

Eier polyklonale IgY in großen Mengen zugänglich sind. Durch die Entwicklung effizienter Methoden zur Isolierung und Reinigung der IgY aus dem Eigelb kann im Gegensatz zur Gewinnung von IgG aus dem Serum der Labortiere der Zeit- und Kostenaufwand sehr gering gehalten werden [121–125]. Zudem wird die Effizienz der Produktion polyklonaler Antikörper durch die Legeleistung und die IgY-Konzentration im Eigelb maßgeblich gesteigert. Im Durchschnitt produziert eine Legehenne fünf bis sechs Eier in der Woche. Mit einem durchschnittlichen Eigelb-Volumen von 15 mL enthält dieses 50–100 mg IgY, von denen 2–10 % spezifisch sind [126]. Im Vergleich zur Generierung polyklonaler Antikörper in Mammalia ist damit die Ausbeute bei Immunisierungen von Hühnern wesentlich höher. Vergleichbare Antikörpermengen können nur durch Verwendung großer Labortiere wie beispielsweise Pferde erhalten werden. Tabelle 1.1 zeigt hierzu den Vergleich zwischen polyklonalem IgG aus Kaninchen und avianen IgY. Da durch die Isolierung der IgY aus dem Eigelb Stressfaktoren und Schmerzen, wie sie durch die wiederkehrende Blutentnahme bei anderen Labortieren unvermeidbar sind, umgangen bzw. auf ein Minimum reduziert werden können, ist aus tierschutzrechtlichen Erwägungen die Immunisierung von Hühnern zur Produktion polyklonaler Antikörper vorzuziehen [127]. Demzufolge wird dies auch vom *European Centre for*

	IgG (Kaninchen)	IgY (Huhn)
Probennahme	Blutentnahme (20 mL/Woche)	Sammeln der Eier (täglich)
Reinigung	Abtrennung von Plasma- komponenten nötig	einfache Abtrennung der Lipidbestandteile
Probenvolumen (innerhalb von 2 Wochen)	40 mL Blut	14 Eier = 210 mL Eigelb ^a
Antikörpermenge	200 mg	1 120 mg ^b
Anteil spezifischer Antikörper	5 % (10 mg)	2–10 % (22.4–112 mg)
Kaninchen/Huhn - gesamt ^c	5–6	1
Kaninchen/Huhn - spezifisch ^d	2–11	1
weitere Antikörper	IgM, IgA, IgE	keine
Kreuzreaktivität	ja	nein
Komplementaktivierung	ja	nein
Bindung an humanen RF	ja	nein
HAMA	ja	nein
Bindung an Protein G/A	ja	nein

^a durchschnittliches Volumen eines Eigelbs: 15 mL; ^b durchschnittliche IgY-Menge: 80 g/Eigelb; ^c Anzahl der Kaninchen, die eine äquivalente Menge Antikörper produzieren wie ein Huhn in zwei Wochen; ^d Anzahl der Kaninchen, die eine äquivalente Menge spezifischer Antikörper produzieren wie ein Huhn in zwei Wochen

Tabelle 1.1: Vergleich zwischen IgG aus Mammalia und IgY aus Hühnervögeln für den Einsatz in der immunologischen Diagnostik und Therapie

Validation of Alternative Methods (ECVAM) empfohlen, um die Nutzung von Labortieren zu reduzieren, einzuschränken oder zu ersetzen [126].

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst spezifische polyklonale Antikörper mit Spezifität für das Modellallergen Bet v 1a durch Immunisierung von Hühnern generiert, isoliert und der Erfolg der Immunisierung verifiziert werden. Mit Hilfe rekombinant produzierter Allergene sollten die polyklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität analysiert werden. Auf Basis der vorliegenden IgY sollten in einem zweiten Schritt Adaptionmöglichkeiten evaluiert werden, die bei Erhalt der Spezifität eine Kompatibilität mit immunologischen Testsystemen erlauben. Im Rahmen der Evaluierung sollten verschiedene Konzepte unterschiedlicher Modifikationen zur Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate als potentielle Substitute für humane Referenzseren analysiert werden.

2 Material

2.1 Enzyme und Standards

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme und Standards wurden von nachstehend genannten Firmen bezogen: New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe). Enzyme als Bestandteil kommerziell erworbener Kits wurden bei dieser Auflistung nicht berücksichtigt.

2.2 Chemikalien und Bioreagenzien

Sämtliche Chemikalien und Bioreagenzien in molekularbiologischer bzw. analytischer Qualität wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad Laboratories (München), Sigma-Aldrich, Fluka (alle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Stratagene Europe (Amsterdam, Novagen (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach), Niederlande), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Biomol GmbH (Hamburg), AppliChem GmbH (Darmstadt), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO, USA), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Acros Organics (Geel, Belgien), Thermo Electron GmbH Bioscience Technologies (Dreieich) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg).

2.3 Affinitätsmatrizes

Folgende Matrizes für die affinitätschromatographische Reinigung und Isolierung von Proteinen wurden kommerziell erworben und verwendet:

Ni-NTA-Agarose QIAGEN (Hilden)

Amylose Resin New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)

2.4 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind mit ihren Zusammensetzungen nachfolgend aufgeführt. Puffer als Bestandteil käuflich erworbener Kits und Puffer für Restriktionsenzyme wurden bei dieser Auflistung nicht berücksichtigt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Herstellung/Lagerung	
Acetatpuffer für Glycolspaltung	100 mM	Natriumacetat-Trihydrat pH 4.5 einstellen
Acetatpuffer für die SPR-Spektroskopie	10 mM	Natriumacetat-Trihydrat pH 4.5 einstellen
Agarosegel-Auftragspuffer, orange (6×)	5 g 50 mg 1 mL ad 50 mL	Saccharose Orange G TAE (50×) mit H ₂ O auffüllen
Agarosegel-Auftragspuffer, blau (6×)	0.09 % (w/v) 0.09 % (w/v) 60 % (w/v) 60 mM	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Glycerol EDTA (Natriumsalz)
Ampicillin-Stocklösung	20 mg/mL	Ampicillin in ddH ₂ O oder 70 % Ethanol lösen steril filtrieren Lagerung bei -20 °C
Amylose-Säulenpuffer	20 mM 200 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 7.4 NaCl EDTA steril filtrieren (0.45 µm)
Amylose-Elutionspuffer	10 mM	Maltose in Amylose-Säulenpuffer lösen steril filtrieren (0.45 µm)

Tabelle 2.1: Zusammensetzung, Herstellung und Lagerung der verwendeten Puffer und Lösungen (*Forts. s. nächste Seite*)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Herstellung/Lagerung	
APS-Stocklösung	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat in dH ₂ O lösen Lagerung bei +4 °C
BCIP-Stocklösung	0.5 % (w/v)	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in DMF Lagerung bei -20 °C
Bicarbonatpuffer für Kopplung nach Glycolspaltung	100 mM 50 mM	Trinatriumcitrat-Monohydrat Natriumhydrogencarbonat pH 10 einstellen
Citratpuffer für HRP	50 mM	Citronensäure pH 4.0
Coomassie-Färbelösung	0.1 % (w/v) 1 % (v/v) 40 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250 Eisessig Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) 80 % (v/v)	Eisessig Wasser
Detektionspuffer (für AP)	100 mM 10 mM 100 mM ad 1 000 mL	Tris-HCl MgCl ₂ · 6 H ₂ O NaCl ddH ₂ O pH 9.5 einstellen
Detektionspuffer (für HRP im ELISA)	3.3 mg 15 mL 30 µL	ABTS Citratpuffer (für HRP) H ₂ O ₂ (30 %)
EDC-Lösung (für Sensor- chip-Aktivierung)	400 mM	EDC in ddH ₂ O lösen, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
Elutionspuffer (für Ni-IMAC)	300 mM	Imidazol in PBS

Tabelle 2.1: Zusammensetzung, Herstellung und Lagerung der verwendeten Puffer und Lösungen (Forts. s. nächste Seite)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Herstellung/Lagerung	
Elutionspuffer (für Amylosematrix)	10 mM	Maltose in Säulenpuffer
Fötale Kälberserum (FKS)		Komplementinaktivierung bei 56 °C für 30 min, aliquotiert (50 mL) bei -20 °C lagern
Glucose-Stocklösung	50 % (w/v)	α -D-Glucose (wasserfrei) in ddH ₂ O lösen steril filtrieren Lagerung in 50 mL-Aliquots bei RT
Natriumacetat-Lösung	3 M	Natriumacetat, pH 5.2
Natriumacetatpuffer für Glycolspaltung	100 mM	Natriumacetat, pH 4.5
NBT-Stocklösung	0.1 % (w/v)	NBT in 0.1 M Tris-HCl, aliquotiert (1 mL) bei -20 °C lagern
NHS-Lösung (für Sensor- chip-Aktivierung)	100 mM	NHS in ddH ₂ O lösen, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
PBS (20 mM Gesamtphosphat)	7.7 mM 12.3 mM 150 mM	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O Na ₂ HPO ₄ , wasserfrei NaCl pH 7.4 einstellen
Säulenpuffer (für Amylosematrix)	20 mM 200 mM 1 mM	Tris-HCl NaCl EDTA, Dinatriumsalz
SDS-PAGE-Anodenpuffer	40 mM	Tris-HCl pH 8.9 einstellen

Tabelle 2.1: Zusammensetzung, Herstellung und Lagerung der verwendeten Puffer und Lösungen (*Forts. s. nächste Seite*)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Herstellung/Lagerung	
SDS-PAGE-Kathodenpuffer	100 mM 100 mM 0.1 % (w/v)	Tris-HCl Tricin SDS pH 8.6 einstellen
SDS-PAGE-Probenpuffer (3×)	250 mM 40 % (v/v) 8 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6.8 Glycerol SDS
optional:	100 mM	DTT
SDS-PAGE- Sammelgelpuffer (4×)	0.5 M 0.4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6.8 SDS Lagerung bei +4 °C
SDS-PAGE-Tankpuffer (5×)	125 mM 960 mM 0.5 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8.3 Glycin SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer (4×)	1.5 M 0.4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8.8 SDS Lagerung bei +4 °C
TAE-Puffer	2 M 50 mM	Tris-Acetat EDTA (Natriumsalz) pH 8.5 einstellen
TBS	50 mM 150 mM	Tris-HCl, pH 7.5 NaCl
Tween-PBS	0.01 % (w/v)	Tween 20 in PBS
Transferpuffer	25 mM 19.2 mM 20 % (v/v)	Tris, pH 8.3 Glycin Isopropanol
Tris-Tricin-Gelpuffer	3 M 0.3 % (w/v)	Tris, pH 8.45 SDS

Tabelle 2.1: Zusammensetzung, Herstellung und Lagerung der verwendeten Puffer und Lösungen

2.5 Medien

Medium	Zusammensetzung/Herstellung/Lagerung	
2YT-Medium	16 g 5 g 10 g ad 1 000 mL	Trypton NaCl Hefeextrakt ddH ₂ O autoklavieren
Einfriermedium für Mammalia-Zellen	90 % (v/v) 10 % (v/v)	FKS DMSO (für die Zellkultur)
LB-Medium	10 g 10 g 5 g ad 1 000 mL	Trypton NaCl Hefeextrakt ddH ₂ O autoklavieren
Medium für Mammalia -Zellen	10 % (v/v) 1 % (v/v)	DMEM FKS Penicillin/Streptomycin
TYE-Medium (für Kultur-Platten)	10 g 8 g 5 g 15 g ad 1 000 mL	Trypton NaCl Hefeextrakt Agar ddH ₂ O autoklavieren

Tabelle 2.2: Zusammensetzung, Herstellung und Lagerung der verwendeten Medien

2.6 Kommerzielle Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden, kommerziell erhältlichen Kits verwendet:

MBI Fermentas (St. Leon-Rot)	<i>GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit</i> <i>GeneJET™ Gel Extraction Kit</i>
Applied Biosystems (Darmstadt)	<i>Big Dye-Terminator Ready Reaction Kit</i>
Bethyl Lab Inc. (Montgomery, TX, USA)	<i>Human IgE ELISA Quantitation Set</i> <i>Human IgG ELISA Quantitation Set</i> <i>Human IgA ELISA Quantitation Set</i> <i>Chicken IgG ELISA Quantitation Set</i>
PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)	<i>peqGOLD Plant DNA Mini Kit</i>
Invitrogen GmbH (Karlsruhe)	<i>Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit</i>

2.7 Vektoren

Der verwendete Vektor pcDNA3.1/Zeo zur eukaryotischen Expression in Mammalia-Zellen und der für die prokaryotische Expression in *E. coli* eingesetzte Vektor pET-22b(+) wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Der Vektor pCR®-Blunt II-TOPO® ist Bestandteil des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Für die Klonierung und rekombinante Expression allergener MBP-Fusionsproteine fand der Vektor pMAL-c2X der New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.) Anwendung.

2.8 Oligonukleotide

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

2.9 Antikörper

Die kommerziell erhältlichen und in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)	anti-murinIgG, AP-konjugiert anti-humanIgG (γ -Kette), AP-konjugiert anti-humanIgA, AP-konjugiert anti-humanIgM, AP-konjugiert anti-IgY, AP-konjugiert
BD Biosciences (Heidelberg) 5Prime via VWR (Darmstadt)	anti-humanIgE, monoklonal Penta His, His-Tag-spezifisch

2.10 *E. coli*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme leiten sich von dem *E. coli*-K12-Stamm ab. Für standardisierte molekularbiologische Methoden sowie zur Expression unterschiedlicher (Fusions-)Proteine wurden die Stämme DH5 α , XL1-Blue (Stratagene), ER2566 (NEB) und ER2529 (NEB) verwendet. Sie sind nachstehend mit ihrem entsprechenden Genotyp aufgelistet.

DH5 α

F⁻ endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1.Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169

XL1-Blue

recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

ER2566

F⁻fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10-Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10

ER2925

ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2

2.11 Zelllinien und Zellkultur

Zur rekombinanten Expression in Mammalia-Zellen wurde die Expressionszelllinie HEK293 verwendet. HEK293-Zellen entstammen einer Expressionszelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, welche durch Transformation mit einem Fragment des Adenovirus 5 immortalisiert worden sind [128].

Die Gewebekulturmedien DMEM und MEM sowie Kulturmediumzusätze (Penicillin G, Streptomycin) und Zeocin wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Trypsin-EDTA (gebrauchsfertig) wurde von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bzw. PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen. Fötale Kälberserum (FKS) wurde von BIOCHROM AG (Berlin) und PAA Laboratories GmbH (Cölbe) erworben. Gewebekulturflaschen und Gewebekulturplatten wurden von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) geliefert.

2.12 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Materialien und Plastikwaren für den Laborbedarf wurden von Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Eppen-

dorf AG (Hamburg), Renner GmbH (Dannstadt), Millipore GmbH (Schwalbach), Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH (Hamburg), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) bezogen.

Pipetten wurden von den Firmen Gilson International (Bad Camberg), Eppendorf AG (Hamburg) und PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) eingesetzt. Nitril- sowie Polyvinylhandschuhe wurden von VWR (Darmsatdt) erworben.

2.13 Geräte

20×20 Semi Dry Blotter Unit	bioStep GmbH (Jahnsdorf)
250-240 Sonifier Analog Cell Disruptor	Branson Ultrasonics (Shanghai, China)
Agilent 6224 Accurate-Mass TOF LC/MS	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge 5417 C	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG (Hamburg)
CO ₂ -Begasungsinubator	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold)
Dual Gel Caster SE245	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA)
Electrophoresis power supply EPS 3500XL	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
Gel-Dokumentationssystem	Intas GmbH (Göttingen)
GENIOS Multi-Detektions Reader	TECAN Deutschland GmbH (Crailsheim)
Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech GmbH (Osternode/Harz)
HERAsafe HS 18 Sicherheitswerkbank	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold)
Horizontal-Gelelektrophoresesystem	PEQLAB Biochtechnologie GmbH (Erlangen)
innova TM 4300 incubator shaker	New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen)

innova™4330 refrigerated incubator shaker	New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen)
Laborautoklav Systec V120	Systec GmbH (Wettenberg)
Mastercycler gradient	Eppendorf AG (Hamburg)
Mastercycler personal	Eppendorf AG (Hamburg)
Milli-Q Academic, Laborwasser-System	Millipore GmbH (Schwalbach)
Multiple Gel Caster SE215	Hofer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA)
SANYO CO ₂ -Inkubator MCO-17 AI	SANYO Electric Co., Ltd. (Japan)
Scanspeed 1524 M	biolabproducts GmbH (Gödenstorf)
SE250 Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis Unit	Hofer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA)
SPR-2 Biosensor	Sierra Sensors GmbH (Hamburg)
UV-Transilluminator (302 nm, 90 W)	Otto Steiner GmbH & Co. KG (Hamburg)
Waagen	Sartorius AG (Göttingen)

3 Methoden

3.1 Chemische Methoden

3.1.1 Kopplung von Proteinen mittels Glutardialdehyd

Das homobifunktionelle Reagenz Glutardialdehyd erlaubt die Verknüpfung von Proteinen mit Hilfe terminaler ϵ -Aminogruppen der Lysinreste. Aus der Reaktion nucleophiler Aminogruppen und der jeweiligen Aldehydgruppe entstehen sogenannte Schiff'sche Basen oder Iminbrücken. Der Vorteil liegt bei einer Umsetzung der Proteine unter milden Bedingungen.

Die Verknüpfung avianer Immunglobuline mit Hilfe von Glutardialdehyd wurde entweder in PBS (pH 7.5) bzw. in Bicarbonat-gepufferter Citratlösung (pH 10) durchgeführt. Definierte Konzentrationen des Proteins wurden hierzu in entsprechendem Puffer verdünnt und mit unterschiedlichen Konzentrationen Glutardialdehydlösung umgesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rotator wurden die Proben mit einem $10\times$ molaren Überschuss bezogen auf GDA mit 1 M Tris-HCl-Lösung zur vollständigen Umsetzung des Dialdehyds versetzt. Die Proben wurden abschließend mit Hilfe von Diafiltrationseinheiten gegen PBS (pH 7.5) dialysiert und für weitere Versuche eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch.

3.1.2 Glykolspaltung nach MALAPRADE

Die oxidative Spaltung von Kohlenhydraten gelingt nach MALAPRADE durch Reaktion mit Natrium-*meta*-periodat [129–132]. Da dieses Reagenz unter milden Bedingungen die Generierung von Aldehydgruppen ermöglicht, lassen sich auch die Glykostrukturen von Proteinen spalten und verknüpfenden Reaktionen mit Aminogruppen zugänglich machen.

Für die Umsetzung mit Periodat wurden 500 µg IgY in 500 µL Natriumacetatpuffer (pH 4.5) verdünnt und mit 10 mM Natrium-*meta*-periodat 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde mit 10 µL Ethylenglycol zum Abfangen nicht reagierten Periodats versetzt und weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde über Ultrafiltrationseinheiten gegen Natriumacetatpuffer (pH 4.5) dialysiert und konzentriert. Die Bestimmung der Konzentration der IgY erfolgte photometrisch.

3.1.3 Kopplung von IgY nach Glycolspaltung

Die in Natriumacetatpuffer (pH 4.5) vorliegenden und der Glycolspaltung unterzogenen IgY wurden zur aminoreaktiven Kopplung mit PBS (pH 7.5) bzw. citrathaltigem Bicarbonatpuffer (pH 10) versetzt und über Nacht bei RT auf dem Rotator inkubiert. Die Antikörper wurden nach Reaktion in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen und gelelektrophoretisch analysiert.

3.1.4 Biotinylierung mit TFPA-PEG₃-Biotin

Die Biotinylierung mit dem photoinduzierbaren Reagenz TFPA-PEG₃-Biotin erfolgte in Anlehnung an die Angaben des Herstellerprotokolls. 500 µg der zu biotinylierenden Antikörper wurden in PBS (pH 7.5) mit dem 50–100fachen molaren Überschuss des in DMSO gelösten Biotinylierungsreagenzes versetzt und 60 min auf dem Eisbade unter Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=365$ nm, 6 W) inkubiert. Nach Reaktion wurden die Antikörper mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten gegen PBS (pH 7.5) dialysiert und konzentriert. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch.

3.1.5 Biotinylierung durch Umsatz mit dem BACH-Reagenz

Zur Biotinylierung mit dem Säurehydrazid BACH wurden 500 µg der zuvor nach 3.1.2 oxidierten Antikörper in Acetatpuffer (pH 4.5) mit dem in DMSO gelösten Reagenz BACH in 30fach molarem Überschuss versetzt und bei RT über Nacht auf dem Rotator inkubiert. Abschließend wurden die Antikörper über Ultrafiltrationseinheiten gegen PBS (pH 7.5) dialysiert und konzentriert. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch.

3.1.6 Darstellung von *N*-2,4,6-Trinitrophenyl-1,10-decandiamin

Das für die haptenmodifizierenden Experimente eingesetzte *N*-(2,4,6-Trinitrophenyl)-1,10-decandiamin (TNPA) wurde zuvor folgendermaßen dargestellt. 10.0 mg (34.1 mmol) des TNT-Derivats 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure wurden in ddH₂O gelöst (500 µL) und mit 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 9–10 eingestellt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 5.9 mg (34 mmol) 1,10-Decanamin in 500 µL ddH₂O gelöst und ebenfalls auf einen pH-Wert von 9–10 eingestellt. Zu dieser Lösung wurde nun die Sulfonsäure gegeben und das Gemisch bei RT über Nacht auf einem Rotator inkubiert. Das Produktgemisch wurde mit Dichlormethan extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in Dichlormethan gelöst und mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. TNPA, das zur Haptenmodifizierung verwendet wurde, wurde in ddH₂O gelöst.

3.1.7 Haptenmodifizierung mit TNBS

Die unselektive Haptenmodifizierung der IgY wurde mit TNBS durchgeführt. Hierzu wurden 500 µg der spezifischen IgY in 50fach molarem Überschuss mit TNBS in PBS (pH 7.5) vermischt und der pH-Wert auf 8–9 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 2 h. Zur Abtrennung unumgesetzten Reagenzes wurden die markierten Antikörper über eine kleine PD-10-Gelfiltrationsmatrix gereinigt und anschließend über Ultrafiltrationseinheiten gegen PBS (pH 7.5) dialysiert und konzentriert. Die Proteinbestimmung erfolgte unter Vernachlässigung des Beitrags des Haptens zur Absorption durch photometrische Analyse.

Für die selektive Haptenmodifizierung wurden 500 µg der zuvor nach 3.1.2 oxidierten Antikörper in PBS (pH 7.5) oder Bicarbonatpuffer (pH 10) mit 50 µL des synthetisierten Haptens TNPA (4 mg/mL in ddH₂O) über Nacht bei RT auf dem Rotator inkubiert. Die Antikörper wurden dann direkt für die ELISA-Analysen eingesetzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten wurden, sofern nicht anderweitig kenntlich gemacht, nach SAMBROOK *et al.* [133] in einem Labor der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Die Zellen einer 4 mL-Übernachtskultur wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen (4 000 rpm, 4 °C, 15 min). Das Zellpellet wurde sorgfältig in 100 µL Lösung I resuspendiert und nach Zugabe von 200 µL frisch angesetzter Lösung II und mehrmaligem Invertieren zur Lyse für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Proteinpräzipitation durch Zugabe von 150 µL Lösung III, wobei die Probe einige Male invertiert und 5 min auf Eis inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (20 800 g, 10 min, RT) wurde der Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und die Fällung der Plasmid-DNA mittels Isopropanol nach 3.2.8 durchgeführt. Der Überstand wurde entfernt, das Zellsediment bei RT getrocknet und erneut in 100 µL ddH₂O aufgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen mit Kitsystemen

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellkulturen erfolgte unter Verwendung des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II* (PEQLAB GmbH, Erlangen). Die Isolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei 280 nm.

3.2.3 PCR-Techniken

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, *in vitro* spezifisch geringe Mengen vorliegender DNA zu amplifizieren. Die Spezifität wird durch die dabei verwendeten Oligonukleotide vorgegeben. Oligonukleotide sind kurze DNA-Fragmente, die

das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren und als Startsequenz für die Polymerase dienen. Sie können für jedes Segment mit Kenntnis der zu flankierenden Sequenz spezifisch synthetisiert werden.

In einem ersten Schritt wird das doppelsträngige DNA-Fragment denaturiert und dient nun als Vorlage. Die Oligonukleotide hybridisieren in einem zweiten Schritt mit dem 5'-Ende bzw. 3'-Ende der DNA-Matrize (Hybridisierung). Die Elongation als dritter Schritt terminiert den ersten Amplifizierungszyklus: die hitzeresistente DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (bzw. eine andere geeignete Polymerase) lagert sich an die flankierten Bereiche an und synthetisiert in Anwesenheit freier dNTPs die komplementären DNA-Stränge. Schließlich wird dieser Zyklus stets wiederholt und eine exponentielle Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments erreicht.

Die Bedingungen für die PCR sind so gewählt, dass die jeweilige Polymerase während des gesamten Prozesses stabil und damit in ihrer aktiven Form vorliegt. Da das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase bei 72 °C liegt, wird die Elongation bei dieser Temperatur durchgeführt. Hingegen wird der erste Schritt eines jeden Zyklus bei 94 °C durchlaufen. Dies gewährleistet einerseits eine ausreichende Denaturierung der doppelsträngigen DNA, andererseits bleibt die Polymerase in ihrer Stabilität nahezu unbeeinflusst. Die Hybridisierungstemperatur ist in Abhängigkeit der Oligonukleotidlänge zu wählen. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Anzahl zu amplifizierender Basenpaare (1 min pro 1 000 bp). Je nach Anforderung werden auch andere Enzyme als die hier verwendete *Taq*-Polymerase eingesetzt.

PCR mit Plasmid-DNA Unter Verwendung von Plasmid-DNA als Template zur Erzeugung spezifischer Amplifikate wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µL nach folgendem Schema zusammengestellt:

5 µL	PCR-Puffer (5×)
1.6 µL	dNTPs (12.5 mM)
1 µL	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µL)
1 µL	<i>sense</i> -Oligonukleotid (25 pmol)
1 µL	<i>antisense</i> -Oligonukleotid (25 pmol)
1 µL	DNA-Template
ad 50 µL	ddH ₂ O

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	94 °C	30 s
2 Hybridisierung	48–60 °C*	1–2 min
3 Elongation	72 °C	1–2 min
30 Zyklen (Schritt 1–3)		
4 terminale Elongation	72 °C	10 min

Tabelle 3.1: Standard-PCR-Programm (*Hybridisierungstemperatur der jeweiligen Oligonukleotide beachten)

Die Amplifizierung wurde mit dem in Tabelle 3.1 aufgelisteten Programm durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze einer gelelektrophoretischen Analyse bzw. Präparation mit nachfolgender DNA-Isolierung nach 3.2.7 unterzogen.

PCR zur Hybridisierung von DNA-Fragmenten

5 µL PCR-Puffer (5×)
 1.6 µL dNTPs (12.5 mM)
 1 µL *Taq*-Polymerase (1 U/µL)
 1 µL DNA-Template
 ad 48 µL ddH₂O

Nach 7 Zyklen Zugabe von:

1 µL *sense*-Oligonukleotid (25 pmol)
 1 µL *antisense*-Oligonukleotid (25 pmol)

Die Amplifizierung wurde mit dem in Tabelle 3.1 aufgelisteten Programm durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze einer gelelektrophoretischen Analyse bzw. Präparation mit nachfolgender DNA-Isolierung nach 3.2.7 unterzogen.

3.2.4 Cycle-Sequenzierung

Das Prinzip der erstmals 1989 beschriebenen *Cycle*-Sequenzierung [134] kombiniert die Didesoxy-Kettenabbruch-Sequenzierung nach Sanger [135] und die *Thermal Cycling*-Methode, wie sie bei der PCR-Technik verwendet wird. Anwendung findet das *Cycle Sequencing*, um bereits Sequenzinformationen aus einer im femtomolaren Bereich liegenden DNA-Probe zu erhalten.

Die Sequenzierung nach SANGER verwendet als spezifische Terminatoren der Kettenverlängerung die Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), Analoga der dNTPs. Sobald einer dieser Didesoxybausteine in das bestehende DNA-Fragment eingebaut worden ist, kann die Kette nicht weiter verlängert werden, da Didesoxynukleotidtriphosphaten die 3'-Hydroxylgruppe zur Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterbrücke fehlt. Insgesamt erfolgen für jede Sequenz vier Oligonukleotid-Extensionen, wobei jede ein spezifisches ddNTP-Analogon verwendet: ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP. In jeder Reaktion wird eine Reihe an Produkten unterschiedlicher Länge erzeugt, die mit dem jeweiligen Nukleotid enden. Aus der gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierungsprodukte und deren Vergleich untereinander erhält man schließlich die Informationen für die Sequenz des untersuchten Templates. Am häufigsten werden heutzutage fluoreszenzmarkierte ddNTPs verwendet, die die Analyse der zu untersuchenden Proben vereinfachen. Im Gegensatz zur traditionellen Sanger-Methode sind die Menge an Didesoxyprodukten und damit verbunden die Sensitivität der Sequenzierungsreaktion bei der *Cycle*-Sequenzierung keine limitierenden Faktoren.

Sequenzierungen wurden in dieser Arbeit unter Verwendung des *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Version 1.1* (Applied Biosystems, Darmstadt) oder durch Auftragserteilung extern bei den Firmen SeqLab – Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) und GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

Der Sequenzierungsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

x µL	Plasmid-DNA (125–250 ng)
2 µL	<i>Big Dye-Terminator Ready Reaction Mix ABI V1.1</i> (Polymerase, dNTPs, ddNTPs, Puffer)
2 µL	Puffer (2.5×)
1 µL	(vektor)spezifisches Oligonukleotid (5 pmol)
ad 20 µL	ddH ₂ O

Tabelle 3.2 zeigt das verwendete Sequenzierungsprogramm.

Der Sequenzieransatz wurde durch eine Alkoholpräzipitation (s. 3.2.8) gefällt und die DNA mindestens 1 h bei RT getrocknet. Die weitere Prozessierung der Sequenzierungsprodukte sowie die gelelektrophoretische fluoreszenzunterstützte Analyse erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE, Hamburg) unter Verwendung des *3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Software *Sequencing Analysis 5.1.1* (Applied Biosystems, Darmstadt) dien-

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	96 °C	30 s
2 Hybridisierung	48–60 °C*	15 s
3 Elongation	60 °C	4 min
30 Zyklen (Schritt 1-3)		

Tabelle 3.2: Temperaturprogramm für die *Cycle*-Sequenzierung (*Hybridisierungstemperatur der jeweiligen Oligonukleotide beachten)

te zur Digitalisierung und Auswertung der Sequenzierungsdaten.

3.2.5 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Die Isolierung der genomischen DNA aus der Sojabohne (*Glycine max*) erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD Plant DNA Mini Kit* (PEQLAB GmbH, Erlangen). Die Durchführung orientierte sich an den Angaben des Herstellerprotokolls.

Die in handelsüblicher Pflanzenerde angezogenen Sojapflanzen wurden nach zehn Tagen von Wurzeln und Erde befreit und für die Isolierung der gDNA verwendet. In einem Mörser wurden die Pflanzen (inklusive der Kotyledonen) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe von Seesand feinst zerrieben. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die zerriebenen Pflanzenteile stets gefroren blieben und eventuell flüssiger Stickstoff nachgefüllt wurde. Ca. 100 mg des Pflanzenmaterials wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und nacheinander mit 400 µL Lysis-Puffer PL1 und 15 µL RNase A (20 mg/mL) versetzt. Der Ansatz wurde 10 s gevortext, bis eine homogene Lösung entstanden war. Anschließend erfolgte die Inkubation auf dem Wasserbad bei 65 °C für 30 min, wobei zwischendurch 4 mal für 10 s gevortext wurde. Nach Zugabe von 100 µL Lysis-Puffer PL2 und Vortexen für 5 s wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und dann bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Microfilter wurde in ein 2 mL-Auffanggefäß gesetzt und das Zentrifugat darin überführt. Es wurde für 1 min bei 10 000 g zentrifugiert und der Durchfluss weiterverwendet. Zu diesem wurden 0.5 Volumenteile DNA-Bindpuffer gegeben und durch Pipettieren sorgfältig gemischt. Die *Perfect-Bind DNA Column* wurde in ein 2 mL-Auffanggefäß gesteckt und der gesamte Ansatz in die Säule pipettiert. Nach Zentrifugation (10 000 g, 1 min) und Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule mit 650 µL des komplettierten DNA-Waschpuffers durch Pipettieren und Zentrifugieren (10 000 g, 1 min) gewaschen. Der Waschschrift wurde 1 mal wiederholt. Zum Trocknen wurde die Säule in das geleerte Auffangge-

fäß gesteckt und 2 min bei 10 000 g zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Elution der DNA. Hierzu wurde die Säule in ein steriles 1.5 mL-Reaktionsgefäß gesteckt und 100 µL Elutionspuffer hinzugeben. Nach Inkubation für 2 min wurde zentrifugiert (6 000 g, 1 min). Der Elutionsschritt wurde mit 100 µL Elutionspuffer 1 mal wiederholt. Die isolierte genomische DNA wurde direkt für die Amplifizierung eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten sowohl in präparativer als auch analytischer Weise wurde die Agarose-Gelelektrophorese als Standardmethode der Wahl eingesetzt. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes gelingt es, DNA in Abhängigkeit der Molekülgröße zu trennen. Als Elektrophoresemedium wurden je nach Bedarf 1 %ige (z. B. für Plasmid-DNA) bis 2 %ige (für Fragmente <500 bp) Agarosegele angefertigt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose mit 50 mL TAE-Puffer (0.5×) versetzt und durch Erhitzen im Mikrowellenofen gelöst. Die Lösung wurde mit 50 µL des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (10 mg/mL) für die spätere Detektion der DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator vermischt und in einen Gelelektrophoreseschlitten gegeben. Für die Ausbildung von Probestaschen geeigneter Größe wurden Teflonkämme (à 10 Zinken) eingesetzt und die Lösung zum Aushärten bei RT stehen gelassen. Das ausgehärtete Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer überführt und vollständig mit TAE-Puffer überschichtet. Die jeweiligen DNA-Proben wurden mit einem Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach Auftragen eines geeigneten DNA-Größenstandards wurde die Elektrophorese bei ca. 120–140 V bis zu einer ausreichenden Trennung durchgeführt. Als DNA-Größenstandards wurden λ-DNA/Eco130I (*Sty* I) (421–7 743 bp), pUC19DNA/ *Msp* I (*Hpa* II) (67–501 bp) und λ-DNA/Eco471 (308–8 126 bp) verwendet.

3.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion wurde mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit (PEQLAB GmbH, Erlangen) und nach einem den Empfehlungen des Herstellers angelehnten Protokoll durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30–50 µL des mitgelieferten Elutionspuffers. Extrahierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.8 Alkoholpräzipitation

Für die Beseitigung verbliebener Salze oder Proteine aus DNA-haltigen Lösungen wurde eine Alkoholpräzipitation vorgenommen. Die DNA-haltige Lösung wurde zunächst auf 100 μL Gesamtvolumen mit ddH_2O ergänzt und mit 10 μL einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) versetzt. Nach Zugabe von 300 μL Ethanol (96 % v/v) wurde das Lösungsgemisch zentrifugiert (20 800 g, 25 min, 4 °C). Die Lösung wurde vorsichtig entfernt und das verbliebene Pellet in 500 μL Ethanol (70 % v/v) durch Invertieren gewaschen. Zuletzt wurde zentrifugiert (20 800 g, 15 min, 4 °C) und das Pellet bei RT und geöffnetem Gefäß solange getrocknet, bis keine Alkoholrückstände mehr sichtbar waren. Die gereinigte DNA wurde in 20 μL ddH_2O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Alternativ kann auch eine Fällung mit Isopropanol durchgeführt werden, wobei nur ein Volumenäquivalent zu der DNA-haltigen Lösung pipettiert wird.

3.2.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Eine Möglichkeit, kohäsive (*sticky ends*) bzw. stumpfe Enden (*blunt ends*) an einem DNA-Fragment zu erzeugen oder beispielsweise einen entsprechenden Vektor für die Ligation zu linearisieren, bietet die Prozessierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme werden drei Typen entsprechend kategorisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Typ-II-Restriktionsendonukleasen verwendet, die innerhalb einer für jedes Enzym spezifischen palindromischen Erkennungssequenz schneiden. Die Restriktionsreaktionen wurden üblicherweise in Volumina von 30 μL durchgeführt und den Empfehlungen des Herstellers angelehnt. Sofern verfügbar wurden Restriktionsendonucleasen aus der Serie *FastDigest* der Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot genutzt.

Für die DNA-Spaltung wurden bis zu 1 μg Plasmid-DNA bzw. 0.2 μg des PCR-Produktes mit 2 μL 10 \times *FastDigest Buffer* oder *FastDigest Green Buffer* versetzt und mit ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 20 μL bzw. 30 μL ergänzt. Nach Zugabe von 1 μL der Restriktionsendonuklease wurde die Probe sorgfältig gemischt und bei 37 °C 15 min inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde anschließend durch die Zugabe von Agarosegel-Auftragspuffer (6 \times) inaktiviert. Alternativ wurde bei Verwendung des *FastDigest Green Buffer* die Probe direkt in der gelelektrophoretischen Analyse eingesetzt.

Zusammensetzung/Bedingungen		
x μ L	DNA (<i>Insert</i>)	} x und y so wählen, dass Verhältnis DNA/Vektor \sim 3–5:1 entspricht (w/w)
y μ L	Vektor-DNA	
1 μ L	T4-DNA-Ligase	
2 μ L	T4-DNA-Ligasepuffer	
ad 20 μ L	ddH ₂ O	
		\geq 3 h bei RT inkubieren (alternativ über Nacht bei 16 °C °C)

Tabelle 3.3: Zusammensetzung und Bedingungen für die Ligation von DNA-Fragmenten

3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten über deren kohäsive bzw. stumpfe Enden werden sogenannte Ligasen, Enzyme, die unter ATP-Umsatz und Knüpfung einer neuen Phosphodiesterbindung 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatgruppen verbinden, verwendet. Als Ligase wurde die T4-DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 eingesetzt. Das zu insertierende DNA-Fragment und der Vektor wurden in einem 20 μ L-Ligationsansatz in einem Verhältnis von 3:1 bis 5:1 eingesetzt. Die Abschätzung des Verhältnisses beider DNA-Fragmente erfolgte anhand eines Agarosegels oder durch photometrische Messung bei 280 nm. Tab. 3.3 zeigt die Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

3.2.11 Herstellung transformierbarer *E. coli*-Zellen

Chemisch transformierbare *E. coli*-Zellen Es wurden 200 mL SOB-Medium mit Zellen des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert und bei 220 rpm und 18 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gestellt und in vier 50 mL-PP-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 220 g, 10 min, 4 °C) wurden die Überstände verworfen, die Zellpellets in je 2 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und weitere 30 mL kalter TB-Puffer hinzugegeben. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (3 220 g, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden in je 8 mL einer kalten Lösung aus 560 μ L DMSO und 7.44 mL TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Abschließend wurde die Zellsuspension zu je 100 μ L aliquotiert und zur sofortigen Transformation auf Eis gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Physikalisch transformierbare *E. coli*-Zellen Es wurden 200 mL 2YT- bzw. LB-Medium mit Zellen des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert und bei 220 rpm und 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8–1.0 kultiviert. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis gestellt und in vier 50 mL-PP-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 000 g, 15 min, 1 °C) wurden die Überstände verworfen und die Zellsedimente in je 50 mL eiskaltem ddH₂O aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert (1 000 g, 15 min, 1 °C) und die Überstände ebenfalls verworfen. Die Zellpellets wurden in je 10 mL ddH₂O resuspendiert, zu einem Gesamtvolumen von 40 mL vereint und anschließend erneut zentrifugiert (1 000, g 15 min, 1 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 10 mL eiskalter, steriler Glycerollösung (10 % v/v) aufgenommen und zentrifugiert (1 000 g, 15 min, 1 °C). Abschließend wurden die Zellen in 3 mL eiskalter, steriler Glycerollösung (10 % v/v) resuspendiert und zu je 100 µL aliquotiert. Bei sofortiger Transformation war eine Lagerung auf Eis ausreichend. Für die Langzeitlagerung bei -80 °C wurden die Zellen zuvor schockgefroren.

3.2.12 Transformation chemisch vorbehandelter *E. coli*-Zellen

Hitzeschockmethode Die Hitzeschockmethode nach CHUNG [136] zur chemischen Transformation von *E. coli*-Zellen geht auf Untersuchungen zurück, in denen Bakterien mit dem Bakteriophagen λ transfiziert werden können, wenn sie mit eiskalter Calciumchloridlösung versetzt und anschließend kurz erhitzt werden [137]. Die *E. coli*-Zellen wurden, sofern bei -80 °C gelagert, auf Eis aufgetaut. 100 µL Zellen wurden mit 10 µL des Ligationsansatzes vereinigt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Einschleusen der DNA wurde durch Erwärmen des Ansatzes bei 42 °C für 90 s durchgeführt. Anschließend wurde der Transformationsansatz für etwa 2 min auf Eis gelagert und dann mit 900 µL 2YT-Medium versetzt. Das Zell/Medium-Gemisch wurde in ein Rundbodenröhrchen überführt und 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Abschließend wurde bei 4 °C und 750 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µL abgenommen. Die Zellen wurden resuspendiert, auf TYE-Mediumplatten mit den entsprechenden antibiotischen Zusätzen unter sterilen Bedingungen ausgestrichen und invertiert über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Elektroporation Eine Steigerung der Transformationseffizienz, insbesondere bei der Verwendung größerer Plasmide, kann mit der Methode der Elektroporation er-

reicht werden [138]. Physikalisch transformierbare *E. coli*-Zellen wurden, sofern bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, auf Eis aufgetaut. 100 μL Zellen wurden mit 10 μL des salzfreien Ligationsansatzes versetzt und kurz auf Eis inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand (VWR, Darmstadt) pipettiert. Die Küvette wurde in den Elektroporator (Easyject+, Equibio) eingesetzt und ein Spannungspuls von 2500 V für 5 ms ($201\ \Omega$) appliziert. Nach erfolgter Elektroporation wurden 250 μL 2YT-Medium in die Küvette pipettiert und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Die Zellsuspension wurde in ein Rundbodentröhrchen überführt und 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 220 rpm kultiviert. Abschließend wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen auf TYE-Mediumplatten mit den entsprechenden antibiotischen Zusätzen ausgestrichen und invertiert über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.

3.2.13 Wachstum und Lagerung von Bakterienkolonien

Übernachtkultur Für das Wachstum von Bakterienkolonien wurden 4 mL 2YT-Medium oder LB-Medium, das entsprechende Zusätze geeigneter Antibiotika enthielt, mit einem Bakterienklon der Transformationskultur inokuliert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 220 rpm kultiviert.

Langzeitlagerung Zur Langzeitlagerung von *E. coli*-Bakterien wurde 1 mL einer Übernachtskultur mit 300 μL Glycerol (87%) in einem Kryoröhrchen vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

Die proteinbiochemischen Standardtechniken wurden nach etablierten Verfahren durchgeführt [139].

3.3.1 Präzipitation avianer Immunglobuline aus dem Eigelb

Aviane Immunglobuline des Isotyps Y besitzen ihrer Sekretion in das Eigelb wegen den Vorteil, aus demselben mittels einfach durchführbarer Präzipitation durch Aus-salzungseffekte isoliert werden zu können. Die beiden am häufigsten verwendeten

Standardmethoden der Antikörper-Isolierung durch Zugabe von Ammoniumsulfat bzw. Polyethylenglycol sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Präzipitation von IgY durch Ammoniumsulfat

Für die Präzipitation von IgY wurde Eigelb mit ddH₂O in einem Verhältnis von 1:9 gemischt und über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Nach Zentrifugation (4 000 g, 4 °C, 30 min) und Filtration der wässrigen Phase wurde diese in einem Verhältnis von 6:4 mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt und stehend bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (4 000 g, 4 °C, 30 min) und das Sediment in 2 mL PBS gelöst. Abschließend wurde erneut zentrifugiert (4 000 g, 4 °C, 30 min) und die Lösung in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. IgY-haltige Lösungen wurden bei 4 °C bzw. über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert.

Präzipitation von IgY durch Polyethylenglycol (PEG)

Die Immunglobulinpräzipitation mit Hilfe der PEG-Methode nach POLSON [121] setzt sich aus zwei Hauptschritten zusammen: im ersten Schritt werden durch Zugabe von Polyethylenglycol Lipide und Vitellin des Eigelbs separiert. Anschließend können dann die avianen Antikörper durch erhöhte PEG-Konzentration gefällt werden. In dieser Arbeit wurden IgY nach der auf POLSON beruhenden und von PAULY *et al.* modifizierten und visualisierten Methode isoliert [125].

Zunächst wurde das Ei durch vorsichtiges Aufknacken der Schale geöffnet und das Eigelb ohne Beschädigung des Eigelbsacks vom Eiweiß befreit. Nachdem das Eigelb gründlichst mit PBS gewaschen worden war, wurde es über ein Filterpapier gerollt, um letzte unerwünschte Rückstände des Eiweißes zu entfernen. Der Sack wurde eingeschnitten und das Eigelb aufgefangen. Reste wurden durch Zusammenpressen des Sacks zwischen dem Filterpapier ebenfalls gesammelt. Das Eigelb wurde mit dem doppelten Volumen PBS versetzt, mit 3.5 % PEG 6000 (w/v, pulverisiert) durch Vortexen vermischt und 10 min auf einem Rotator bei RT inkubiert. Diese Prozedur soll die Suspension in zwei Phasen trennen, wobei die eine Phase unlösliche Eigelbbestandteile und Lipide enthält und die andere die wässrige Phase mit IgY und anderen löslichen Proteinen. Nach Überführung in geeignete Zentrifugationsröhrchen wurde 20 min bei 4 °C und 13 000 g zentrifugiert und der Überstand

über einen Papierfilter filtriert. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde die Lösung mit 8.5% PEG 6000 (w/v, pulverisiert) durch Vortexen vermischt und 10 min auf einem Rotator bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 13 000 g für 20 min wurde ein Pellet erhalten, das anschließend in 1 mL PBS mit Hilfe eines Glasstabes und vorsichtigen Vortexens gelöst wurde. Das Volumen wurde mit PBS auf insgesamt 10 mL ergänzt und die Lösung mit 12% PEG 6000 (w/v, pulverisiert) vermischt. Nach Inkubation auf dem Rotator für 10 min bei RT wurde 20 min bei 4 °C und 13 000 g zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde zunächst vorsichtig mit einem Glasstab und leichtem Vortexen in 800 µL PBS gelöst und sodann in eine Dialysierkassette (Slide-A-Lyzer) überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit 400 µL PBS ausgespült und die Lösung ebenfalls in die Dialysierkassette gegeben. Das gelöste Präzipitationsprodukt wurde über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Puffer durch frischen ersetzt und erneut für 3 h bei RT dialysiert. Die isolierten avianen Antikörper standen dann für weitere Analysen und Experimente zur Verfügung. Die Lagerung erfolgte je nach Anforderung bei 4 °C bzw. bei -20 °C.

3.3.2 Affinitätschromatographische Verfahren

Amylose-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von MBP-Fusionsproteinen erfolgte durch Verwendung von Amylosematrix. Die Matrix wurde in einen Säulenkörper überführt und mit 10 Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen und äquilibriert. Nach Auftragen der zu reinigenden Proteinprobe wurde mit 10-15 Säulenvolumen Säulenpuffer zur Entfernung unspezifisch an die Matrix gebundener Proteine gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte durch 10 mM Maltose in Säulenpuffer, wobei Fraktionen à 0.5–1 mL gesammelt wurden. Die Flussrate wurde durch den Gravitationsfluss bestimmt. Die Reinigung wurde durch gelelektrophoretische Analyse der Fraktionen untersucht. Proteinhaltige Fraktionen wurden ggf. gegen PBS (pH 7.5) dialysiert und vereinigt.

3.3.3 Ni-IMAC

Proteine, die durch Klonierung und rekombinante Expression einen His-Tag aus mindestens vier Histidinresten am N- bzw. C-Terminus besitzen, lassen sich durch die Affinität zu zweiwertigen Metallionen, vornehmlich Nickelionen, isolieren und reinigen [140]. Zu diesem Zweck wird eine Matrix aus Nitriloessigsäure (NTA) verwendet, auf der die Nickelionen immobilisiert vorliegen. Die Methode wird daher auch als Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie bezeichnet.

Zur Reinigung der in dieser Arbeit verwendeten und mit einem His-Tag fusionierten Proteine, wurde Ni-NTA-Agarose zunächst in PBS (pH 7.5, 500 mM NaCl) äquilibriert. Die proteinhaltigen Lösungen wurden auf einen pH von 8.0 eingestellt und durch Gravitationsfluss mit der Säulenmatrix inkubiert. Für die Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde mit 10-15 Säulenvolumen PBS (pH 7.5, 500 mM, optional bis zu 5 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte durch 100–300 mM Imidazol in PBS, wobei Fraktionen von 0.5–1 mL gesammelt wurden. Die Analyse der Reinigung erfolgte gelelektrophoretisch. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS (pH 7.5) dialysiert. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch.

Immunoaffinitätschromatographie

Zur Anreicherung Bet v 1a-spezifischer IgY mittels Affinitätschromatographie wurde zunächst die Matrix mit Protein kovalent gekoppelt. Als Matrix wurde Affi-Gel®15, ein auf Agarose basierendes und chemisch aktiviertes Material zur Immobilisierung saurer Proteine verwendet. Die Kopplung des rekombinant hergestellten Proteins Bet v 1a-MBP wurde in Anlehnung an die Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Hierzu wurden ca. 500 µL der Matrix in einer 8 mg/mL Lösung aus PBS und Bet v 1a-MBP über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einen Säulenkörper gegeben, die überschüssige Lösung als Durchlauf aufgefangen und die Matrix kurz mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit 1 M Ethanolamin zur Belegung freier Bindungsstellen wurde erneut mit PBS gewaschen und die erfolgreiche Kopplung durch Detektion mit spezifischen IgY kontrolliert.

Die Chromatographie wurde mit einer 100 µg/mL Bet v 1a-spezifische IgY enthaltenden Lösung (10 mL) durchgeführt. Die IgY wurden zweimal über die Matrix ge-

geben, wobei die Flussrate durch die Gravitation bestimmt wurde. Nach Waschen mit PBS wurde die Matrix mit 4.5 M Magnesiumchloridlösung bei RT inkubiert und anschließend eluiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Im ELISA erfolgte der Nachweis spezifischer IgY.

3.3.4 SDS-PAGE

Die Analyse von Proteinen in Hinblick auf ihr Molekulargewicht kann durch Einsatz der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese vorgenommen werden. Durch Behandlung der zu analysierenden Probe mit dem Detergens SDS erfahren die Proteine eine nahezu vollständige Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Zudem erhalten sie durch das anhaftende SDS eine negative Gesamtladung. Die gelelektrophoretische Mobilität der denaturierten Proteine erfolgt somit unabhängig von ihrer Ladung, so dass die Abschätzung ihrer Molekulargewichte im Vergleich zu einem Größenstandard für die Proteingelelektrophorese erlaubt wird.

Hier wurde die nach LAEMMLI optimierte Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE durchgeführt [141]. Durch diese Methode werden die Proteine in einem dem eigentlich Trenngel vorgelagerten Gel fokussiert, wodurch sehr scharfe Banden erhalten werden können. Das Gießen der Gele gelang durch Mischen der in den Tabellen 3.4 und 3.5 genannten Zusammensetzungen und Verwendung eines *Dual Gel Caster* oder *Multiple Gel Caster SE215* sowie Kämme zur Erzeugung der Probenaschen. Nach Polymerisation wurden die Kämme entfernt und die Gele mit Wasser gewaschen. Die Auswahl eines Tris-Glycin- bzw. Tris-Tricin-Gels erfolgte auf Grund der Größe der zu analysierenden Proteine und der gewünschten Auflösung. Für die Durchführung wurden die Proteinlösungen mit Probenpuffer (3×) versetzt und bei 95 °C 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen der Elektrophoresegele geladen. Die SDS-PAGE wurde üblicherweise bei elektrischen Spannungen zwischen 120–160 mV unter optionaler Wasserkühlung durchgeführt.

Coomassie-Färbung

Die unspezifische Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte durch Inkubation des Acrylamidgeles mit einer Lösung aus dem blauen Farbstoff Coomassie Brilliant Blau. Anschließend wurde bis zur entsprechenden Bandenintensität mit der Entfärberlösung entfärbt.

7.5 % Trenngel		3 % Sammelgel	
7.5 mL	Acrylamid (30 %)	1.5 mL	Acrylamid (30 %)
7.5 mL	Trenngelpuffer (4×)	3.75 mL	Sammelgelpuffer (4×)
15 mL	ddH ₂ O	9.6 mL	ddH ₂ O
200 µL	APS	150 µL	APS
20 µL	TEMED	15 µL	TEMED

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der verwendeten 7.5 % Tris-Glycin- und 3 % Tris-Glycin-Sammelgele für die SDS-PAGE. Ausreichend für je fünf Gele, bei Verwendung des *Multiple Gel Caster SE215*.

10 % Trenngel		4 % Sammelgel	
10 mL	Acrylamid (30 %)	2 mL	Acrylamid (30 %)
10 mL	Tris-Tricin-Gelpuffer (3×)	5 mL	Tris-Tricin-Gelpuffer (3×)
6.2 mL	ddH ₂ O	7.9 mL	ddH ₂ O
3.65 mL	Glycerin (87 %)	-	-
200 µL	APS	150 µL	APS
20 µL	TEMED	15 µL	TEMED

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der verwendeten 10 % Tris-Tricin- und 4 % Tris-Tricin-Sammelgele für die SDS-PAGE. Ausreichend für je fünf Gele, bei Verwendung des *Multiple Gel Caster SE215*.

3.3.5 Western Blot

Der Transfer gelelektrophoretisch analysierter Proteine auf Membranen zur Durchführung immunologischer Untersuchungen kann mittels *Western Blot* vorgenommen werden.

In den hier vorgestellten Arbeiten erfolgte der Transfer der durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf Nitrocellulosemembran, die eine hohe Kapazität zur Bindung von Proteinen aufweist. Der Transfer wurde im *Semi-Dry*-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden schichtartig Blotfilterpapier, Membran, Acrylamidgel der zu transferierenden Proteine und erneut Blotfilterpapier übereinandergelegt. In einer entsprechenden Blotapparatur erfolgte dann der Transfer bei konstantem Stromfluss zwischen 80–160 mA, je nach Größe der Membran, für 60-75 min. Die so erhaltene Membran wurde dann für einen Immunblot eingesetzt.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 ELISA-Analyse

Zur Überprüfung der Bindung von Antikörpern oder anderen Interaktionspartnern an ein bestimmtes Antigen bedient man sich der sogenannten ELISA-Analyse. Hierzu wurden die Vertiefungen einer ELISA-Mikrotiterplatte (384 Vertiefungen) mit je 30 μL einer Antigenlösung (übliche Konzentrationen zwischen 50–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wahlweise tagsüber bei RT oder über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platte wurde mit PBS-Lösung (pH 7.5) gewaschen ($2\times$ je 100 μL) und alle Vertiefungen mit serumhaltigem DMEM, BSA oder PVA 30 min blockiert (je 100 μL). Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen ($2\times$ je 100 μL) und die Vertiefungen mit je 30 μL der Antikörperlösung bei RT inkubiert. Inkubationszeiten wurden den Anforderungen entsprechend angepasst und lagen im Bereich von 1–3 h. Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen (je $4\times$ je 100 μL). Nachdem die Vertiefungen mit je 30 μL einer Sekundärantikörperlösung geeigneter Verdünnung in PBS-Lösung, die das Blockierungsreagenz enthielt, 1 h bei RT inkubiert worden war, wurde erneut mit PBS gewaschen (je $4\times$ je 100 μL). Die Detektion erfolgte schließlich durch Zugabe von je 30 μL pro Vertiefung einer pNPP-haltigen Lösung. Die Farbentwicklung wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 405 nm nach unterschiedlichen Zeitpunkten verfolgt.

3.4.2 Quantifizierende Sandwich-ELISA-Analyse

Die Quantifizierung von Antikörper-haltigen Kulturüberständen oder Lösungen nach Reinigung und Isolierung erfolgte mit ELISA-Analysen im Sandwichformat. Diese Form des Assays bindet durch zuvor immobilisierte und für den jeweiligen Isotyp spezifische Fängerantikörper die zu quantifizierenden Antikörper. In einem zweiten Schritt werden die zu untersuchenden Immunglobuline mit einem zweiten isotypspezifischen Antikörper detektiert. Durch Vergleich der Signalintensitäten mit einer parallel und in Analogie erstellten Kalibrierungskurve kann die Korrelation mit entsprechenden Konzentrationswerten erfolgen. In dieser Arbeit wurden zur Quantifizierung der Antikörper Quantifizierungssets von Bethyl Laboratories, Inc. (via Biomol GmbH, Hamburg) verwendet. Die in folgendem Durchführungsprotokoll verwendeten Puffer und Lösungen wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt bzw. hergestellt.

In einem ersten Schritt wurden 30 μL der isotypspezifischen Fängerantikörper in einer carbonatgepufferten Lösung in den Vertiefungen einer ELISA-Mikrotiterplatte für 1 h bei RT immobilisiert. Nach Waschen mit der Waschlösung ($4\times$ je 100 μL) wurden mit je 100 μL Blockierungslösung die freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatte belegt (1 h, RT). Das Blockierungsreagenz wurde entfernt und die Vertiefungen wurden mit Waschlösung gewaschen ($4\times$ je 100 μL). Sodann wurde für die Kalibrierungskurve eine Standardreihe mittels serieller Verdünnung des Kalibrators und analog unterschiedliche Verdünnungen der zu quantifizierenden Probe erstellt und jeweils 30 μL der Lösungen in die Vertiefungen pipettiert. Nach Inkubation für 1 h bei RT wurde erneut mit Waschlösung gewaschen ($4\times$ je 100 μL). Abschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μL einer geeigneten Verdünnung des Sekundärantikörpers für 1 h bei RT und darauffolgendes Waschen mit Waschlösung ($4\times$ je 100 μL). Zur Detektion wurden je 30 μL einer ABTS/ H_2O_2 -Lösung in die Vertiefungen pipettiert und der Verlauf der Signalintensitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch photometrische Messung der Detektion bei 405 nm verfolgt.

Die Quantifizierung wurde als Doppelbestimmung ausgeführt und die Messergebnisse mit Hilfe einer computergestützten nicht-linearen logistischen Regression (4 Parameter, s. Gleichung (3.1)) ausgewertet. Durch Relation der Signalintensitäten der zu quantifizierenden Probe auf die Kalibrierkurve konnten die Konzentrationen der unbekannt Probe bestimmt werden.

$$A_{280 \text{ nm}} = \frac{B - C}{1 + \left(\frac{c}{c_0}\right)^p} + C \quad (3.1)$$

B: untere Grenze, C: obere Grenze, c_0 : Wendepunkt, p : Ordnung

3.4.3 Immunblot

Mit Hilfe des Immunblots gelingt die immunologische Detektion der auf Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine durch Verwendung spezifischer Antikörper und Sekundärantikörper.

Die durch *Western Blot* erhaltene Membran mit immobilisierten und entsprechend ihrer gelelektrophoretischen Mobilität getrennten Proteine wurde zunächst zur Belegung freier Bindungsstellen mit 2 % BSA in PBS bzw. 2 % PVA in PBS bei RT

für 45 min blockiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Einsatz spezifischer Antikörper in geeigneter Verdünnung und Inkubation bei RT für 60 min. Ggf. erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Sekundärantikörper durch Inkubation bei RT für 60 min. Es wurden AP-konjugierte Antikörper eingesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde mit PBS-Lösung 3× gewaschen und die Waschlösungen verworfen. Die Detektion durch Farbentwicklung wurde durch Zugabe eines Gemisches aus 125 µL BCIP und 125 µL NBT (10×) in 12.5 mL AP-Detektionspuffer erreicht. Die Farbentwicklung erfolgte unter Lichtausschluss bis zu einer gewünschten Bandenintensität. Abschließend wurde der entwickelte Immunblot kurz mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.4.4 Expression in Mammalia-Zellen

Die Expression rekombinanter eukaryotischer Proteine wird vornehmlich in Säugerzellen durchgeführt, um eine Optimierung der posttranslationalen Modifikation und Prozessierung zu erreichen. Neben COS- oder CHO-Zellen finden auch humane Zelllinien wie HEK 293-Zellen – humane embryonale Nierenzellen – Anwendung bei der Mammalia-Zellexpression. Diese Zellen eignen sich sowohl für die transiente als auch für die stabile Expression. Überdies konnte die Konversion von Antikörper-Fragmenten in vollständige Immunglobuline beliebigen Isotyps und deren Expression in Säugerzellen gezeigt werden [142–145].

Vektorsystem

Zur rekombinanten Expression der chimären homodimeren Fc-Konstrukte wurde ein monocistronischer Expressionsvektor als System verwendet, um die Möglichkeit einer Selektion stabiler Transfektanden unter Zeocin-Resistenz zu bieten. Die stabile Expression in Säugerzellen wurde unter Nutzung des Vektorsystems pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Dieser enthält die Sequenzen für den CMV-Promoter, der die konstitutive Überexpression vieler Gene im Mammaliasystem erlaubt [146–148], sowie die aus dem bovinen Wachstumsfaktor (BGH) stammenden Polyadenylierungssignale.

Transfektion und transiente Expression von HEK 293-Zellen

Die Methode der Transfektion ermöglicht das Einschleusen fremder DNA und damit die Expression von Proteinen in Säugerzellen. Der entsprechende Expressionsvektor wurde hierzu mit dem Transfektionsreagenz PEI bzw. Nanofectin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) vorbehandelt, um anschließend in die Mammalia-Zellen eingebracht zu werden.

Das hoch verzweigte durch säurekatalysierte Aziridinpolymerisation synthetisierte Polyethylenimin (PEI) besitzt unter den organischen Molekülen das höchste Potential auf Grund seiner positiven Ladungsdichte. Jedes dritte Atom ist ein protonierbares Stickstoffatom einer Aminogruppe, woraus die sehr hohe Pufferkapazität bei fast jedem pH-Milieu resultiert. Durch die hohe positive Ladung des polymeren Netzwerkes besitzt PEI die Fähigkeit, z. B. DNA seiner negativen Ladung wegen in einer für das Einschleusen in Zellen optimalen Form zu komplexieren [149, 150].

Eine Optimierung hinsichtlich einer effizienten Transfektion ist die Entwicklung des Reagenzes Nanofectin, das auf Zweikomponentenbasis einerseits ein DNA-bindendes positiv geladenes Polymer und andererseits ein zur Einbettung des DNA-Polymerkomplexes dienendes Nanopartikel besitzt. Erst der Komplex aus DNA, Nanopartikel und Polymer garantiert eine optimale Form und Größe für die bevorzugte Aufnahme durch Zellen. Innerhalb der Zellen ist der DNA-Nanopartikelkomplex durch DNA-Abbau geschützt.

Für die Transfektion wurden 2–3 µg der DNA wurden in 100 µL einer 150 mM Natriumchloridlösung aufgenommen und mit einer Lösung aus 100 µL einer 150 mM Natriumchloridlösung und PEI (2 µl/µg DNA) versetzt. Das Durchmischen mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers für 10 Sekunden garantierte hierbei eine gleichmäßige Verteilung und Micellenbildung. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden die zu transfizierenden HEK 293-Zellen vorsichtig mit dem DNA-Gemisch vereinigt. Die Zellen wurden dafür zuvor auf einer Gewebekulturplatte ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 70 % bis 90 % kultiviert und mit neuem serumhaltigen DMEM versorgt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C für drei Tage. Abschließend wurden die Zellen trypsiniert und in eine Gewebekulturflasche überführt.

Die Transfektion unter Verwendung von Nanofectin wurde in Analogie und in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt.

Generierung kontinuierlich exprimierender Zelllinien

Die Generierung stabil exprimierender Zellen erlaubt eine Steigerung der Expressionseffizienz. Durch die Zugabe eines geeigneten Antibiotikums werden die in Kultur gehaltenen und transient exprimierenden Zellen einem Selektionsdruck ausgesetzt. Im hiesigen Fall wurde Zeocin als Antibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/mL eingesetzt, dessen entsprechendes Resistenzgen durch den verwendeten Vektor pcDNA3.1/Zeo(+) kodiert wird. Nach wenigen Wochen wurde die Präsenz der Zielproteine im Überstand verifiziert, um eine bloße Resistenz ohne die korrelierende Expression auszuschließen.

3.4.5 Kultur und Passage adhärenter Zellen

Die embryonale Nierenzelllinie HEK 293 wurde in dem Kulturmedium DMEM mit Glucose, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert, wobei das Wachstum unter einem Lichtmikroskop (Leitz GmbH & Co. KG, Oberkochen) kontrolliert wurde. Adhärente und vom Medium befreite Zellen wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Oberfläche der Gewebekulturflaschen gelöst. Der Vorgang beruht auf der Wirkung des eingesetzten Trypsins, welches die zur Bindung in der Kulturflasche nötigen Adhäsionsproteine spaltet. Das dem Enzym beigemengte EDTA schwächt zusätzlich die Bindung zur Oberfläche durch Komplexierung bivalenter Ionen wie Calcium und Magnesium. Da EDTA in hohen Konzentrationen zytotoxische Wirkung haben kann und da Trypsin die Zellwand schädigen kann, wurde nach Ablösen der Zellen vom Gefäßboden frisches Kulturmedium zur Resuspension zugegeben. Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen unterstützt. Nach Überführung in ein steriles PP-Röhrchen wurden die Zellen zentrifugiert (1 000 g, 5 min, 25 °C), der Überstand verworfen und das Sediment in frischem FKS-haltigem (10 % v/v) DMEM resuspendiert. Geringe Mengen (0.5–1.0 mL) wurden in eine neue mit frischem Kulturmedium gefüllte Gewebekulturflasche gegeben.

Sämtliche Arbeiten wurden an einer sterilen Laminarströmungsbank (Sicherheitswerkbank Typ BSB 6A, Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien) durchgeführt.

3.4.6 Kryokonservierung und Auftauen von Mammalia-Zellen

Stabilisierte Zellen wurden in eine 650 mL-Gewebekulturflasche überführt und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Durch Zugabe von 4 mL Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst und in 10 mL DMEM aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 700 g für 5 min bei 4 °C wurde das Zellsediment in 4 mL Einfriermedium resuspendiert. Aliquots von je 1 mL wurden dann in Kryoröhrchen sofort bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag bei -80 °C gelagert. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank.

In einem Kryoröhrchen eingefrorene Zellen können auf einem Wasserbad bei 37 °C wiederaufgetaut werden. Auf diese Weise aufgetaute Zellen wurden in 10 mL Medium (DMEM) aufgenommen, zentrifugiert (700 g, 5 min, 25 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde vor Überführung in eine 250 mL-Gewebekulturflasche in 12 mL Antibiotikum-haltigem DMEM resuspendiert.

3.4.7 Expression in prokaryotischen Systemen

Die prokaryotischen Expressionen der Allergene Bet v 1a-MBP, Gly m 4, Mal d 1-MBP, des Maltose-bindenden Proteins und der Bet v 1a-Varianten Bet v 1a*-MBP und Bet v 1a* E149G-MBP erfolgte in *E. coli*-Zellen.

Expression von MBP-Fusionsproteinen

Die Expression in dem Vektorsystem pMAL-c2X erlaubt die Produktion von Proteinen, die N-terminal mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) fusioniert sind. Die Verwendung MBP-fusionierter Proteine ermöglicht durch die Hohe Affinität zu Maltose analogen Strukturen die Reinigung und Isolierung selbiger mit Hilfe einer Amylosematrix. Die Abspaltung des Affinitätstags ist zudem über eine zwischen MBP und dem Zielprotein insertierte Faktor Xa-Schnittstelle möglich.

Als Organismus für die prokaryotische Expression wurden unterschiedliche *E. coli*-Zellen verwendet. Die Produktion des Allergens Bet v 1a-MBP und seiner Varianten Bet v 1a*-MBP und Bet v 1a*-E149G-MBP sowie von MBP wurde in dem Stamm XL1-Blue durchgeführt. Das Allergen Mal d 1 wurde in DH5 α -Zellen produziert.

Zu diesem Zweck wurde das gewünschte Kulturvolumen (200-500 mL) an 2YT-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/mL) und 0.2 % Glucose versetzt und mit der Vorkultur des entsprechenden Klones inokuliert, so dass die OD₆₀₀ 0.1 betrug. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0.6 und 0.8 inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0.3 mM) die Expression induziert und die Kultur für weitere 2 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kultur wurde dann zentrifugiert (3 300 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand verworfen. Die erhaltenen Zellsedimente wurden in PBS (pH 7.5) resuspendiert und bei -20 °C über Nacht eingefroren. Für die anschließende affinitätschromatographische Reinigung der Proteine wurden die Zellen wieder aufgetaut und auf dem Eisbad sonifiziert (15 min, Pulsstärke 3–4, Pulsdauer 40 %). Der Zell-extrakt wurde zentrifugiert (20 000 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand durch einen Filter (0.22 µm) steril filtriert. Die erhaltene Proteinlösung wurde ggf. verdünnt und für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

Expression unfusionierter Proteine

Die Expression unfusionierter Proteine gelingt in dem Vektorsystem pET-22b(+). Dieser besitzt N-terminal eine *pelB*-Signalsequenz und erlaubt die potentielle periplasmatische Lokalisation des entstehenden Proteins. Zur optimierten Unterdrückung der Basalexpression wird der Vektor durch die T7 RNA Polymerase transkribiert, die durch den eingesetzten *E. coli*-Stamm exprimiert wird.

Für die Produktion des rekombinanten Allergens Gly m 4 sollte auf eine periplasmatische Expression verzichtet und stattdessen die Signalsequenz durch die Sequenz für einen N-terminalen Histidin-Tag, dem V5-Epitop und einer TEV-Schnittstelle ersetzt werden. Die Sequenz wurde sequentiell aufgebaut. Das resultierende Vektorkonstrukt wurde in Anlehnung an das Original pETER-22b(+) genannt. Anschließend wurde die Sequenz von Gly m 4 in diesen Vektor subkloniert und für die Expression verwendet. Als *E. coli*-Zellen wurden ER2566 eingesetzt.

Zur Produktion des Allergens wurde das gewünschte Kulturvolumen (200-500 mL) an 2YT-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/mL) versetzt und mit der Vorkultur des entsprechenden Klones inokuliert, so dass die OD₆₀₀ 0.1 betrug. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0.8 und 1.0 inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) die Expression induziert und die Kultur für weitere 3 h bei 37 °C und 220 rpm in-

kubiert. Die Kultur wurde dann zentrifugiert (3 300 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand verworfen. Die erhaltenen Zellsedimente wurden in PBS (pH 7.5) resuspendiert und bei -20 °C über Nacht eingefroren. Für die anschließende affinitätschromatographische Reinigung des Proteins wurden die Zellen wieder aufgetaut und auf dem Eisbad sonifiziert (15 min, Pulsstärke 3–4, Pulsdauer 40 %). Der Zellextrakt wurde zentrifugiert (20 000 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand durch einen Filter (0.22 µm) steril filtriert. Die erhaltene Proteinlösung wurde ggf. verdünnt und für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 SPR-Spektroskopie

Prinzip der Methode

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) ist eine im Bereich der Biosensorik etablierte und weit verbreitete Methode, um Interaktionen von Biomolekülen in Echtzeit zu untersuchen. Darüber hinaus kann auf eine vorausgehende Markierung der zu untersuchenden Interaktionspartner verzichtet werden. In der Durchführung eines SPR-Experimentes wird der mit einer sehr dünnen Goldoberfläche ausgestattete Sensorchip mit dem als Ligand bezeichneten Biomolekül kovalent gekoppelt. Innerhalb einer mit dem Sensorchip in direktem Kontakt stehenden Flusszelle wird nun ein (potentieller) Interaktionspartner (Analyt) über die Goldoberfläche geleitet. Durch Wechselwirkung des Analyten mit dem Liganden kann es zu einer Bindung und damit zu einer direkten Massenzunahme auf der Metalloberfläche kommen. Das Prinzip der SPR-Spektroskopie besteht nun darin, diese Massenänderung durch Ausnutzung des optischen Phänomens der Oberflächenplasmonenresonanz messbar zu machen. Als Messwert erhält man den SPR-Winkel, unter dem Oberflächenplasmonen angeregt werden können. Die zeitliche Änderung des SPR-Winkels ist abhängig von der Massenänderung auf der Oberfläche des Metalls und lässt somit Rückschlüsse auf das Interaktionsverhalten zwischen Ligand und Analyt zu. In der Praxis wird zweckmäßig die Einheit RU (*response unit*) gegen die Zeit in einem Sensorgramm aufgetragen; definitionsgemäß entspricht die Änderung des SPR-Winkels bei einer Änderung der Masse von einem Pikogramm bezogen auf einen Quadratmillimeter der Chipoberfläche 1 RU.

Mit Hilfe der erhaltenen Sensorgramme lassen sich dann beispielsweise kinetische Daten als Charakteristik der Ligand-Analyt-Interaktion berechnen. Durch Zugrundelegen eines adäquaten Bindungsmodells (1:1-Bindung (Langmuir), bivalent etc.) und mathematische Anpassung von Regressionsfunktionen an den Verlauf der Bindungskurven können die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_a) und der Dissoziation (k_d) berechnet werden. Aus dem Verhältnis beider Konstanten ergibt sich direkt die Dissoziationskonstante.

Sämtliche Messungen erfolgten auf dem SPR-2 System der SierraSensors GmbH, Hamburg unter Verwendung des Sensorchips SPR-2 *Affinity Sensor Amine*.

Vorbereitung des Sensorchips

Die Vorbereitung des Sensorchips für die Messungen erforderte die kovalente Immobilisierung des Liganden an die Dextranoberfläche. Hierzu wurde das System zunächst mit dem Laufpuffer (PBS pH 7.5, 0.01 % Tween, entgast) äquilibriert und der Chip eingesetzt. Nach erneuter Äquilibrierung wurde die Chipoberfläche bei einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch Injektion von 200 μL einer Mischung aus gelöstem EDC und NHS aktiviert (8 min). Die rekombinant produzierten Proteine Bet v 1a-MBP und MBP wurden auf 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 4.5) verdünnt und je 125 μL bei einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ über den entsprechenden Kanal der Flusszelle geleitet. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die immobilisierte Proteinmenge je ca. 400 RU entsprach. Abschließend wurden 200 μL Ethanolamin (pH 8.5, 1 M) bei einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ zum Blockieren freier Bindungsstellen injiziert. Der Sensorchip konnte nun für die folgenden Messungen verwendet werden.

Durchführung der SPR-Messungen

Vor den eigentlichen Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Antikörper-Antigen-Interaktion wurden die einzusetzenden Konzentrationsbereiche und die Bedingungen für die effiziente Regeneration des Chips analysiert. Zudem erfolgte eine Kontrolle durch bloße Injektion von Pufferlösung. Die zu untersuchenden Antikörper wurden in einer seriellen Konzentrationsreihe in dem Laufpuffer verdünnt. Für die Aufnahme des Sensorgramms erfolgte dann eine Injektion von 75 μL (Assoziationsdauer: 3 min). Die Dissoziation wurde durch Spülen

des Systems mit dem Laufpuffer für 6 min erreicht. Regenerierungsschritte wurden durch Injektion von 25–50 μL 4.5 M Magnesiumchlorid vorgenommen. Alle Schritte der Messung wurden bei einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Software *TraceDrawer*. Für die Regressionsanalysen wurden die RU_{max} -Werte global ermittelt. Die SPR-spektroskopische Analyse und Auswertung der Sensorgramme für das chimäre CHIR-AB1-huIgEC_H2-4-Konstrukt wurden bei SierraSensors GmbH in Hamburg durchgeführt und durch Herrn Dr. Klaus Wiehler unterstützt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst spezifische aviane Antikörper des Immunglobulintyps Y generiert und hinsichtlich ihres Potentials als Substitut für standardmäßig in diagnostischen Assaysystemen verwendete humane Seren untersucht werden. Auf Grundlage der IgY-Technologie sollten dann verschiedene Ansätze zur Etablierung neuer artifizierender Standardseren im Bereich der allergologisch- und infektiologisch-diagnostischen Analyse konzipiert und evaluiert werden.

4.1 Generierung spezifischer, polyklonaler Antikörper

Im Kontext der sowohl allergologischen als auch autoimmunologischen Labordiagnostik sollten aviane Antikörper des Isotyps Y mit Spezifität für unterschiedliche Zielantigene generiert und analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde als klassischer Vertreter einer Pollen-assoziierten Allergie die Hypersensitivität gegenüber Birkenpollen als Modell verwendet, wobei der Fokus hier auf das Birkenpollenmajorallergen Bet v 1a gelegt wurde. Des Weiteren wurden im Bereich der autoimmunologischen Diagnostik spezifische, gegen einen Komplex aus Plättchenfaktor 4 und Dextransulfat gerichtete IgY im Zusammenhang mit der heparininduzierten Thrombozytopenie Typ II (HIT II) untersucht.

4.1.1 Immunisierung von Hühnern

Die Immunisierungen von Hühnern mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1a wurden extern bei den Anbietern Eurogentec Deutschland GmbH, Köln und BioGenes GmbH, Berlin durchgeführt. Die PF4/DS-10-spezifischen IgY wurden freundlicherweise von der Milenia Biotec GmbH, Gießen zur Verfügung gestellt. Die Immunisierungen erfolgten standardisiert und nach Stand der Technik.

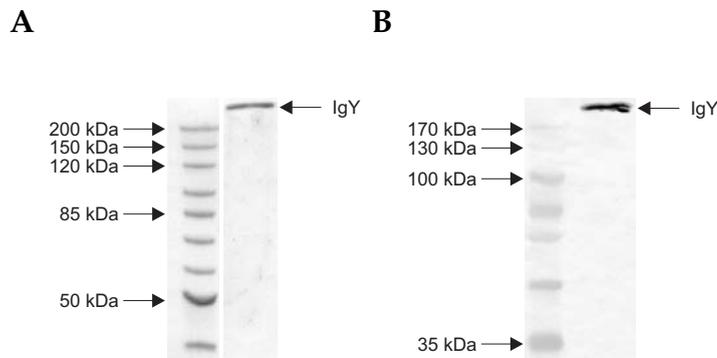


Abbildung 4.1: Analytische SDS-PAGE aus dem Eigelb isolierter avianer Antikörper und nachfolgender (A) Coomassie-Färbung bzw. Detektion im (B) Immunblot. Die immunologische Detektion erfolgte mit dem polyklonalen, AP-konjugierten anti-IgY. Als Standard wurden die Proteinmarker (A) *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* und (B) *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet.

4.1.2 Isolierung und Reinigung der polyklonalen avianen Antikörper

Die Isolierung der polyklonalen, avianen Antikörper erfolgte aus dem Eigelb der während der Immunisierung gesammelten Eier. Das Eigelb wurde hierzu mit dem Eigelbsack von dem umgebenden Eiweiß getrennt und vorsichtig, jedoch gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper durch Proteinpräzipitation aus ammoniumsulfathaltiger Lösung isoliert (s. 3.3.1). Die isolierten IgY wurden in entsprechenden Pufferlösungen gelöst und für weitere Analysen eingesetzt. Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die SDS-PAGE-Analyse nach Coomassie-Färbung bzw. Detektion der IgY im Immunblot ist in Abbildung 4.1 dargestellt und zeigte ein apparentes Laufverhalten bei ca. 200 kDa.

4.2 Produktion rekombinanter Allergene

Zur Untersuchung der Bet v 1a-spezifischen Antikörper sollten neben Bet v 1a auch zwei weitere Mitglieder der PR-10-Proteine rekombinant produziert werden. Darüber hinaus wurden auch zwei verkürzte Bet v 1a-Varianten exprimiert. Für die Untersuchung der PF4/DS-10-spezifischen Antikörper wurde ein Komplex aus rekombinantem Plättchenfaktor 4 und einem niedermolekularen (10 kDa) Dextransulfat von Milenia Biotec GmbH (Gießen) zur Verfügung gestellt.

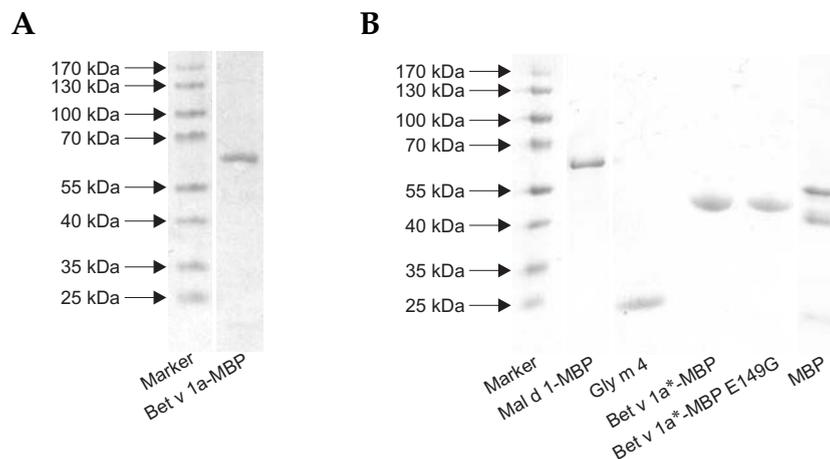


Abbildung 4.2: Analytische SDS-PAGE der Allergene Bet v 1a, Gly m 4 und Mal d 1 mit nachfolgender Coomassie-Färbung nach erfolgreicher prokaryotischer Expression und Reinigung. Die in *E. coli* produzierten und mittels Amylose und Ni-IMAC isolierten Proteine wurden in reduzierendem Probenpuffer in einem 10%igen Acrylamid-Gel in Tris-Tricin-haltigem Puffer gelelektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung; * = auf der Primärsequenz von Bet v 1a basierende und um die ersten 124 Aminosäuren verkürzte Variante.

4.2.1 Rekombinante Produktion und Reinigung von Bet v 1a-MBP

Das Birkenpollenmajorallergen sollte für die Analytik und Charakterisierung der generierten Bet v 1a-spezifischen avianen Antikörper zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus sollte es für die Generierung einer Allergen-belegten Affinitätsmatrix Verwendung finden. Zu diesem Zweck wurde Bet v 1a als Fusionskonstrukt mit dem Maltose bindenden Protein (MBP, *maltose binding protein*) in dem pMAL-c2X-Expressionssystem exprimiert. Die Fusion mit dem MBP-Fragment ergab sich aus dem Löslichkeit vermittelnden Effekt dieses Proteins, da die Expression von Bet v 1a per se zu unlöslichem Produkt führt, welches nur durch denaturierende Verfahren gereinigt und isoliert werden kann. Die Reinigung des Fusionsproduktes Bet v 1a-MBP erfolgte über eine Amylosematrix, die die Affinität des Maltose bindenden Proteins zu Amylose ausnutzt. Die Elution des Proteins von der Matrix gelang mit einer maltosehaltigen Pufferlösung. Abschließende Dialyse gegen einen geeigneten Puffer schloss die Reinigung ab. Abbildung 4.2 (A) zeigt die gereinigten und vereinigten Elutionsfraktionen von Bet v 1a-MBP, welches nun für die unterschiedlichen Anwendungen zur Verfügung stand.

4.2.2 Rekombinante Produktion und Reinigung des Maltose bindenden Proteins (MBP)

Fusionskonstrukte zwischen dem gewünschten Zielprotein und dem Maltose bindenden Protein besitzen zwar den Vorteil, lösliche Fusionsproteine zu liefern und darüber hinaus die Isolierung dieser über eine Amylosematrix zu erlauben, bergen jedoch eine zusätzliche Interaktionseinheit mit nicht zu unterschätzender Immunogenität im Kontext immunologischer Methoden wie die Immunisierung oviparer Tiere oder inhärenter Kreuzreaktivität im Sinne der Allergie. In logischer Konsequenz ergibt sich hieraus die Anforderung eines Kontrollproteins, nämlich dem MBP selbst, um mögliche Reaktivitäten auf MBP-Fusionskonstrukte eindeutig auf Epitope des Zielproteins zurückführen zu können. In dieser Arbeit wurde daher die Produktion des MBP durch Verwendung des im Original belassenen Vektors pMAL-c2X erzielt und die Reinigung analog zu der bereits in Abschnitt 4.2.1 analogen Vorgehensweise über Amylose durchgeführt. Die tatsächliche Sequenz, die neben dem MBP aus methodischen Gründen auch noch die Faktor Xa-Schichtstelle sowie C-terminal ein Fragment des lacZ-Proteins enthält, ist dem Anhang zu entnehmen. Im weiteren Verlauf der Ergebnisdarstellung wird dieser Sachverhalt nicht gesondert gekennzeichnet und die Bezeichnung MBP verwendet. Die Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE-analytischer Gelelektrophorese ist in Abbildung 4.2 (B) gezeigt.

4.2.3 Rekombinante Produktion und Reinigung verkürzter Bet v 1a-Sequenzen

Als verkürzte Version des Birkenpollenallergens Bet v 1a wurde eine bereits im Arbeitskreis vorhandene Variante, die nachfolgend mit Bet v 1a* bezeichnet wird, eingesetzt. Die Primärsequenz unterscheidet sich bei dieser Variante in der Weise, dass die ersten 123 Aminosäuren deletiert wurden. Die Erkennung der verkürzten Version durch einen monoklonalen und auf dem humanen Immunrepertoire eines Allergikers basierenden Antikörpers konnte im hiesigen Arbeitskreis zuvor gezeigt werden [151]. Mit Hilfe dieser Variante sollte die Reaktivität der hier Verwendung findenden Bet v 1a-spezifischen IgY hinsichtlich der Erkennung humaner und damit relevanter Epitope untersucht werden.

Zur rekombinanten Produktion wurde die im Vektorsystem pMAL-c2X vorliegende Sequenz von Bet v 1a im *E. coli*-System zur Expression gebracht. Das aus der prokaryotischen Kultur resultierende MBP-Fusionsprodukt wurde mittels einer Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt und die Allergen enthaltenden Fraktionen vereinigt. Darüber hinaus wurde in gleicher Weise die ebenfalls aus den Arbeiten von HECKER *et al.* vorhandene Mutante Bet v 1a MBP*E149G prokaryotisch produziert und via Ni-IMAC gereinigt. Die Analyse mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung ist in Abbildung 4.2 (s. S. 83) gezeigt. Beide Varianten wurden für weitere Experimente zur Charakterisierung der IgY herangezogen (s. u.).

Für die Charakterisierung der generierten Bet v 1a-spezifischen IgY in Hinblick auf die Kreuzreaktivität mit anderen Vertretern der PR-10-Familie bzw. Bet v 1-Familie sollten weitere Allergene kloniert und rekombinant hergestellt werden. Hierzu wurden aus dem allergologischen Kontext die Nahrungsmittelallergie auf Äpfel (*Malus domestica*) mit dem Majorallergen Mal d 1 und auf Sojabohnen (*Glycine max*) mit dem Majorallergen Gly m 4 gewählt.

4.2.4 Rekombinante Produktion und Reinigung von Gly m 4

Der Ansatz für die Klonierung und Expression des Majorallergens und Bet v 1-Familien-Mitglieds Gly m 4 sah zunächst die Aufzucht von Sojapflanzen und die Isolierung der Gesamt-RNA bzw. der genomischen DNA vor. Zur Anzucht der Pflanzen wurden Sojabohnen (*Glycine max* cv Aveline) ausgesät und sieben Tage kultiviert. Danach wurden alle Pflanzenteile (inklusive Kotyledonen) mit Ausnahme ihrer Wurzeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser pulvrig fein zerrieben. Mit Hilfe der optimierten Guanidinisothiocyanat-/Phenol-Methode durch Einsatz von peqGOLD TriFast™ wurde zuerst die RNA von DNA und Proteinen getrennt und sodann durch Präzipitation mit Isopropanol (vgl. 3.2.8) isoliert. Nach Lösen in ddH₂O und Zusatz des RNase-Inhibitors RiboLock™ wurde die RNA für nachfolgende Reaktionen eingesetzt. Die Isolierung der DNA erfolgte aus der anfallenden organischen Phase mittels Ethanolpräzipitation. Die gefällte DNA wurde in schwach NaOH-haltiger wässriger Lösung gelöst und dann neutralisiert. Da in unterschiedlichen Ansätzen eine erfolgreiche cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation der Gly m 4-Sequenz nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wird nachstehend nur die Klonierung auf Basis der genomischen DNA erläutert.

Zunächst wurde die genomische DNA der Sojapflanze mit Hilfe des *peqGOLD Plant DNA Mini Kit* isoliert. In einer PCR wurde die Sequenz von Gly m 4 unter Einführung der Restriktionsschnittstellen *Nco* I und *Xho* I mit entsprechenden Oligonukleotiden (Nr. 05 und 06, s. Anhang) amplifiziert und gelelektrophoretisch gereinigt. Die Sequenzierung zeigte, dass innerhalb der gewünschten DNA-Sequenz ein Intron vorhanden war. Dieses wurde durch zwei vorangestellte PCRs, die unter Einsatz geeigneter Oligonukleotide (Nr. 03–06, s. Anhang) überlappende Sequenzbereiche an den 5'- bzw. 3'-terminalen Enden erzeugten, und einer darauffolgenden Hybridisierungs-PCR zur Kombination der beiden Exonfragmente entfernt. Subklonierung in den Vektor PCR4Blunt-TOPO und Sequenzierung *colony*PCR-positiv getesteter Klone ergab die korrekte Exonsequenz für die Expression von Gly m 4. Erneute Subklonierung in den modifizierten Expressionsvektor pET-22b(+) und Transformation T7 RNA Polymerase positiver *E. coli*¹ erlaubte dann die Produktion des Allergens Gly m 4. Der Vektor pET-22b(+) wurde zuvor derart umkloniert, dass anstelle der *pelB*-Signalsequenz die Sequenz für einen His-Tag, das V5-Epitop und die TEV-Schnittstelle inseriert wurde. Der Aufbau der Sequenz erfolgte sukzessive durch Amplifizierung mit den Oligonukleotiden Nr. 09–12 und anschließende Ligation mit dem Vektor. Nach Expression erfolgte die Isolierung des Proteins aus dem cytoplasmatischen Extrakt der *E. coli*-Kultur mittels Ni-IMAC. Abbildung 4.2 (B, s. S. 83) zeigt die Coomassie-Färbung nach analytischer SDS-PAGE.

4.2.5 Rekombinante Produktion und Reinigung von Mal d 1-MBP

Die Produktion des Majorallergens des Apfels Mal d 1 sollte als MBP-Fusionskonstrukt erfolgen. Hierzu wurde ausgehend von der bereits im Arbeitskreis vorliegenden Mal d 1-Sequenz diese mit den Oligonukleotiden Nr. 07 und 08 (s. Anhang) unter Einführung der Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Sal* I amplifiziert. Die Subklonierung erfolgte in den Vektor pMAL-c2X, wodurch die Produktion eines N-terminal mit MBP fusionierten Proteins ermöglicht werden sollte. Die Überprüfung der Insertion der korrekten Sequenz erfolgte mittels PCR und Sequenzierung. Das Vektorkonstrukt wurde schließlich für die rekombinante prokaryotische Produktion des Allergens Mal d 1 in *E. coli* eingesetzt. Das MBP-Fusionskonstrukt wurde über eine Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt und für weitere Analysen eingesetzt (s. Abb. 4.2 B, S. 83).

¹ER2566 von NEB

4.3 Charakterisierung der durch Immunisierung generierten IgY

Die nach der Immunisierung mit Bet v 1a in Hühnern generierten und durch einfache Präzipitation isolierten IgY sollten nun in ersten ELISA-Analysen bezüglich ihres Reaktivitätsspektrums untersucht werden. Mit den zuvor durchgeführten prokaryotischen Expressionen des Birkenpollenallergens Bet v 1a und seinen Homologen Gly m 4 und Mal d 1 standen die Interaktionspartner für diese Analysen zur Verfügung. Obwohl erst nach beendeter Immunisierungsprozedur und Sammlung der Eier seitens des einen Dienstleisters eingeräumt wurde, dass das zur Immunisierung eingesetzte Huhn nicht dem Mindestalter der für diese Zwecke vorgesehenen Tiere entsprach und daher womöglich eine mangelhafte oder nicht nachzuweisende Bildung spezifischer IgY einherginge, wurden die IgY dennoch isoliert und analysiert. Der besseren Unterscheidung halber werden die aus der nicht dem Standardprotokoll konformen Immunisierung hervorgegangenen avianen Antikörper mit einem Doppelkreuz (‡) gekennzeichnet.

4.3.1 Vergleich der Reaktivitäten prä- und postimmuner IgY

Die Abbildung 4.3 zeigt die untersuchten Reaktivitäten der generierten IgY gegen Bet v 1a im Vergleich mit isolierten IgY aus Präimmun-Eiern. Mit einer deutlichen Signifikanz zeigt sich die starke Reaktivität der avianen Immunglobuline gegenüber immobilisiertem Allergen nach erfolgter Immunisierung. Präimmun-IgY hingegen zeigen keine Reaktivität gegen Bet v 1a. Zur Kontrolle wurde auch die Reaktivität auf dem Maltose-bindenden Protein getestet. Erwartungsgemäß konnte hier sowohl für Präimmun- als auch Postimmun-IgY keine Reaktivität festgestellt werden. Diesen ELISA-Daten zufolge konnte die Immunisierung von Hühnern mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1a als erfolgreich und in spezifischen, reaktiven IgY resultierend erachtet werden. Ein analoger Vergleich der anderen Bet v 1a-spezifischen IgY[‡] konnte nicht erfolgen, da nur die gesammelten und nicht unterschiedlichen Zeiträumen zugeordneten postimmunen Eier zur Verfügung standen. Ebenfalls in Abbildung 4.3 zu sehen, ist die Reaktivität der IgY[‡] gegenüber Bet v 1a mit entsprechender Reaktivitätskontrolle auf MBP. Naive IgY, die aus handelsüblichen Eiern gereinigt wurden, dienten als weitere Nullkontrolle gegenüber den eingesetzten Proteinen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Immuni-

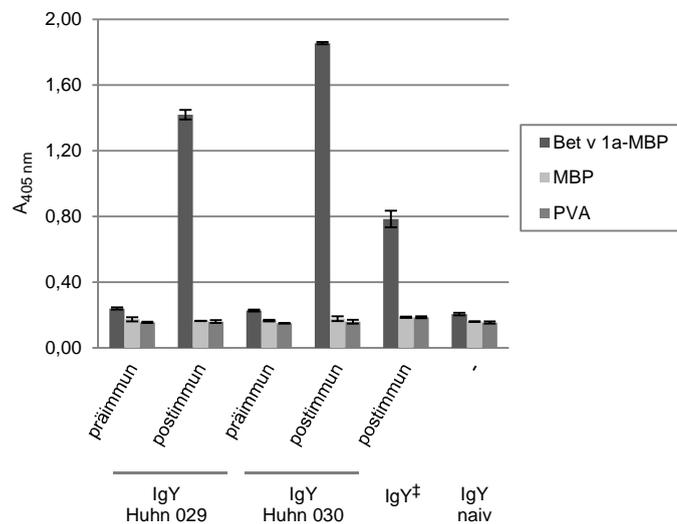


Abbildung 4.3: ELISA-Analyse zur Bestimmung der Reaktivität der mittels Immunisierung generierten IgY gegen Bet v 1a. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μL Bet v 1a-MBP bzw. MBP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) belegt und mit 1% PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μL der gegen Bet v 1a generierten IgY im Vergleich zu IgY aus Präimmun-Eiern. Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2.000 in 1% PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1% PVA in PBS verwendet.

sierungen der Hühner 029 und 030 erfolgreich durchgeführt werden konnten und eine Reaktivität der generierten IgY einzig auf das Allergen per se und nicht auf das als Fusionspartner eingesetzte MBP verzeichnet wurde. Wenn auch mit weitaus geringerer Effizienz, ließ sich auch im Falle der IgY[‡] eine positive Immunisierung beobachten.

In einer weiteren ELISA-Analyse wurden die erhaltenen IgY nun den einzelnen Zeiträumen der Eiersammlung entsprechend auf ihre Reaktivitäten gegen Bet v 1a hin untersucht (nicht IgY[‡] wie bereits o. a.). Dies sollte einen genaueren Einblick in den Verlauf der Immunisierung und den damit korrelierenden Titern spezifischer Antikörper geben. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigt Abbildung 4.4. Die mit einem Asterisken gekennzeichneten postimmunen IgY wurden aus Eiern isoliert, deren Sammlung die erste nach einem (erneuten) Immunisierungsschritt (*Boost*) war. Zwischen zwei *Boost*-Intervallen konnte eine Abnahme der Bet v 1a-spezifischen IgY mit der Zeit beobachtet werden. Nach erneutem *Boost* konnten die Titer spezifischer Antikörper wieder angehoben werden, wobei der Effekt bei Huhn 029 stärker ausgeprägt war. Alle im weiteren Verlauf durchgeführten Experimente wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit postimmunen IgY der ersten Phase (postimmun1*) aus Eiern von Huhn 029 durchgeführt.

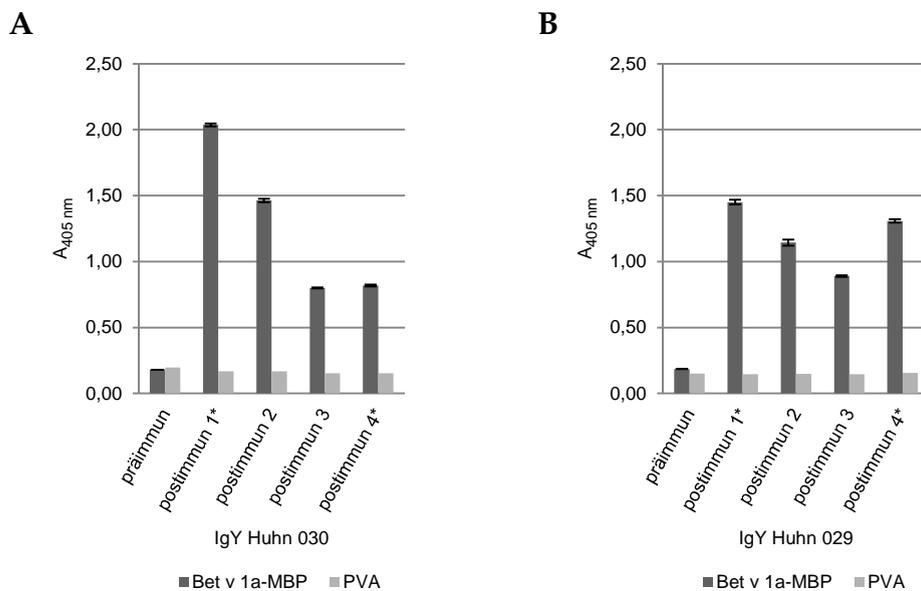


Abbildung 4.4: ELISA-Analyse zur Bestimmung der Reaktivität der mittels Immunisierung generierten IgY gegen Bet v 1a zu unterschiedlichen Zeiträumen der Immunisierung. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L Bet v 1a-MBP (100 μ g/mL) belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μ L der gegen Bet v 1a generierten IgY (A Huhn 030, B Huhn 029), die aus Eiern unterschiedlicher Zeiträume der Immunisierung isoliert wurden (der Asterisk markiert IgY, die auf einen *Boost* folgten). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte anti-IgY eingesetzt (1:2000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

4.3.2 Spezifitätsanalyse der polyklonalen IgY

Die zuvor im prokaryotischen System exprimierten und mittels Ni-IMAC gereinigten Allergene sollten nun zur Reaktivitätsanalyse mit den spezifischen IgY herangezogen werden, um Aussagen über deren Spezifität machen zu können. Die Allergene wurden hierzu für die Immobilisierung in einem ELISA eingesetzt und anschließend mit den Bet v 1a-spezifischen IgY inkubiert. Nach Detektion der an das immobilisierte Allergen gebundenen IgY mit einem Fc γ -spezifischen Sekundärantikörper wurden die in Abbildung 4.5 gezeigten ELISA-Daten erhalten. Neben der Erkennung des zur Immunisierung eingesetzten Bet v 1a wurden in vergleichbarem Maße auch die Bet v 1-homologen Allergene Mal d 1 und Gly m 4 erkannt. Dies verwundert nicht, da die Homologie dieser PR10-verwandten Proteine mit dem Birkenpollenallergen bis zu 56 % beträgt und angenommen werden muss, dass unter den polyklonalen IgY einige Epitope oder zumindest Teilbereiche der Epitope erkennen, die auf allen Homologen gleichermaßen präsent sind. Darüber hinaus binden die polyklonalen spezifischen IgY auch die verkürzten Varianten Bet v 1a*-MBP und Bet v 1a*-MBP E149G. Die im Festphasenassay festgestellten Reaktivitäten konnten auch im Immunblot beobachtet werden (s. Abb. 4.6). Damit konnte gezeigt werden, dass die durch Immunisierung erhaltenen avianen

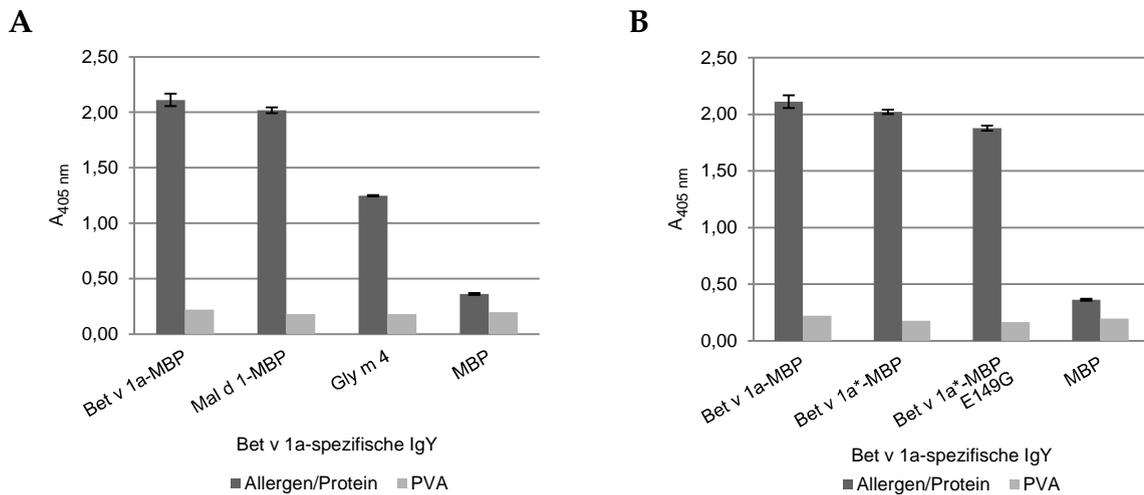


Abbildung 4.5: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität Bet v 1a-spezifischer IgY gegenüber den Bet v 1a-Homologen Mal d 1 und Gly m 4. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L der rekombinant produzierten Allergene Bet v 1a-MBP, Mal d 1-MBP und Gly m 4 (A) sowie den verkürzten Varianten Bet v 1a*-MBP und Bet v 1a*-MBP E149G (B) und dem der Kontrolle dienenden MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Bet v 1a-spezifischen IgY der Immunisierung. Als Sekundärantikörper wurde der polyklonale AP-konjugierte anti-IgY (1:2000 in 1 % PVA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

Antikörper auch klinisch relevante, weil humane Epitope erkennen.

4.3.3 Einfluss des Blockierungsreagenzes auf die Reaktivität spezifischer polyklonaler Antikörper

Als Blockierungsreagenz wurde in den gezeigten ELISA-Analysen das synthetische Polymer Polyvinylalkohol als Alternative zu den konventionellen Reagenzien BSA und Casein verwendet. Die Auswahl von PVA begründete sich darin, dass bereits in anderen Arbeiten [152, 153], die sich mit Assayexperimenten unter Verwendung allergener Proteine beschäftigten, diesem Polymer der Vorzug gegeben wurde, um mögliche Interferenzen und Hintergrundreaktivitäten auf das Blockierungsreagenz zu minimieren oder auszuschließen. Dem Vergleich von PVA und BSA wurde in dem in Abbildung 4.7 gezeigten ELISA-Experiment Rechnung getragen. Wie erwartet, konnte festgestellt werden, dass unabhängig von der Belegung freier Bindungsstellen mit PVA (Abb. 4.7 A) bzw. BSA (Abb. 4.7 B) vergleichbare Reaktivitäten der Bet v 1a-spezifischen IgY gegenüber ihrem Allergen resultierten. Wurde das Experiment allerdings in Analogie mit den alternativen Bet v 1a-spezifischen IgY[†] durchgeführt, so konnte überraschenderweise ein anderer Reaktivitätsverlauf beobachtet werden (siehe Abbildung 4.8). In diesem Falle konnte bereits bei hohen Konzentrationen ein deutlicher Unterschied der Reaktivitäten gemessen wer-

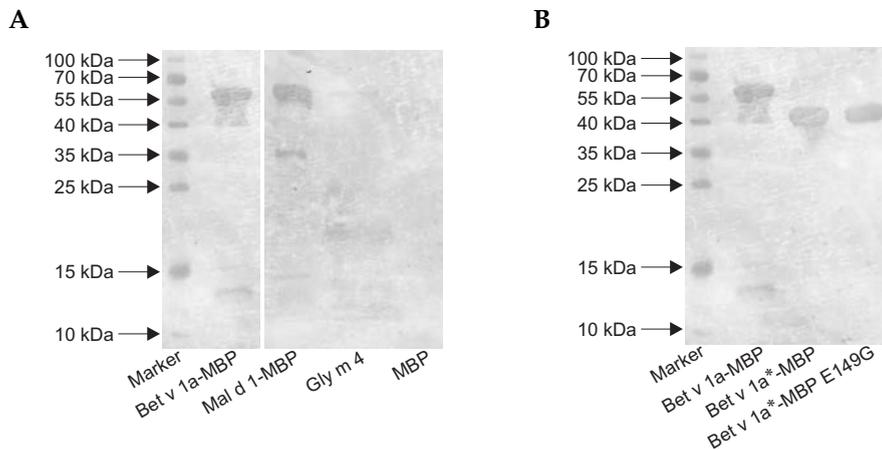


Abbildung 4.6: Immunologische Detektion von Bet v 1-Familieproteinen nach Western Blot durch Bet v 1a-spezifische IgY. Zur Detektion der mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferierten Proteine Bet v 1a-MBP, Mal d 1-MBP und Gly m 4 (A) sowie den verkürzten Varianten Bet v 1a*-MBP und Bet v 1a*-MBP E149G (B) und dem der Kontrolle dienenden MBP wurden die Bet v 1a-spezifischen IgY (2 µg/mL) eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde der polyklonale AP-konjugierte anti-IgY (1:2.000 in 1 % PVA/PBS) eingesetzt. Die Entwicklung des Blots wurde durch Zugabe eines Gemisches aus BCIP und NBT initiiert und bei entsprechender Farbgebung gestoppt. Als Standard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet.

den: bei Verwendung des Blockierungsreagenzes PVA waren die Signale deutlich schwächer als bei Verwendung des alternativen und klassischen Reagenzes BSA.

Da bereits bekannt war, dass die IgY[‡] aus einer nicht dem Standardprotokoll entsprechenden Immunisierung hervorgingen, wurde vermutet, dass sich die hervorgerufene Immunantwort und damit die Ausbildung neuer Antikörper gegen die Zielstruktur hinsichtlich Titer, Spezifität und Affinität messbar unterscheiden müsse. Die Frage nach der Konzentration Bet v 1a-spezifischer IgY in Folge der Immunisierung konnte mit den dargestellten ELISA-Daten semiquantitativ beantwortet werden. Aus den Abbildungen 4.7 und 4.8 ist im Vergleich ersichtlich, dass bei Einsatz der IgY der ersten Immunisierung bereits Konzentrationen im Bereich von 1.25–2.50 µg/mL ausreichen, um eine spezifische Detektion des Allergens zu erzielen; mit 5.00–10.0 µg/mL wird bereits ein Sättigungsniveau erreicht. Bei Verwendung der IgY[‡] aus der zweiten Immunisierung müssen hingegen sehr hohe Konzentrationen von 25.0–50.0 µg/mL verwendet werden, um Signale zu erhalten. Des Weiteren wurden die Signalintensitäten in Abb. 4.7 nach einer kürzeren Detektionszeit beobachtet als diejenigen der in Abb. 4.8 dargestellten (Detektionszeiten nicht gezeigt). Erwartungsgemäß konnte im zweiten Fall die Annahme einer in geringerem Titer spezifischer Antikörper resultierenden Immunisierung bestätigt werden.

Für den Bereich der Allergologie und ihrer Diagnostik wurden für den klassischen Vertreter IgE-induzierter Allergien die Hypersensitivität gegenüber Birkenpollen

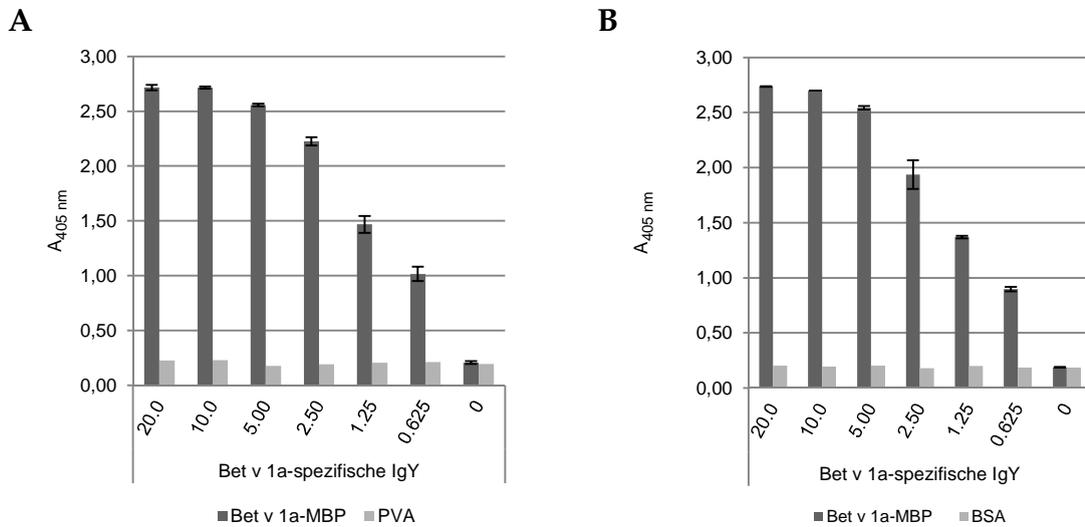


Abbildung 4.7: ELISA-Analyse zur vergleichenden Bestimmung der Reaktivitäten der mittels Immunisierung generierten IgY gegen Bet v 1a bei Blockierung mit unterschiedlichen Reagenzien. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt und mit (A) 1 % PVA in PBS bzw. (B) 2 % BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL der gegen Bet v 1a generierten IgY in einer seriellen Verdünnungsreihe (x-Achse: Konzentrationen in µg/mL). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2000 in (A) 1 % PVA/PBS bzw. (B) 2 % BSA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 1 % PVA bzw. 2 % BSA in PBS verwendet.

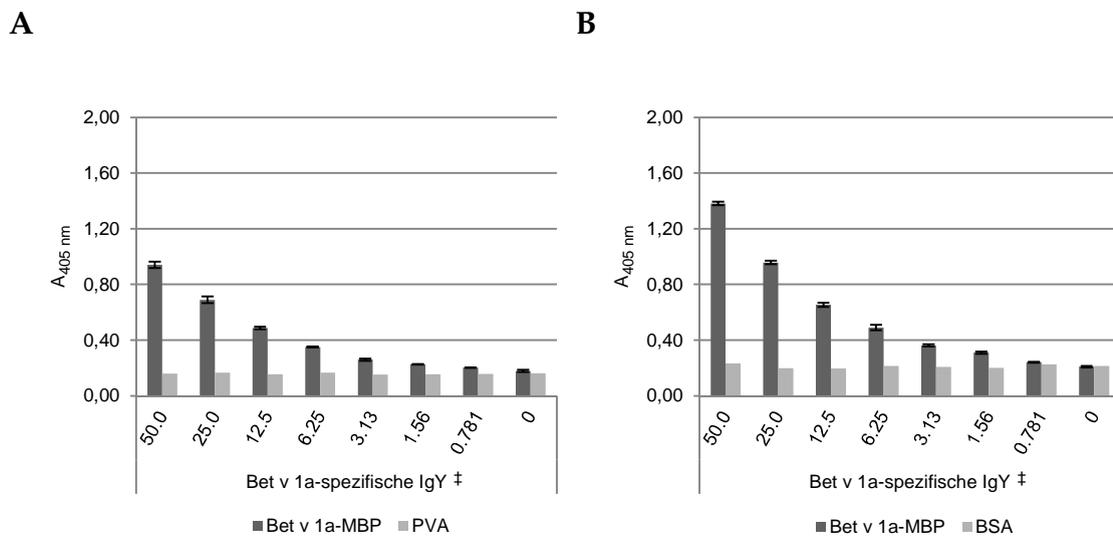


Abbildung 4.8: ELISA-Analyse zur vergleichenden Bestimmung der Reaktivitäten der mittels Immunisierung generierten IgY[†] gegen Bet v 1a bei Blockierung mit unterschiedlichen Reagenzien. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt und mit (A) 1 % PVA in PBS bzw. (B) 2 % BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL der gegen Bet v 1a generierten IgY in einer seriellen Verdünnungsreihe (x-Achse: Konzentrationen in µg/mL). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2000 in (A) 1 % PVA/PBS bzw. (B) 2 % BSA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 1 % PVA bzw. 2 % BSA in PBS verwendet.

gewählt und Immunglobuline des Typs Y gegen das Majorallergen Bet v 1a generiert. In einem weiteren Projekt wurden für den Bereich der Autoimmunologie hinsichtlich der sekundären Thrombozytopenie spezifische, gegen einen Komplex aus dem Plättchenfaktor 4 und einem oligomeren Dextransulfat gerichtete IgY-Antikörper analysiert.

In Analogie zur Charakterisierung der Bet v 1a-spezifischen IgY wurden in ersten ELISA-Analysen durch serielle Verdünnungsreihen die Reaktivitäten und damit die Titer der generierten IgY ermittelt. Erstaunlicherweise mussten die aus dem Eigelb isolierten IgY in sehr hohen Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{g/mL}$) bei Verwendung des Blockierungsreagenzes PVA eingesetzt werden, um nach einer üblichen Detektionszeit von 30 Minuten überhaupt Signale zu erzielen (s. Abb. 4.9 B). Wurde in einem parallel durchgeführten ELISA-Experiment jedoch das konventionelle Blockierungsreagenz BSA verwendet, so konnten innerhalb desselben Detektionszeitraumes mit starken Signalen korrespondierende Reaktivitäten der spezifischen IgY gegen PF4/DS-10 beobachtet werden. Obgleich die einzusetzenden Konzentrationen spezifischer IgY für das Erreichen deutlicher Signale bei $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ liegt, kann die Immunisierung in Bezug auf Spezifität als erfolgreich angesehen werden.

Hinsichtlich der Affinität spezifischer aus Immunisierungen hervorgehender avianer Antikörper wurde angenommen, dass sich das Ausmaß eben dieser Affinität durch die Verwendung der Blockierungsreagenzien BSA und PVA in ELISA-Analysen widerspiegelt (s. o.). Ein deutlicher Unterschied im Reaktivitätsprofil der IgY konnte auch im Falle der PF4/DS-10-spezifischen Antikörper gegenüber ihrer Zielstruktur im ELISA-Experiment beobachtet werden. Das Ausmaß der Signalreduktion trat bei Verwendung von PVA signifikant in Erscheinung. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass neben einem eher geringen Titer spezifischer IgY, diese auch eine sehr niedrige Affinität aufweisen. Zur Quantifizierung der Affinitäten und zur Absicherung der in den ELISA-Analysen erhaltenen Ergebnissen sollten zusätzlich oberflächenplasmonenresonanzspektroskopische Messungen herangezogen werden. Zudem sollte untersucht werden, ob sich durch Immunaффinitätschromatographie hochaffine spezifische Antikörper anreichern lassen.

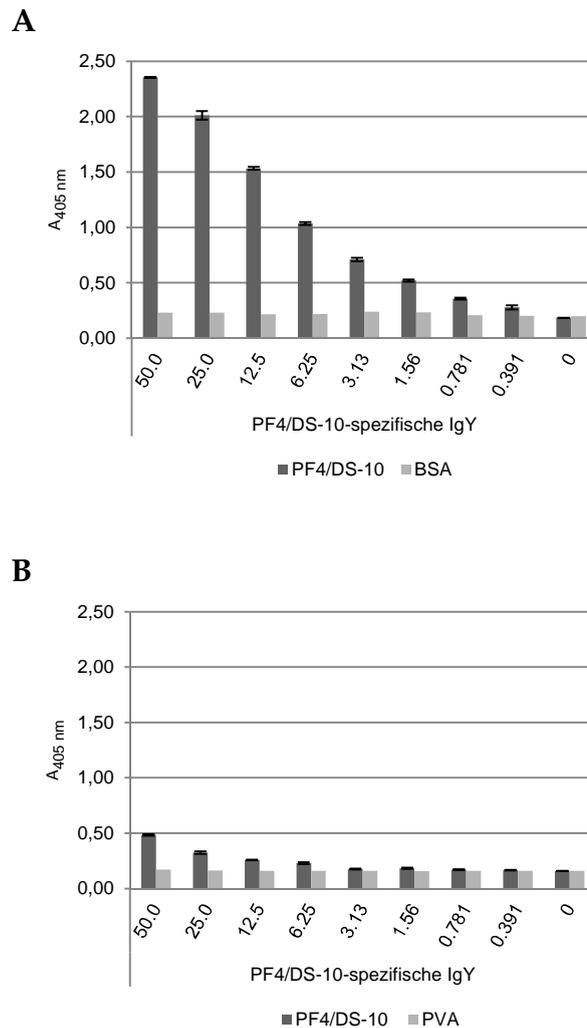


Abbildung 4.9: ELISA-Analyse zur vergleichenden Bestimmung der Reaktivitäten der mittels Immunisierung generierten IgY gegen einen Komplex aus Plättchenfaktor 4 und einem oligomeren Dextransulfat (PF4/DS-10) bei Blockierung mit unterschiedlichen Reagenzien. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL PF4/DS-10 (100 µg/mL) belegt und mit (A) 1% PVA in PBS bzw. (B) 2% BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL der gegen PF4/DS-10 generierten IgY in einer seriellen Verdünnungsreihe (x-Achse: Konzentrationen in µg/mL). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2000 in (A) 1% PVA/PBS bzw. (B) 2% BSA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 1% PVA bzw. 2% BSA in PBS verwendet.

4.3.4 Analyse der Interaktion spezifischer polyklonaler IgY und Bet v 1a-MBP

Die Analyse mit Hilfe der SPR-Spektroskopie sowie die Affinitätschromatographie basieren auf der Interaktion des Liganden (hier das Allergen) und dem Analyten (hier die polyklonalen Antikörper). Obwohl beide Methoden ganz unterschiedliche Zwecke verfolgen, ist die Kenntnis zur Unterdrückung dieser Interaktion entscheidend. Die SPR-Spektroskopie fordert die Regeneration des Sensorchips und damit die Ablösung spezifischer IgY von dem Allergen. Ebenso sollen auch während des affinitätschromatographischen Prozesses spezifische Antikörper von der allergenbelegten Matrix eluiert werden. Da diese Dissoziation nicht trivial ist, mussten zuvor die Bedingungen für eine nachhaltige Unterbindung der Protein-Antikörper-Interaktion untersucht werden.

Die Aufhebung dieser Interaktion durch effiziente Reagenzien erscheint umso wichtiger, je größer die Rückgewinnung spezifisch an das Matrixprotein gebundener IgY bzw. die Effizienz der Chip-Regeneration ausfallen soll. Neben der Effizienz spielt auch die modifizierende Eigenschaft des Reagenzes eine Rolle. An das immobilisierte Protein gebundene Immunglobuline sollen nicht nur durch Bindungsunterdrückung freigesetzt werden können, sondern auch ihre Stabilität, Struktur und Bindungseigenschaften bewahren. Da die Elution des Adsorbenten durch kompetitive Verdrängung die Funktionalität der IgY hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaft gegenüber Bet v 1a nachteilig modifizieren würde, wurde die Elution mit Hilfe einer Konformationsänderung durch Änderung des pH-Wertes in Betracht gezogen.

In ersten ELISA-Analysen wurden zu diesem Zweck zunächst die Stabilitäten des Antigens (Bet v 1a) und der Antikörper (IgY) untersucht. Die Ergebnisse des ELISA in Abbildung 4.10 (A) zeigen, dass immobilisiertes Allergen, welches zuvor mit Pufferlösungen in einem pH-Bereich von 2.5 bis 10 behandelt wurde, nur sehr geringe, wenn nicht keine Unterschiede in der Erkennung durch spezifische IgY aufwies.

In einem zweiten ELISA wurde dann die Stabilität der Bet v 1a-spezifischen IgY selbst in den oben angewandten pH-Stufen untersucht. Auch hier zeigte sich, dass bis zu einem pH-Wert von 10 die Funktionalität, d. h. die spezifische Erkennung des Allergens, in vollem Maße intakt blieb bzw. wiedererlangt werden konnte (s. Abb. 4.11). Allerdings führte die Inkubation mit allergenspezifischen IgY, die zuvor bei pH-Werten unter 3.5 behandelt wurden, zu einer deutlichen Abnahme des Signals

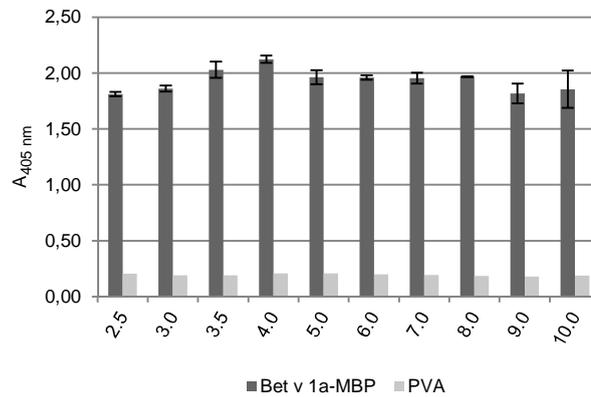


Abbildung 4.10: ELISA-Analyse zur Untersuchung der pH-Stabilität des Birkenpollenmajorallergens Bet v 1a als MBP-Fusionskonstrukt. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L (100 μ g/mL) Bet v 1a-MBP belegt, mit 1 % PVA in PBS blockiert und mit Pufferlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μ L polyklonaler Bet v 1a-spezifischer IgY (2 μ g/mL). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2 000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet (x-Achse: pH-Werte).

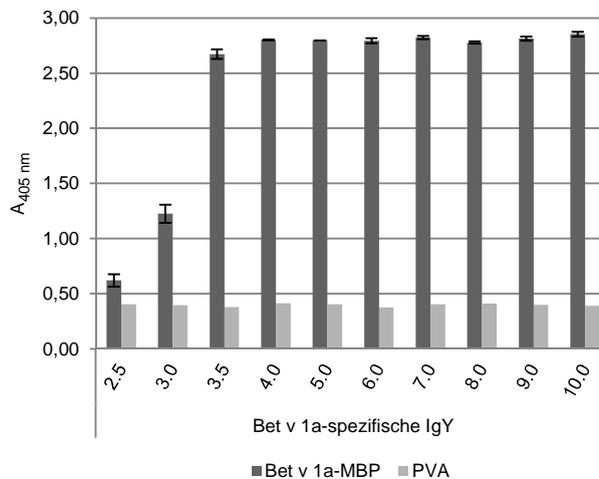


Abbildung 4.11: ELISA-Analyse zur Untersuchung der pH-Stabilität der polyklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L (100 μ g/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μ L polyklonaler Bet v 1a-spezifischer IgY (2 μ g/mL), die zuvor 30 min bei RT und unterschiedlichen pH-Werten inkubiert und schließlich neutralisiert wurden. Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2 000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet (x-Achse: pH-Werte).

für die Allergen-Antikörper-Wechselwirkung. Die Auflösung der Interaktion zwischen Allergen und Antikörper durch Konformationsänderung im sauren bis leicht basischen Bereich wurde durch die durchgeführten Analysen ausgeschlossen.

Ob ferner eine Störung der Allergen-Antikörper-Interaktion mit Pufferlösungen im höher alkalischen Milieu erzielt werden kann, sollte in einem weiteren ELISA geprüft werden. Antigen, das zuvor mit basischen Puffern im Bereich von pH 10 bis pH 12 inkubiert wurde, zeigte eine deutlich geminderte Erkennung durch spezifische IgY, die umso stärker ausgeprägt war, desto höher der pH-Wert der Pufferlösung gewählt wurde (s. Abb. 4.12). Diesem Ergebnis zufolge wurde die Stabilität der avianen Immunglobuline im basischen Milieu nicht weiter untersucht, da mindestens eine ähnliche pH-abhängige Reaktivitätsabnahme zu erwarten wäre und daher eine Interaktionsunterdrückung durch Verwendung stark basischer Puffer nicht erreicht werden könnte.

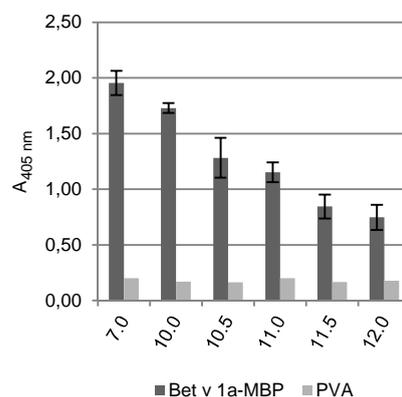


Abbildung 4.12: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Stabilität von Bet v 1a-MBP im basischen Milieu. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μL polyklonaler Bet v 1a-spezifischer IgY (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2 000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet (x-Achse: pH-Werte).

Da auf Grund der vorliegenden Resultate eine erfolgreiche Ablösung spezifischer IgY von dem allergenen Bindungspartner Bet v 1a durch pH-abhängige Konformationsänderung als nicht Erfolg versprechend ausgeschlossen werden musste, wurde die Wirkung chaotroper Reagenzien in Betracht gezogen. Chaotrope Reagenzien vermögen ihrer Eigenschaft nach die Struktur des Wassers aufzubrechen und dadurch die Stabilisierung hydrophober Wechselwirkungen herabzusetzen. Infolgedessen werden sekundäre und höhere Strukturen der Proteine ebenfalls destabilisiert. Der Einsatz magnesiumchloridhaltiger Lösungen unterschiedlicher Konzentration wurde in ELISA-basierten Analysen zur Interaktion von IgY und Allergen näher betrachtet. In einem ersten ELISA-Experiment (s. Abb. 4.13) konnte

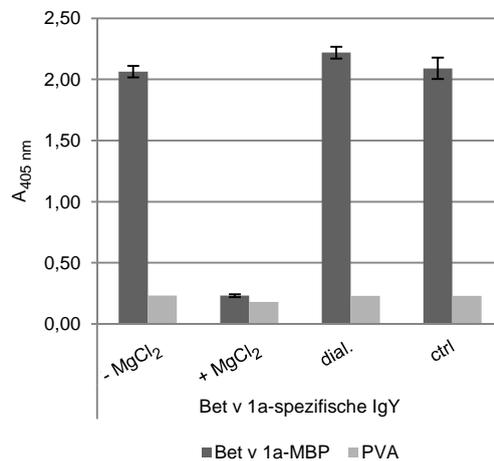


Abbildung 4.13: ELISA-Analyse zur Untersuchung des Effektes von Magnesiumchlorid auf die Antikörper-Allergen-Interaktion. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L (100 μ g/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Bet v 1a-spezifischen IgY in Ab- oder Anwesenheit von Magnesiumchlorid (4.5 M) bzw. nach Inkubation mit Magnesiumchlorid (4.5 M) und Dialyse gegen PBS (dial.). Zusätzlich wurde immobilisiertes Allergen mit Magnesiumchlorid (4.5 M) behandelt und dann mit spezifischen IgY inkubiert (ctrl). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

gezeigt werden, dass Magnesiumchlorid in der eingesetzten Konzentration von 4.5 M die Bindung der Bet v 1a-spezifischen IgY an ihre Zielstruktur inhibiert. Antikörper, die zuvor in magnesiumchloridhaltiger Lösung (4.5 M) inkubiert und anschließend gegen PBS dialysiert wurden, zeigten hierbei die gleiche Reaktivität wie die nicht behandelten Bet v 1a-spezifischen IgY. Durch diese Kontrolle konnte ein unerwünschter negativer Effekt des eingesetzten Chaotrops ausgeschlossen werden: eine irreversible Konformationsänderung mit einhergehendem Allergeninteraktionsverlust lag nicht vor. In zwei weiteren ELISA-Analysen wurde darüber hinaus untersucht, ob bereits niedrigere Konzentrationen an Magnesiumchlorid die Bindung zwischen Antikörper und Allergen unterbinden, und ob der Effekt auch nach bereits erfolgtem Bindungsereignis in gleicher Weise auftritt. Zwar vermögen bereits Magnesiumchloridkonzentrationen von 1 M die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung zu unterdrücken (Abb. 4.14 A), jedoch zeigt sich, dass nach einmal erfolgter Bindung des Antikörpers an sein Allergen eben diese Bindung erst mit 4.5 M Magnesiumchlorid effizient gelöst werden kann (Abb. 4.14 B). Die erzielten Resultate waren für die nachfolgenden Versuche der affinitätschromatographischen Anreicherung spezifischer IgY und der Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten unter Ausnutzung des Oberflächenplasmonresonanzeffektes von grundlegender Bedeutung.

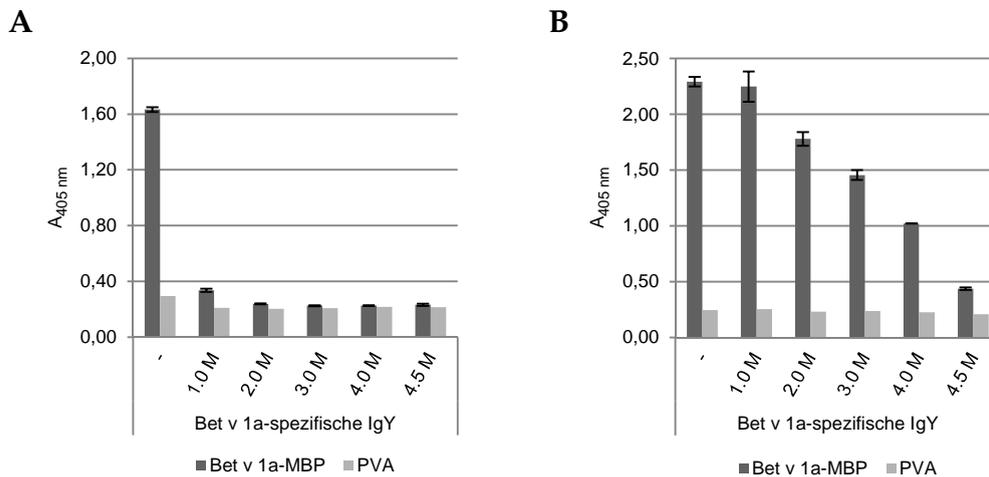
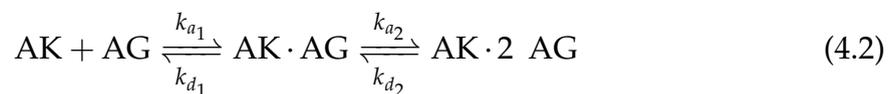
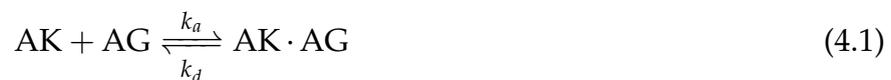


Abbildung 4.14: ELISA-Analyse zur Untersuchung des Effektes von Magnesiumchlorid auf die Antikörper-Allergen-Interaktion in Abhängigkeit der Konzentration und der Art der Anwendung. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L (100 μ g/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Bet v 1a-spezifischen IgY in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Magnesiumchlorid (vgl. x-Achse) während des Bindungsereignisses (A) bzw. während der Waschprozedur nach Bindung (B). Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2.000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

4.3.5 Bestimmung der Affinitäten mittels SPR-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) ist eine im Bereich der Biosensorik etablierte und weit verbreitete Methode, um Interaktionen von Biomolekülen in Echtzeit zu untersuchen. Darüber hinaus kann auf eine vorausgehende Markierung der zu untersuchenden Interaktionspartner verzichtet werden. In der Durchführung eines SPR-Experimentes wird der mit einer sehr dünnen Goldoberfläche ausgestattete Sensorchip mit dem als Ligand bezeichneten Biomolekül kovalent gekoppelt. Innerhalb einer mit dem Sensorchip in direktem Kontakt stehenden Flusszelle wird nun ein (potentieller) Interaktionspartner (Analyt) über die Goldoberfläche geleitet. Durch Wechselwirkung des Analyten mit dem Liganden kann es zu einer Bindung und damit zu einer direkten Massenzunahme auf der Metalloberfläche kommen. Das Prinzip der SPR-Spektroskopie besteht nun darin, diese Massenänderung durch Ausnutzung des optischen Phänomens der Oberflächenplasmonenresonanz messbar zu machen. Als Messwert erhält man den SPR-Winkel, unter dem Oberflächenplasmonen angeregt werden können. Die zeitliche Änderung des SPR-Winkels ist abhängig von der Massenänderung auf der Oberfläche des Metalls und lässt somit Rückschlüsse auf das Interaktionsverhalten zwischen Ligand und Analyt zu. In der Praxis wird zweckmäßig die Einheit RU (*response unit*) gegen die Zeit in einem Sensorgramm aufgetragen; definitionsgemäß entspricht die Änderung des SPR-Winkels bei einer Änderung der Masse von

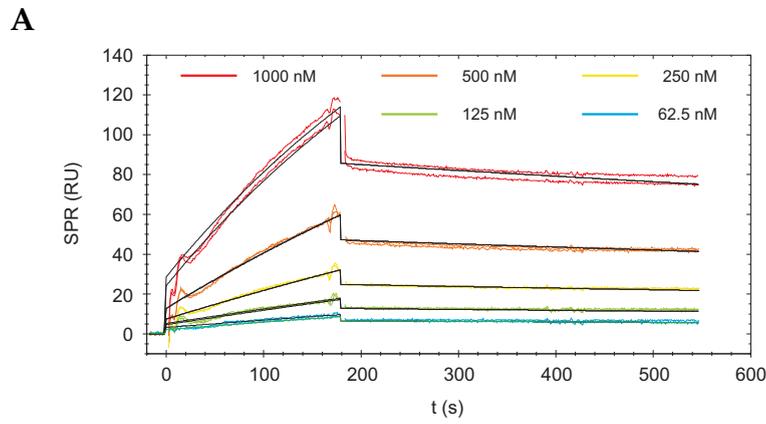
einem Pikogramm bezogen auf einen Quadratmillimeter der Chipoberfläche 1 RU. Mit Hilfe der erhaltenen Sensorgramme lassen sich dann beispielsweise kinetische Daten als Charakteristik der Ligand-Analyt-Interaktion berechnen. Durch Zugrundelegen eines adäquaten Bindungsmodells (1:1-Bindung (Langmuir), bivalent etc.) und mathematischer Anpassung von Regressionsfunktionen an den Verlauf der Bindungskurven können die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_a) und der Dissoziation (k_d) berechnet werden. Aus dem Verhältnis beider Konstanten ergibt sich direkt die Dissoziationskonstante K_D nach Gleichung (4.3) für das in (4.1) gezeigte Gleichgewicht. Im Falle eines bivalenten Bindungsverhaltens/-modells resultieren zwei Dissoziationskonstanten K_{D_1} und K_{D_2} (vgl. Gl. (4.2)).



$$K_D = \frac{k_a}{k_d} K_{D_1} = \frac{k_{a_1}}{k_{d_1}}, K_{D_2} = \frac{k_{a_2}}{k_{d_2}} \quad (4.3)$$

Ziel der Anwendung der SPR-Spektroskopie war in dieser Arbeit die Charakterisierung der Bet v 1a-spezifischen avianen Antikörper in Hinblick auf Assoziations- und Dissoziationsverhalten und Bestimmung der kinetischen Parameter sowie einer apparenten Dissoziationskonstante.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter aus der Untersuchung des Interaktionsverhaltens Bet v 1a-spezifischer IgY und allergenem Bindungspartner wurde auf der mit Carboxymethyldextran belegten Goldoberfläche des Sensorchips SPR-2 *Affinity Sensor Amine* nach Aktivierung mit einer Kombination aus dem Dimin EDC und dem Succiniminderivat NHS das rekombinant hergestellte Protein Bet v 1a-MBP immobilisiert. Um nur diejenigen Interaktionen zu berücksichtigen, die auf einer Bindung der polyklonalen avianen IgY mit dem allergenen Teil des Fusionsproteins basieren, wurde auf einem Referenzfeld des verwendeten und mit Bet v 1a-MBP belegten Biosensors zusätzlich die rekombinante Form des Maltose bindenden Proteins immobilisiert. Auf diese Weise kann durch Ansteuerung beider Flusszellen mit dem zu untersuchenden Analyten zwischen den gewünschten Bindungen und den Hintergrundbindungen an MBP unterschieden und die Sen-



B

k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	χ^2 (RU)
$(2.29 \pm 0.01) \cdot 10^3$	$(3.57 \pm 0.09) \cdot 10^{-4}$	156 ± 5	2.59

Abbildung 4.15: SPR-spektroskopische Analyse der Bet v 1a-spezifischen avianen IgY. Die spezifischen IgY wurden in einer seriellen Konzentrationsreihe (s. Legende) in einem SPR-2-Gerät gemessen (A). Als Flussrate wurden 25 μ L/min gewählt, die Assoziationsdauer betrug 3 min und die Dissoziationszeit 6 min. Der Sensorchip wurde mit dem rekombinant produzierten Bet v 1a-MBP belegt. Zur Referenzierung der Sensorgramme wurde parallel gegen eine mit dem rekombinanten MBP belegten Flusszelle gemessen. Gezeigt sind die referenzierten Differenzspektren beider Messzellen. In schwarz dargestellt, sind die mit Hilfe der Software *TraceDrawer* erhaltenen Regressionskurven bei Zugrundelegen eines LANGMUIR'schen Absorptionsverhaltens (1:1-Bindungsmodell). (B) Die daraus resultierenden Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d ergeben die apparente Dissoziationskonstante K_D . Der χ^2 -Wert stellt ein Maß für die Güte des Fittings dar.

sorgramme nach Abzug der Bindung an MBP korrigiert erhalten werden. In beiden Fällen der Sensorchipbelegung konnten ca. 400 RU des jeweiligen Proteins immobilisiert werden. Mit 61 kDa bzw. 43 kDa für Bet v 1a-MBP bzw. MBP lag dies in der Größenordnung von 7.9 ± 1.5 fmol/ mm^2 und damit im typischen Bereich der Messanforderungen (Kommunikation mit SierraSensors, Greenville, RI, USA).

In einer ersten Untersuchung wurde das Bindungsverhalten der spezifischen avianen Immunglobuline der Immunisierung mit ihrem Allergen Bet v 1a-MBP analysiert und die in Abschnitt 4.3.4 für das ELISA-System ermittelten Bedingungen zur Interaktionsunterdrückung getestet. Die Beobachtungen in der SPR-Analyse bestätigten, dass durch Waschen mit magnesiumchloridhaltiger Lösung (4.5 M) die vollständige Regeneration des Sensorchips unter Erhalt der Funktionalität erfolgte und für weitere Messungen zur Verfügung stand. Im eigentlichen SPR-Experiment wurden dann die Bet v 1a-spezifischen IgY beider Immunisierungen (auch IgY $^\pm$) in unterschiedlichen Konzentrationen mit Hilfe einer automatisierten Routine analysiert. Das für die Bet v 1a-spezifischen IgY erhaltene Sensorgramm sowie die ermittelten kinetischen Parameter sind in Abbildung 4.15 (A) und (B) gezeigt.

Zur Berechnung der kinetischen Parameter wurde mit Hilfe der Software *Trace-Drawer* zunächst aus den Sensorgrammen der Mess- und der Referenzzelle das Differenzspektrum generiert. Diese Vorgehensweise berücksichtigt eventuelle Unspezifitäten der polyklonalen IgY gegenüber dem rekombinant produzierten MBP. Mit dem resultierenden Spektrum wurde dann ein computergestützter Kurvenfit vorgenommen, welcher in einem Iterationsprozess die Funktion zur genauesten Beschreibung des gemessenen Kurvenverlaufs ermittelt. Die Güte einer solch iterativ angenäherten nicht-linearen Regression kann durch die statistische Größe χ^2 angegeben werden. Je kleiner der χ^2 -Wert ist, desto genauer ist die Übereinstimmung des berechneten Funktionsverlaufs mit dem tatsächlichen Verlauf der Messkurve. Für das mit den polyklonalen Bet v 1a-spezifischen avianen IgY erhaltene Sensorgramm wurde für die Ermittlung der kinetischen Parameter das Absorptionsmodell nach LANGMUIR zugrunde gelegt, welches für die Interaktion der Antikörper mit dem immobilisierten Allergen ein 1:1-Bindungsmodell berücksichtigt. Obwohl bei der Wechselwirkung eines Antikörpers mit seinem Allergen dessen Bivalenz betrachtet werden muss und demzufolge ein bivalentes Bindungsmodell eine bessere Näherung erzielen sollte, konnte mit anderen als dem hier verwendeten LANGMUIR'schen Absorptionsmodell keine Optimierung erhalten werden. Der für χ^2 bestimmte Wert lag bei 2.59 und stellte eine sehr gute Näherung dar. Aus den abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d konnte dann die apparente Dissoziationskonstante K_D mit 156 nM bestimmt werden. Im Gegensatz zur Messung monoklonaler Antikörper in oberflächenplasmonenresonanzspektroskopischen Analysen stellen die Dissoziationskonstante wie auch die übrigen kinetischen Parameter nur einen apparenten mittleren Wert dar; d. h. , dass die Affinitäten der spezifischen Antikörper um diesen apparenten K_D -Wert von 156 nM liegen. Insgesamt können die mit Hilfe der SPR-Spektroskopie charakterisierten IgY als mittel- bis hochaffin angesehen werden. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit den Erkenntnissen aus den ELISA-Analysen bei Verwendung unterschiedlicher Blockierungsreagenzien zur qualitativen Unterscheidung der Antikörperaffinitäten. Zudem konnten die erhaltenen kinetischen Parameter in einer zweiten SPR-Analyse reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Analog zu der vorangegangenen Vorgehensweise wurden auch die Bet v 1a-spezifischen IgY[†] der zweiten Immunisierung SPR-spektroskopisch untersucht. Hierzu wurden die Antikörper in einer seriellen Verdünnungsreihe ebenfalls auf einem Sensorchip mit immobilisiertem Bet v 1a-MBP und MBP als Referenz vermessen. In diesem Fall konnten jedoch keine Sensorgramme erhalten werden, die eine qua-

litative Aussage über die kinetischen Parameter der Geschwindigkeitskonstanten sowie der Dissoziationskonstante erlaubten. Auch unter der Annahme eines geringeren Titers mittel- bis hochaffiner IgY, die sich auf die zuvor erhaltenen ELISA-Daten stützen, konnte bei Einsatz höherer Konzentrationen (bis zu 10 µg/mL) keine im SPR-System auswertbaren Assoziations- und Dissoziationskurven erhalten werden. Die Berechnung einer apparenten Affinität blieb für die spezifischen IgY[‡] daher aus. Dies lässt den Schluss zu, dass aus der zweiten Immunisierung weniger affine IgY hervorgingen. Die Affinitäten dieser Antikörper (IgY[‡]) liegen demnach unterhalb der mittels SPR-Spektroskopie bestimmbaren apparenten kinetischen Parameter.

4.3.6 Affinitätschromatographische Anreicherung Bet v 1a-spezifischer IgY

Im weiteren Verlauf der Untersuchung der avianen Bet v 1a-spezifischen Antikörper sollten diese mit Hilfe einer Affinitätschromatographie getrennt werden. Auf diese Weise sollten die spezifischen und hochaffinen Immunglobuline von den übrigen nicht- bzw. unspezifischen Antikörpern separiert und hinsichtlich Reaktivität und Affinität gegenüber Bet v 1a näher analysiert werden. Zur Herstellung einer geeigneten Affinitätsmatrix wurde das Chromatographiematerial Affi-Gel® 15² verwendet.

Dieses zeichnet sich durch eine terminale aminoreaktive Succinimidylgruppe aus und ermöglicht die kovalente Kopplung und Immobilisierung von Proteinen und Peptiden über deren ε-Aminogruppen zugänglicher Lysinreste. Außerdem besitzt diese Affinitätschromatographiematrix eine positive Ladung innerhalb eines fünfzehn Atome umfassenden Distanzlinkers, die eine Kopplung acidischer Proteine und Peptide unter physiologischen, d. h. nahezu neutralen Bedingungen erlaubt (siehe Abbildung 4.16). Diese durch ein quartäres Ammoniumion des Linkers inhärente positive Ladung erfüllt hierbei gleich zwei Funktionen: zum einen besteht zwischen Ammoniumion und dem seines isoelektrischen Punktes wegen negativ geladenen Proteins eine Anziehung und damit eine Begünstigung der Kopplung. Zudem wird die durch teilweise Hydrolyse des Aktivesters auftretende negative Ladung kompensiert, die andernfalls der Anziehung des zu koppelnden Proteins an die Matrix entgegenwirken würde.

²Affi-Gel® 15, BioRad GmbH

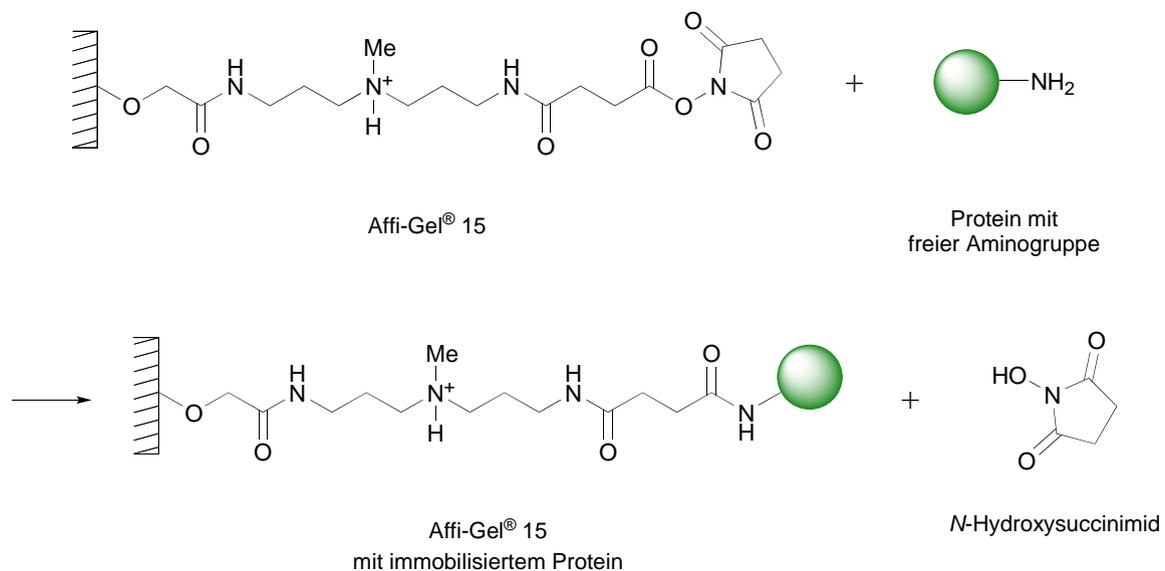


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der Kopplung eines Proteins an die Matrix Affi-Gel® 15

Herstellung der Bet v 1a-spezifischen Matrix Für die Immobilisierung des zuvor exprimierten und gereinigten Birkenpollenallergens Bet v 1a-MBP wurde dieses gegen einen MOPS-haltigen Puffer (pH 7.5) dialysiert und mit dem Matrixmaterial Affi-Gel® 15 inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden anschließend mit Ethanolamin blockiert. Der Erfolg der Kopplung von Bet v 1a-MBP an das Matrixmaterial erfolgte durch immunologische Detektion. Hierzu wurden gleiche Volumina der Matrix für eine Inkubation mit Bet v 1a-spezifischen IgY bzw. naiven IgY entnommen. Als sekundäre Antikörper wurden IgY-spezifische Immunglobuline verwendet. Wie in Abbildung 4.17 gezeigt, konnte das MBP-fusionierte Allergen Bet v 1a auf dem Chromatographiematerial erfolgreich nachgewiesen werden und bestätigte damit die Kopplung zwischen Ligand und Trägermaterial. Nach Überführen in einen Säulenkörper und Waschen mit PBS konnte das Material zur Anreicherung hochaffiner und spezifischer IgY eingesetzt werden.

Durchführung der Affinitätschromatographie Die Generierung spezifischer Antikörper mit Hilfe der gezielten aktiven Immunisierung liefert stets polyklonale Antikörper unterschiedlicher Spezifität und Affinität. Mit Hilfe der in Abschnitt 3.3.3 hergestellten Affinitätsmatrix sollten die polyklonalen Bet v 1a-spezifischen Antikörper hinsichtlich Spezifität und Affinität angereichert werden. Zu diesem Zweck wurde eine verdünnte Lösung der Bet v 1a-spezifischen IgY in physiologischer Salzlösung mit der Affinitätsmatrix inkubiert. Nach Waschen zur Entfernung unspezifischer Antikörper und Kontaminanten wurden die spezifischen Interakti-

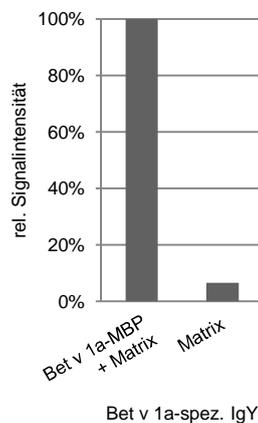


Abbildung 4.17: Immunologischer Nachweis von kovalent an die Matrix gekoppeltem Bet v 1a-MBP. Gleiche Volumina der generierten Affinitätsmatrix und der ungekoppelten Matrix (Kontrolle) wurden mit Bet v 1a-spezifischen IgY inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte, polyklonale IgY-spezifische Antikörper eingesetzt (1:2.000 in PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Angegeben sind die relativen Absorptionen.

onspartner mit magnesiumchloridhaltiger Lösung eluiert. Hierbei wurde die Matrix zunächst mit Magnesiumchloridlösung inkubiert, um ausreichend Zeit zur Lösung der Antikörper-Antigen-Interaktion zu gewährleisten. Abschließend erfolgte die fraktionierte Elution der Antikörper. Nach Dialyse gegen PBS (pH 7.5) wurde die Antikörperkonzentration photometrisch bestimmt. Zur Überprüfung der Anreicherung spezifischer und affiner IgY wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass keine Anreicherung stattgefunden hatte. Möglicherweise sind die spezifischen IgY so affin, dass sie sich unter diesen Bedingungen nicht quantitativ von der Affinitätsmatrix lösen ließen. Die SPR-spektroskopische Analyse bestätigte dieses Ergebnis indirekt, da hierbei keine auswertbaren Sensorgramme erhalten werden konnten.

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

Für den Einsatz polyklonaler nicht-humaner Antikörper in der allergologischen, infektiologischen und autoimmunologischen Diagnostik ist die Kompatibilität von potentiellen Referenzmaterialien mit dem jeweiligen Assay von entscheidender Bedeutung. In der humanmedizinischen Diagnostik sind die unterschiedlichen Klassen humaner Antikörper und ihrer Subtypen von Interesse. So muss beispielswei-

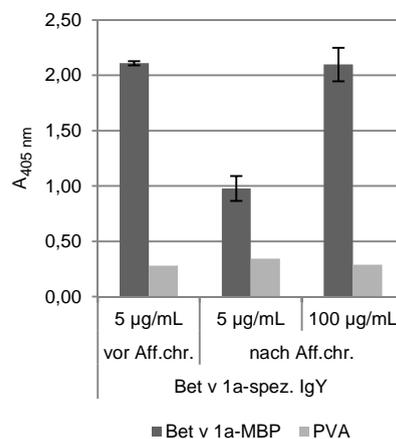


Abbildung 4.18: ELISA-Analyse zur Überprüfung der Anreicherung Bet v 1a-spezifischer IgY mittels Affinitätschromatographie. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL der Bet v 1a-spezifischen IgY vor bzw. nach Affinitätschromatographie. Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte polyklonale anti-IgY eingesetzt (1:2000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet. Aff.chr. = Affinitätschromatographie.

se in einem allergologischen Assay mit dem Ziel der Bestimmung humaner IgE-Antikörper ein Referenzmaterial selbst als humaner IgE detektiert werden können. Potentielle Referenzmaterialien, die nicht auf humane Poolseren zurückgreifen, müssen daher an die entsprechende Spezifität eines Assays adaptiert werden. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit evaluierten Konzepte zur Verknüpfung der durch IgY repräsentierten Allergenspezifität mit der durch den Assay vorgegebenen Spezifität betrachtet.

4.4.1 Kopplung zweier Antikörper über Iminbindungen durch Umsatz mit Glutardialdehyd

Einer zu den klassischen Kopplungsmethoden gehörende und daher zunächst für das Vorhaben der Verknüpfung zweier Antikörper naheliegendste Ansatz bestand in der kovalenten Kopplung via Iminbrücken durch die Umsetzung der zu verknüpfenden Immunglobuline mit Hilfe des homobifunktionellen Reagenzes Glutardialdehyd³. Hierbei wird, wie in Abbildung 4.19 schematisch gezeigt, die Reaktivität der terminalen Aldehydfunktionen gegenüber nucleophilen, primären Aminogruppen, genauer der ϵ -Aminogruppen zugänglicher Lysinreste des Proteins ausgenutzt. Der Angriff des Nucleophils am Carbonylkohlenstoffatom führt über die Zwischenstufe des Halbaminals nach Abspaltung von Wasser zu dem stabile-

³1,5-Pentandial (IUPAC)

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

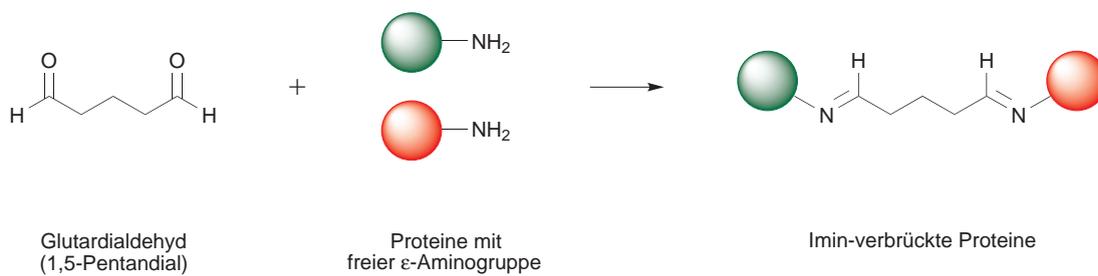


Abbildung 4.19: Vereinfachte, schematische Darstellung der Reaktion des homobifunktionellen Reagenzes Glutardialdehyd mit den ε-Aminoresten von Proteinen. Dem Verständnis dienend ist hier nur der ideale Fall der kovalenten Verknüpfung zweier unterschiedlicher Proteine gezeigt. In der Realität sind jedoch auch die Verknüpfungen gleicher Proteine bzw. Oligomerisierungsprodukte zu erwarten.

ren Imin⁴. Neben dem unter idealen Verhältnissen gebildeten Produkt, dem Dimer zweier unterschiedlicher Antikörper, können jedoch auch zahlreiche andersartig zusammengesetzte und vernetzte Immunglobulin-Konjugate auftreten.

Bei der Durchführung dieser Kopplungsmethode ist zu bedenken, dass für einen erfolgreichen Ablauf der Reaktion und für das Ausmaß derselben die Wahl des pH-Wertes eine Rolle spielt. So dürfen die als Nucleophil fungierenden freien Aminogruppen des Proteins (vornehmlich die ε-Aminogruppen der Lysinreste) nicht milieubedingt als Ammoniumionen vorliegen. Andererseits verläuft der nucleophile Angriff und die Bildung des Imins säurekatalysiert. Daraus folgt, dass ein zu niedriger pH-Wert zwar die Aktivierung bzw. Polarisierung der Carbonylgruppe, aber auch das Vorliegen des Proteins mit einer positiven Bruttoladung und daher die Existenz von Ammoniumionen begünstigt. Dem entgegen steht ein zu hoher pH-Wert, bei dem die Aminogruppen nicht protoniert vorliegen, jedoch eine Aktivierung und damit Favorisierung des nucleophilen Angriffs eingeschränkt ist. Die Wahl des pH-Wertes ist demnach maßgebend für den Ablauf der Reaktion. Aviane Immunglobuline des Typs Y besitzen einen apparenten isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 5.7 bis 7.4 [154]. Aus der Natur polyklonaler Antikörper heraus kann also kein exakter pH-Wert gefunden werden, bei dem alle individuellen Antikörper des polyklonalen Gemisches die gleiche Gesamtladung und damit den gleichen Anteil nicht protonierter Aminogruppen aufweisen. Für die Versuchsdurchführung wurden daher zwei Puffer unterschiedlichen pH-Wertes ausgewählt: 1. PBS bei pH 7.5 und 2. Natriumcitrat/Bicarbonat bei pH 10. Allgemein gilt, dass ein Protein bei einem pH-Wert größer als der pI negativ, bei einem pH-Wert kleiner als der pI positiv geladen erscheint. Trifft der pH-Wert genau den isoelektrischen Punkt des Proteins, so liegt dieses neutral vor. Mit dem neutralen Puffer PBS liegt der pH-Wert knapp überhalb des maximal zu erwartenden pI-Wertes der IgY, so dass eher

⁴ältere Bezeichnung: SCHIFF'sche Base

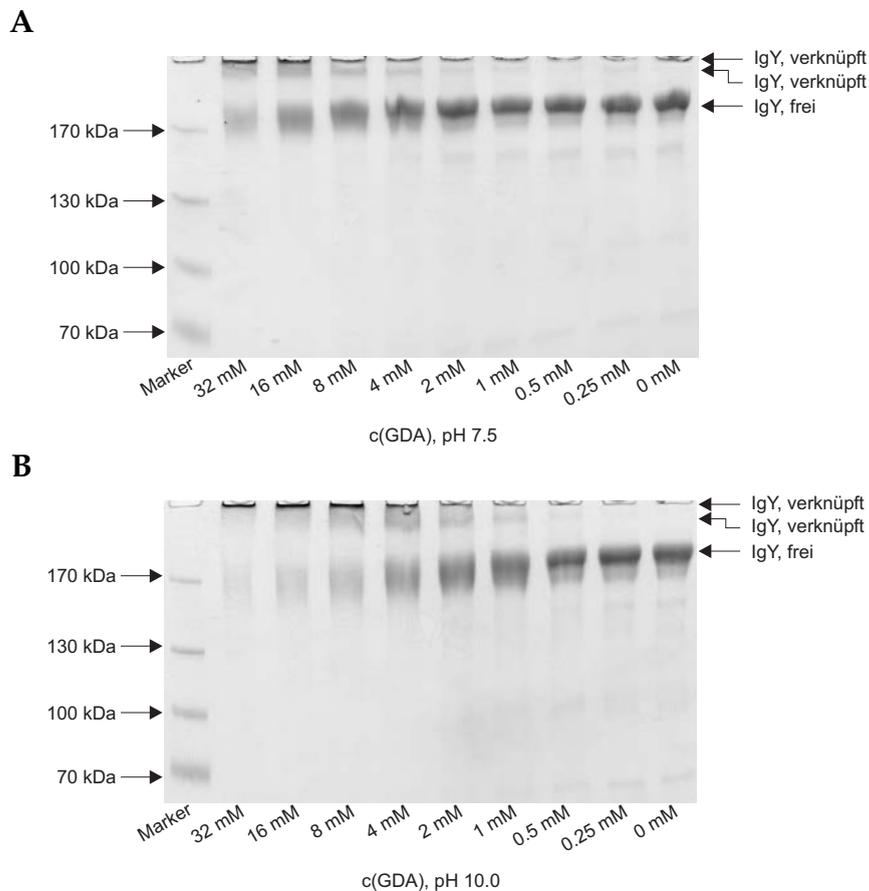


Abbildung 4.20: Analytische SDS-PAGE der mit unterschiedlichen GDA-Konzentrationen umgesetzten IgY mit nachfolgender Coomassie-Färbung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionslösungen mit Probenpuffer versetzt und in einem 7.5% igen Acrylamid-Gel in Tris-Glycin-haltigem Puffer gelelektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung. Gezeigt sind die Produkte der Kopplung mit GDA bei pH 7.5 (A) bzw. pH 10 (B). Als Standard wurde der Proteinmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet.

Antikörper mit einem niedrigen pI einen stärkeren Anteil freier Amine aufweisen, während bei pH 10 auch die Aminogruppen der IgY mit einem pI um 7.4 nicht als Ammoniumionen vorliegen sollten. In einem Basisexperiment zur kovalenten Verknüpfung der Antikörper wurden aviane naive Antikörper mit unterschiedlichen Konzentrationen wässriger Glutardialdehydlösungen sowohl in PBS als auch Natriumacetat/Bicarbonat zur Reaktion gebracht. Nach Ende der Inkubationszeit wurde mit Tris-haltigem Puffer zum Abfangen unumgesetzten Glutardialdehyds versetzt und der Erfolg der Verknüpfung mit einer SDS-PAGE analysiert. Abbildung 4.20 zeigt die Coomassie-Färbung nach denaturierender Gelelektrophorese.

Die Analyse zeigt, dass sowohl in neutralem Milieu als auch bei basischem pH-Wert Verknüpfungsprodukte der Antikörper erzielt werden konnten. Erwartungsgemäß war die Effizienz der Kopplung bei pH 10 höher. Bereits bei einer Konzentration von 0.5 mM Glutardialdehyd konnte die Bildung schwach oligomerisierter IgY in

niedriger Konzentration für beide pH-Stufen beobachtet werden. Diese wurde in Anwesenheit höherer Glutaraldehydkonzentrationen zunächst gesteigert, wobei ab einer Konzentration von ca. 4 mM (pH 7.5) bzw. 2 mM (pH 10) Kopplungsprodukte mit höherem Oligomerisierungsgrad in den Bereichen des Probenauftrags auftraten und gelelektrophoretisch nicht mehr aufgelöst wurden. Im Falle des basischen pH-Wertes war dieser Insolubilisierungseffekt stärker. Die Abnahme der Konzentration freier IgY in Abhängigkeit der gewählten Glutaraldehydkonzentration war zudem im Basischen ausgeprägter. Zusammenfassend ließ sich jedoch feststellen, dass die Kopplungseffizienz und der Grad der Oligomerisierung für reproduzierbare Anwendungen zur gezielten Verknüpfung zweier Antikörper schwer zu steuern waren.

4.4.2 Kopplung zweier Antikörper durch Iminbrücken nach MALAPRADE-Oxidation

Die Verknüpfung zweier oder mehrerer unterschiedlicher Antikörper mit Hilfe des bifunktionellen Linkers Glutaraldehyd ist zwar möglich, aber wie in Kapitel 4.4.1 gezeigt, ineffektiv und hinsichtlich einer kovalenten Kopplung unter Erhalt der Paratopfunktionalität schwer kontrollierbar. Zwar steht mit der Aldehydfunktion des Linkers und den terminalen Aminogruppen der zu koppelnden Antikörper ein ausreichend reaktives Paar im Sinne einer nucleophilen Additionsreaktion zur Verfügung, jedoch ist die Selektivität praktisch nicht vorhanden. Die Grundlage für einen optimierten Ansatz bestand also darin, selektiv Aldehydfunktionen im Fc-Bereich der Antikörper einzuführen.

Abbildung 4.21 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der zuvor nach MALAPRADE mit *meta*-Periodat oxidierten und zur Reaktion gebrachten avianen Antikörper in einem Coomassie-gefärbten Acrylamidgel. Im Vergleich zu den unbehandelten Antikörpern ist nach Inkubation der oxidierten Antikörper in neutralem bis basischem Milieu zusätzlich eine mit dem Verknüpfungsprodukt korrespondierende Bande zu erkennen. Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der Verknüpfung bei basischem pH-Wert (pH 10) größer war als im Neutralen. Insgesamt ist die Effizienz der Kopplung jedoch sehr gering, da der Großteil freien IgY zuzuordnen ist.

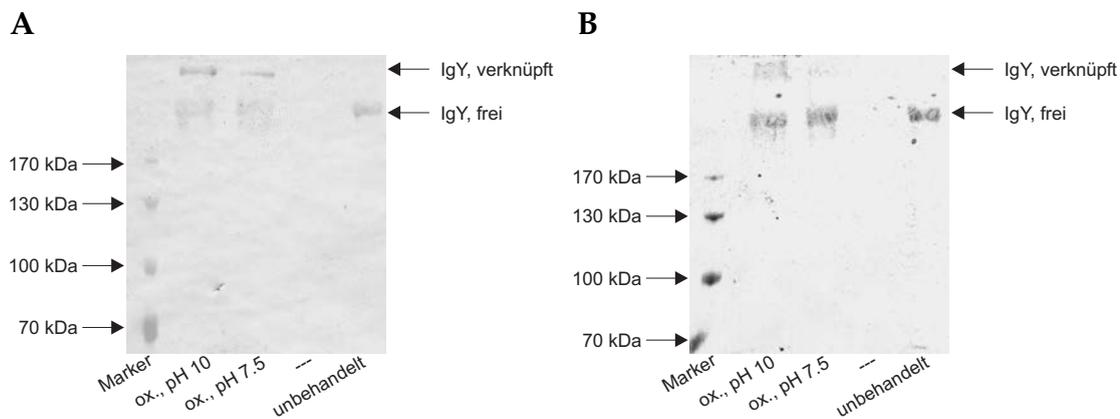


Abbildung 4.21: Analytische SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Immunblot mit Natrium-meta-periodat oxidiert und durch Iminbildung verknüpfter Antikörper. Die Detektion im Immunblot erfolgte durch den polyklonalen, AP-konjugierten anti-IgY (1:2.000 in 1 % PVA/PBS). (A) Coomassie-Färbung, (B) Immunblot. Als Standard wurde der Proteinmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet.

4.4.3 Hapten-Derivatisierung allergenspezifischer Antikörper

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Reaktionen zur Fusion der antigenbindenden Einheit mit der assaykompatiblen Detektionseinheit über Aminierungsreaktionen sollte in diesem Abschnitt das Potential der Methode der Haptenderivatisierung für die Realisierung eines auf avianen Immunglobulinen basierenden Standardreagenzes mit adaptierter Spezifität evaluiert werden.

Bei der Methode der Haptenderivatisierung werden die für einen immunologischen oder allergologischen Assay vorgesehenen Antikörper in einem ersten Schritt mit einem Hapten markiert. Die derivatisierten Immunglobuline können dann mit einem haptenspezifischen Sekundärantikörper detektiert und nachgewiesen werden. Wird als Sekundärantikörper ein Antikörper humanen Ursprungs verwendet, so gelingt beispielsweise die Adaption für einen Assay in der humanen Allergologie. Der hier verfolgte Weg basierte auf der Modifikation der Antikörper mit dem niedermolekularen Hapten 2,4,6-Trinitrobenzol und Abkömmling des Sprengstoffs TNT (2,4,6-Trinitrotoluol). Im Folgenden wurden zwei verschiedene Wege zur Umsetzung dieses Ansatzes analysiert.

Unselektive Haptenderivatisierung avianer Immunglobuline

Die Markierung der durch Immunisierung gewonnenen IgY sollte durch den Umsatz mit dem Reagenz 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS), wie in 3.1.7 beschrieben, erzielt werden. Dieses Sprengstoff analoge Benzolderivat sollte sich ob seiner inhärenten selektiven Reaktivität gegenüber Nucleophilen (insbesondere Stickstoff-

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

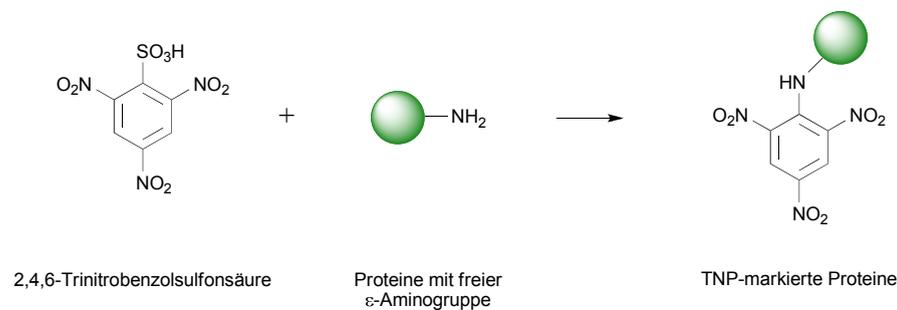


Abbildung 4.22: Schematische Darstellung der Reaktion von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure mit den Aminogruppen von Proteinen

Nucleophilen) durch die Sulfonsäure als Abgangsgruppe und den zusätzlichen synergistischen –M-Effekt der aromatischen Nitrofunktionalitäten sehr gut für eine derartige Modifizierung der Antikörper einsetzen lassen (siehe Abb. 4.22).

Die Bet v 1a-spezifischen IgY wurden hierzu in leicht basisch gepuffertem Milieu mit einer Lösung aus TNBS zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit aminhaltigem Tris-Puffer zur Umsetzung des nicht reagierten überschüssigen TNBS versetzt und anschließend durch Gelfiltration von Salzen und Nebenprodukten getrennt. Nach Reaktion der Antikörper mit TNBS wurde deren Reaktivität gegenüber dem Allergen Bet v 1a im Vergleich zu unmarkierten IgY kontrolliert und die erfolgreiche TNP-Derivatisierung mit spezifischen, homodimeren Antikörperkonstrukten des humanen Isotyps E analysiert. In Abb. 4.23 sind die Ergebnisse der ELISA-Analysen dargestellt. Die Untersuchungen zeigen, dass aviane IgY erfolgreich mit dem Derivatisierungsreagenz TNBS unter Einführung der Trinitrophenylgruppe umgesetzt werden konnten. Obwohl die Detektion der Haptenmarkierung mit dem spezifischen Antikörper TNP4.8⁵ bei direkter Belegung der Vertiefungen einer ELISA-Platte mit den modifizierten IgY nachgewiesen wurde (Abb. 4.23 A), konnte die Detektion derselben Antikörper nach Bindung an immobilisiertes Allergen nicht gemessen werden (Abb. 4.23 B). Aus diesem Grunde musste eine Einschränkung der Funktionalität der Paratope in Betracht gezogen und eine alternative Strategie gesucht werden.

Selektive Haptenderivatisierung avianer Immunglobuline

Die selektive Modifikation eines Antikörpers im Fc-Bereich der konstanten schweren Ketten über die Glycostrukturen konnte bereits in 4.4.2 demonstriert werden.

⁵TNP-spezifischer, homodimerer Antikörper des humanen Isotyps E

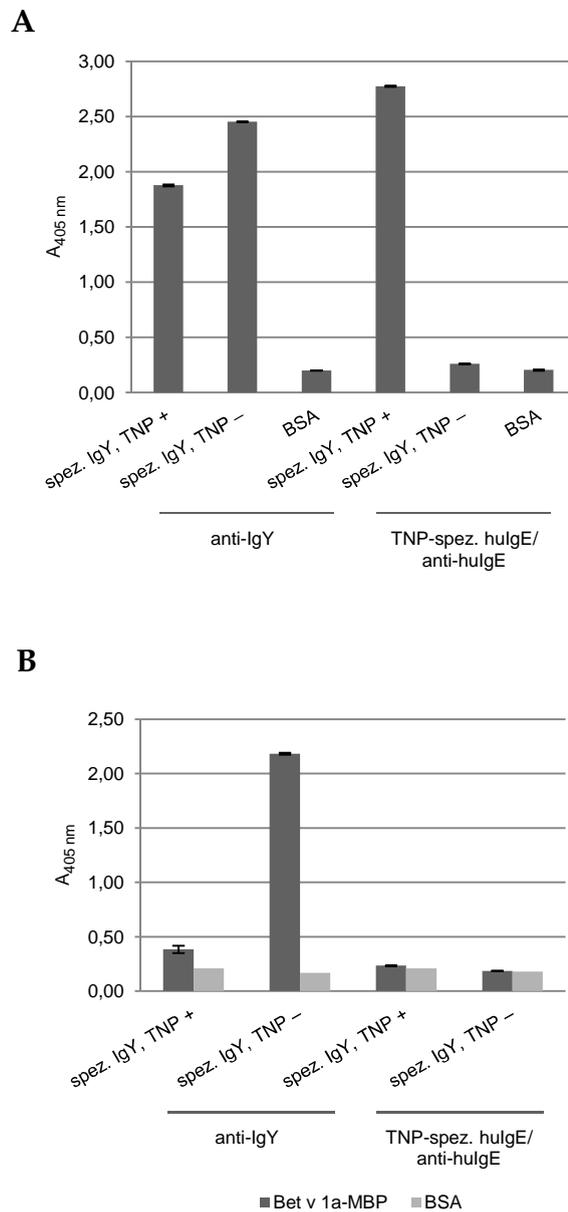


Abbildung 4.23: ELISA-Analysen zur Untersuchung der Haptenmodifizierung Bet v 1a-spezifischer IgY unter Funktionalitäts- und Spezifitätserhalt. (A) Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L der durch Umsatz mit TNBS markierten (TNP +) bzw. der unbehandelten (TNP -) Bet v 1a-spezifischen (spez.) IgY-Antikörper (100 μ g/mL) belegt und mit 2% BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen AP-konjugierten anti-IgY (1:2000 in 2% BSA/PBS) bzw. mit dem monoklonalen TNP-spezifischen hulgEC_H2-4 (ÜS, 1:10 in 2% BSA/PBS). In letzterem Fall erfolgte nachfolgend und zusätzlich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-hulgE-AP (1:2000 in 2% BSA/PBS). In der Analyse (B) wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit je 30 μ L Bet v 1a-MBP (100 μ g/mL) belegt und mit 2% BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den unbehandelten (TNP -) bzw. TNP-markierten (TNP +) spezifischen IgY. Als Sekundärantikörper wurde der polyklonale AP-konjugierte anti-IgY (1:2000 in 2% BSA/PBS) bzw. der monoklonale TNP-spezifische hulgEC_H2-4 (ÜS, 1:10 in 2% BSA/PBS) eingesetzt. In letzterem Fall erfolgte nachfolgend und zusätzlich die Inkubation mit dem Tertiärantikörper anti-hulgE-AP (1:2000 in 2% BSA/PBS). In beiden Analysen erfolgte die Detektion durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 2% BSA in PBS verwendet.

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

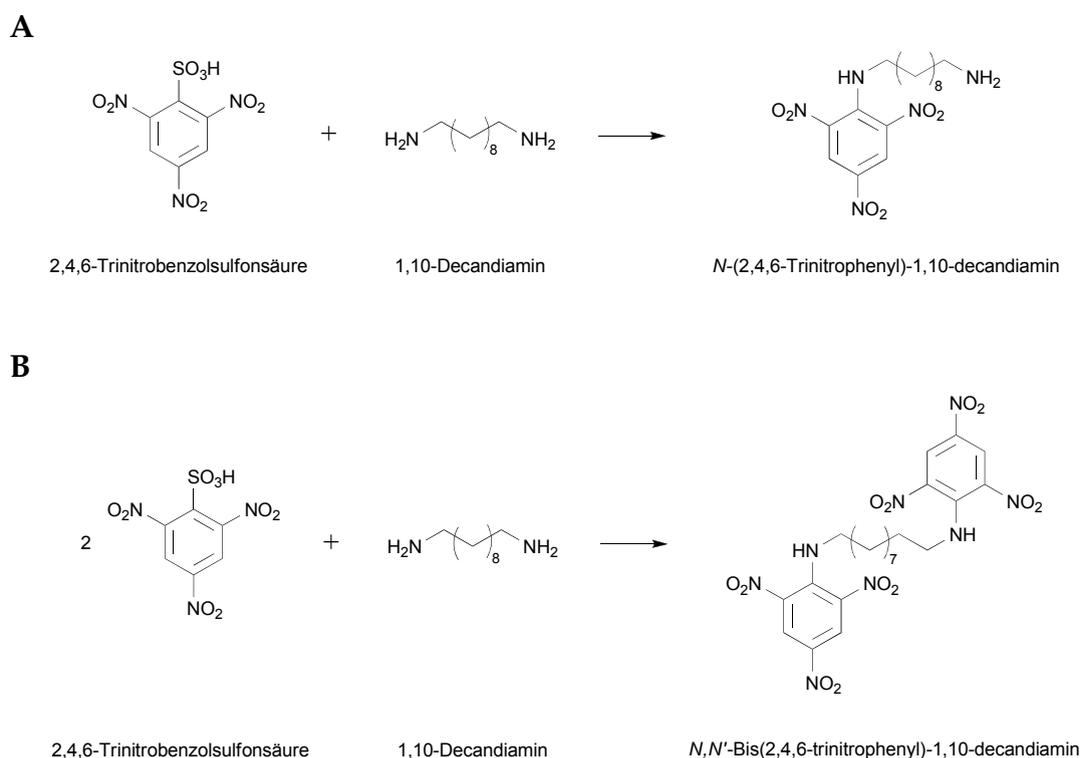


Abbildung 4.24: Schematische Darstellung der Reaktion von 1,10-Decandiamin mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure. (A) Reaktion zum gewünschten Produkt N-(2,4,6-Trinitrophenyl)-1,10-decandiamin, (B) Reaktion zum Nebenprodukt N,N'-Bis(2,4,6-trinitrophenyl)-1,10-decandiamin.

Auf der Basis der MALAPRADE-Oxidation mit anschließender nucleophiler Substitution sollte eine selektive TNP-Derivatisierung der avianen IgY unter Erhalt der Paratopfunktionalität erzielt werden. Da durch MALAPRADE-Oxidation bereits die Aldehydfunktion seitens der Fc-Fragmente der Immunglobuline zur Verfügung standen, musste die für die Ausbildung der Iminbrücken notwendige Aminogruppe hierbei durch das Derivatisierungsreagenz präsentiert werden. Ausgehend von der Sulfonsäure TNBS sollte ein geeignetes Reagenz, das sowohl die Trinitrophenylgruppe als auch eine terminale Aminofunktion beherbergt, durch Reaktion mit dem bifunktionellen Amin 1,10-Decandiamin erhalten werden (s. Abb. 4.24).

Wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, wurde TNBS in wässriger carbonatgepufferter Lösung im Überschuss mit dem Diamin umgesetzt. Die massenspektrometrische Analyse mit Hilfe der Elektrosprayionisierung im positiven Modus bestätigte die Reaktion zu dem gewünschten Produkt mit einer berechneten Masse von 384.19 g/mol (s. Abb. 4.25). Das entsprechende Nebenprodukt, bei dem jede der terminalen Aminogruppen des Diamins an je einem Trinitrophenylrest gebunden ist und das für die TNP-Derivatisierung unbrauchbar ist, entstand hierbei zu weniger als 2%.

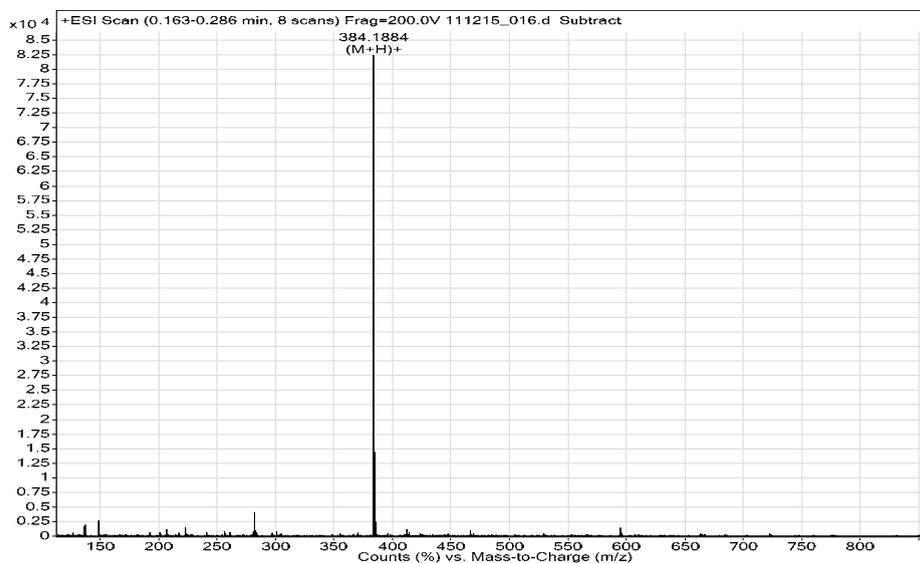


Abbildung 4.25: Massenspektrometrische Analyse des Produktgemisches nach Reaktion von TNBS mit 1,10-Decandiamin. Die Ionisierung der Probe erfolgte mittels Elektrospray-Verfahren im positiven Detektionsmodus. Die Probe wurde zuvor in Dichlormethan gelöst und dann vermessen.

Zur Markierung der Bet v 1a-spezifischen avianen Antikörper wurden diese zunächst mit Natrium-*meta*-periodat inkubiert, um selektiv am Fc-Fragment vicinale Diolen der Kohlenhydratstrukturen in reaktivere Aldehydfunktionen zu überführen. Die so „aktivierten“ Antikörper konnten dann mit dem zuvor dargestellten Reagenz *N*-(2,4,6-Trinitrophenyl)-1,10-decandiamin (TNPA) über Nacht inkubiert werden. Der Erfolg der Fc-selektiven Derivatisierung der Immunglobuline wurde dann im ELISA untersucht. Hierzu wurden die unbehandelten und die markierten Antikörper direkt auf der Oberfläche einer ELISA-Platte immobilisiert. Die Abbildung 4.26 (A) zeigt die erhaltenen Ergebnisse: IgY konnten sowohl in neutralem als auch leicht basischem pH-Bereich erfolgreich am Fc-Part mit TNPA modifiziert werden, wobei ein neutrales Milieu zugunsten der Derivatisierungseffizienz vorzuziehen ist. Eine weitere ELISA (Abb. 4.26 B) zeigt den Nachweis der Biotinylierung spezifischer Antikörper anstelle der direkten via allergenvermittelter Immobilisierung. Danach verlief die Modifizierung durch Anknüpfen des Biotins nicht nur effizient, sondern auch unter Erhalt der Paratopfunktionalität des Immunglobulins. Darüber hinaus wurde die Epitop-Paratop-Wechselwirkung zwischen immobilisierten IgY und IgY-spezifischem Sekundärantikörper nicht nachteilig beeinflusst; der Fc-Bereich der Antikörper blieb damit strukturell erhalten (s. Abb. 4.28). Die Modifizierung der Bet v 1a-spezifischen Antikörper gelang sogar auch in Anwesenheit des Proteins BSA, das sich häufig als stabilisierendes Additiv in Proteinproben findet, und dem bakteriostatischen Agens Natriumazid (s. Abb. 4.27). Beide Zusätze stören sehr häufig modifizierende Reaktionen und müssen daher entfernt

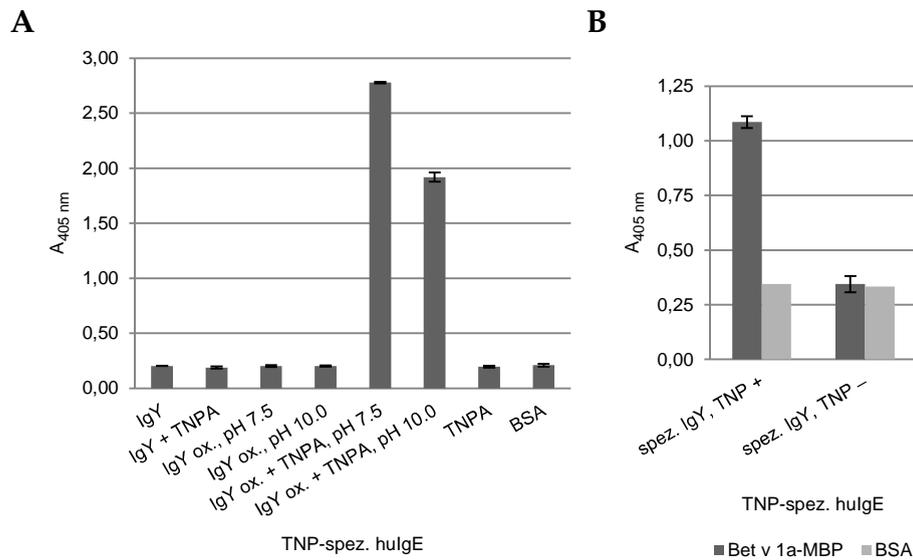


Abbildung 4.26: ELISA-Analyse zur Überprüfung der Haptenderivatisierung Bet v 1a-spezifischer Antikörper. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L naiver IgY (100 μ g/mL), die zuvor einer Glykolspaltung mittels Natrium-*meta*-periodat und/oder einer Inkubation mit TNPA unterzogen wurden, belegt und mit 2% BSA in PBS blockiert (A). Parallel wurden weitere Vertiefungen der ELISA-Platte mit je 30 μ L Bet v 1a-MBP (100 μ g/mL) belegt, mit 2% BSA in PBS blockiert und mit den durch Periodat gespaltenen und TNP-markierten (TNP +) bzw. unbehandelten (TNP -) spezifischen IgY inkubiert (B). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen TNP-spezifischen huIgE_{CH2-4} (ÜS, 1:10 in 2% BSA/PBS). Als Sekundärantikörper wurde der AP-konjugierte anti-huIgE-AP (1:2000 in 2% BSA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 2% BSA in PBS verwendet.

werden.

Nachdem nun durch die erfolgreiche Haptenmodifizierung die Bet v 1a-spezifischen IgY einer assaykompatiblen Detektion mit humaner IgE-Spezifität zugänglich gemacht wurden, sollte die Anwendung der Kombination allergenspezifischer IgY und haptenspezifischer IgE in einem abschließenden ELISA getestet werden. Zu diesem Vorhaben wurde immobilisiertes Allergen zunächst mit den spezifischen, TNP-markierten IgY inkubiert. Die Erkennung des selektiv am Fc-Teil befindlichen Haptens und damit die Adaption der IgY an eine allergologisch relevante IgE-Spezifität erfolgte dann mit dem TNP-spezifischen homodimeren Antikörper TNP4.8-huIgE_{CH2-4} und darauffolgender IgE-Detektion. In Abbildung 4.29 ist der konzentrationsabhängige Reaktivitätsverlauf einer seriellen Verdünnung in Bezug auf die verwendeten spezifischen IgY gezeigt. Diesem ELISA-Experiment liegt eine sequenzielle Anwendung der unterschiedlichen Antikörper zugrunde; eine simultane Inkubation mit einem zuvor inkubierten Gemisch aus IgY und haptenspezifischem Agens erbrachte keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz von Immunglobulinen des Typs Y in einem IgE-spezifischen ELISA konnte somit durch Etablierung einer Haptenmarkierung realisiert werden.

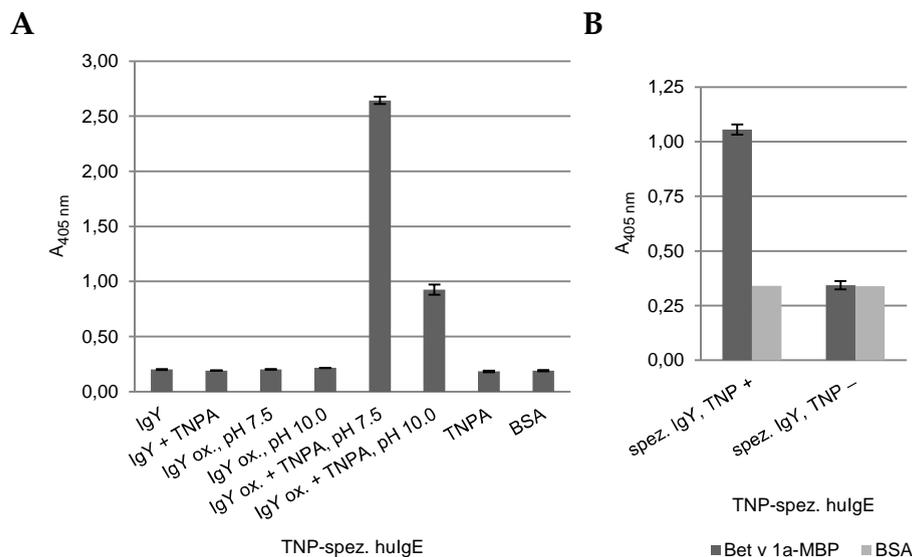


Abbildung 4.27: ELISA-Analyse zur Überprüfung der Haptenderivatisierung Bet v 1a-spezifischer Antikörper in Gegenwart der Additive BSA und Natriumazid. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL naiver IgY (100 µg/mL), die zuvor einer Glykolspaltung mittels Natrium-*meta*-periodat und/oder einer Inkubation mit TNPA in Gegenwart von BSA und Natriumazid unterzogen wurden, belegt und mit 2% BSA in PBS blockiert (A). Parallel wurden weitere Vertiefungen der ELISA-Platte mit je 30 µL Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt, mit 2% BSA in PBS blockiert und mit den durch Periodat gespaltenen und TNP-markierten (TNP +) bzw. unbehandelten (TNP -) spezifischen IgY inkubiert (B). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen TNP-spezifischen hulGE_{H2-4} (ÜS, 1:10 in 2% BSA/PBS). Als Sekundärantikörper wurde der AP-konjugierte anti-hulGE-AP (1:2000 2% BSA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 2% BSA in PBS verwendet.

4.4.4 Kopplung zweier Antikörper durch Ausnutzung der Streptavidin-Biotin-Bindungs-Charakteristik

In den vorangehenden Abschnitten konnten unterschiedliche Konzepte zur Verknüpfung der Allergenspezifität mit der aus dem immunologisch-allergologischen Kontext geforderten Immunglobulinspezifität vorgestellt werden. Bei diesen Ansätzen wurde zwischen kovalenter und nicht-kovalenter, d. h. auf elektrostatischer Wechselwirkung beruhender Verknüpfung unterschieden. Ein weiterer Ansatz, der eine Sonderstellung einnimmt, nutzt das System Biotin-Streptavidin. Die Wechselwirkung des Vitamins Biotin mit dem homotetrameren Protein Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* ist rein elektrostatischer Natur. Jedoch liegt die Dissoziationskonstante (K_D) in der Größenordnung von 4×10^{-14} M [155] und ist damit eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen. Durch Anfügen von Biotin an allergenspezifische Antikörper einerseits und der Detektion dienenden Immunglobuline andererseits sollten beide Komponenten durch Streptavidin verbunden werden. Analog zu den Haptenmarkierungen (s. Kap. 4.4.3) und gemeinhin bei chemischen Antikörpermodifikationen kann auch hier zwischen einer selektiven und einer unselektiven Biotinylierung unterschieden werden. Beide Varianten wurden

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

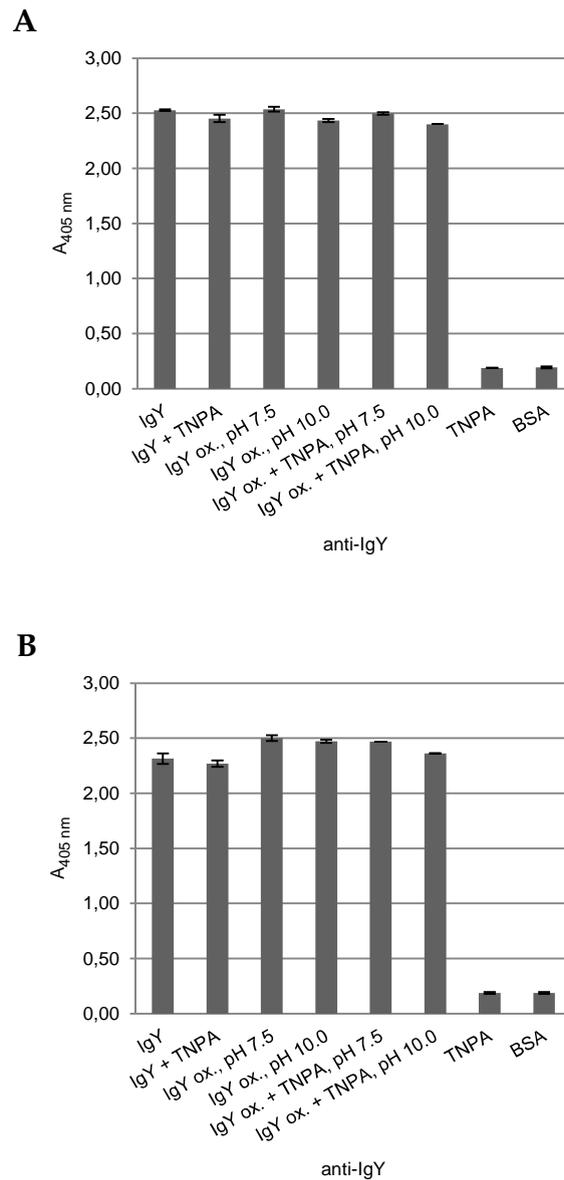


Abbildung 4.28: ELISA-Analyse zur Überprüfung des Erhalts des Fc-Parts der IgY-Antikörper nach Haptenderivatisierung. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL naiver IgY (100 µg/mL), die in Ab- (A) bzw. Anwesenheit (B) der Zusätze BSA und Natriumazid zuvor einer Glykolspaltung mittels Natrium-*meta*-periodat und/oder einer Inkubation mit TNPA unterzogen wurden, belegt und mit 2% BSA in PBS blockiert. Darauf folgte ein Inkubationsschritt mit dem polyklonalen AP-konjugierten anti-IgY (1:2000 in 1% PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1% PVA in PBS verwendet.

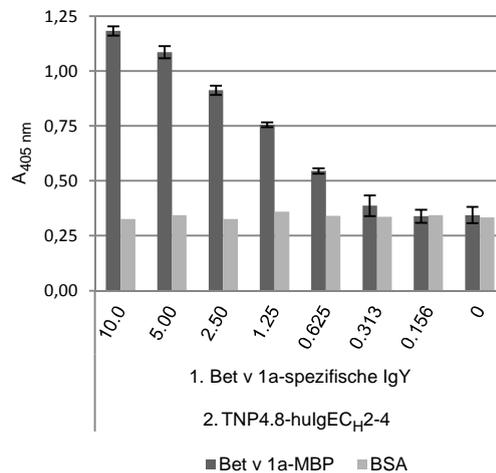


Abbildung 4.29: ELISA-Analyse zur Realisierung des Einsatzes spezifischer IgY durch Adaption an eine allergologisch relevante IgE-Spezifität durch Fc-selektive Hapten-Markierung. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt und mit 2 % BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die sequenzielle Inkubation mit je 30 µL der TNP-modifizierten, Bet v 1a-spezifischen IgY in einer seriellen Verdünnungsreihe (x-Achse: Konzentrationen in µg/mL) und dem TNP-spezifischen homodimeren TNP4.8-huIgEC_H2-4. Als Tertiäranantikörper wurde der AP-konjugierte anti-huIgE (1:2000 in 2 % BSA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Als Kontrolle wurden 2 % BSA in PBS verwendet.

im Folgenden mit den Bet v 1a-spezifischen avianen IgY und einer polyklonalen Fraktion humaner Immunglobuline des Typs G analysiert. Anstelle humaner IgE-Antikörper bzw. einer humanen IgE-Spezifität wurden für die nachfolgenden Experimente humane IgG verwendet, um das vorgestellte Konzept zu evaluieren. Dies begründet sich in der Verfügbarkeit humaner IgG, da sie natürlicherweise mit einer wesentlich höheren Konzentration als IgE vorkommen. Rekombinante IgE-Varianten zeigen in der Regel ebenfalls eine geringere Expression als IgG. Die Evaluation und Beurteilung des Ansatzes per se als Konzept zur Generierung eines Referenzserums kann dennoch vorgenommen werden, da er nicht von der gewählten Detektionsspezifität abhängig ist.

Unselektive Biotinylierung von Immunglobulinen

Die Palette verschiedenster Reagenzien zur Biotinylierung von Immunglobulinen oder allgemein von Proteinen und Peptiden ist nahezu unerschöpflich. Neben einer Reihe selektiver (amino-, sulfhydryl-, carbonyl- oder carboxylspezifischer) Biotinylierungsreagenzien existieren ihrer einfachen Anwendung wegen attraktive, wenn auch unselektive Reagenzien. Ein sehr gängiges und häufig eingesetztes Agens ist das photoinduzierbare über einen Polyethylenglycollinker mit einem fluorierten Azidoaromaten verbundene Biotinylierungsreagenz TFPA-PEG₃-Biotin⁶

⁶EZ-Link® TFPA-PEG₃-Biotin (Thermo Scientific)

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

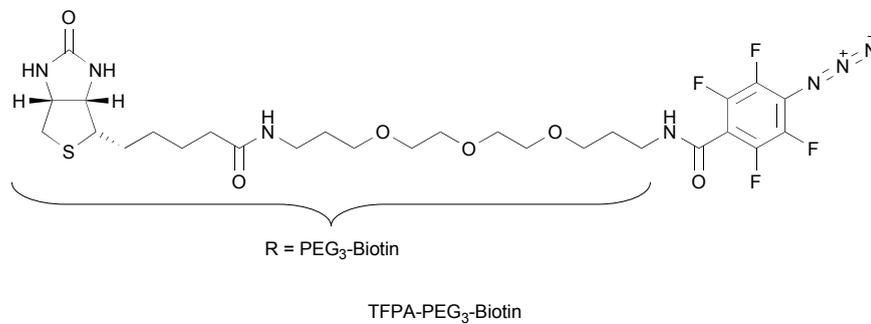


Abbildung 4.30: Strukturformel des kommerziellen Biotinylierungsreagenzes EZ-Link[®] TFPA-PEG₃-Biotin.

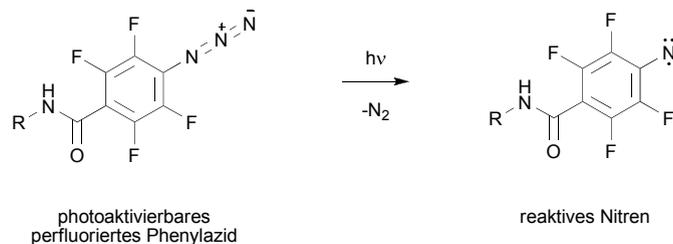


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung der Aktivierung des Biotinylierungsreagenzes EZ-Link[®] TFPA-PEG₃-Biotin durch Photoinduktion im ultravioletten Spektralbereich.

(s. Abb. 4.30). Bei Bestrahlung im ultravioletten Spektralbereich entsteht durch Absplittung von Stickstoff aus dem Tetrafluorazidophenylrest ein äußerst reaktives Nitren (Elektronensextett), das in C-H- und N-H-Bindungen insertiert. Der Reaktionsverlauf ist in den Abbildungen 4.31 und 4.32 vereinfacht dargestellt. Das *in situ* erzeugte Arylnitren kann auf zwei Wegen zu Insertionsreaktionen führen. Liegt dieses direkt nach Bestrahlung im ultravioletten Spektrum im thermodynamisch ungünstigeren Singulettzustand vor, findet eine direkte Insertion des Nitrens in eine C-H-Bindung statt (nicht gezeigt). Über den Umweg einer Spinumkehr via *intersystem crossing* [156] erhält das Arylnitren im favorisierten Triplettzustand [157] diradikalischen Charakter und kann im Sinne einer Pseudoinserterung durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms und anschließender Verknüpfung zweier Radikale zu demselben Produkt führen.

Zur Durchführung der unselektiven Biotinylierung der Bet v 1a-spezifischen Antikörper und der humanen IgG wurden diese, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, mit dem photoaktivierbaren Reagens TFPA-PEG₃-Biotin unter Bestrahlung im ultravioletten Spektralbereich in phosphatgepufferter Lösung inkubiert. Mit Hilfe einer zentrifugierbaren Ultrafiltrationseinheit wurden nicht umgesetztes Reagens abgetrennt und die Probe auf das gewünschte Volumen eingestellt. Der Erfolg der Biotinylierung der Immunglobuline wurde dann in einem ELISA analysiert. Die spezifischen IgY wurden hierzu im Vergleich mit unmarkierten Bet v 1a-spezifischen

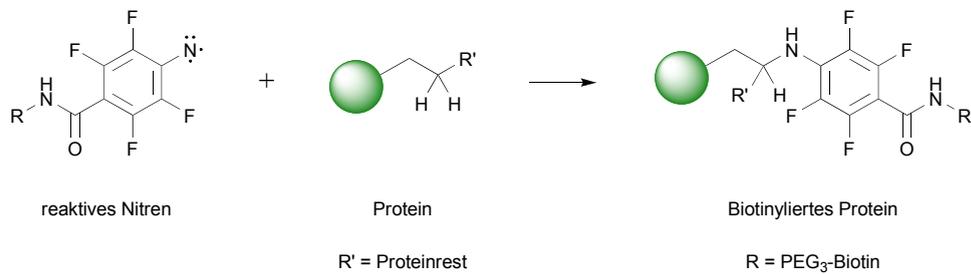


Abbildung 4.32: Schematische Darstellung der Reaktion des via Photoinduktion aktivierten Biotinylierungsreagenzes EZ-Link® TFPA-PEG₃-Biotin. Die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht im Bereich von 300 nm bis 370 nm induziert die Abspaltung eines Stickstoffmoleküls der perfluorierten Phenylazidfunktion. Das resultierende äußerst reaktive Nitren inseriert dann in C-H- und N-H-Bindungen.

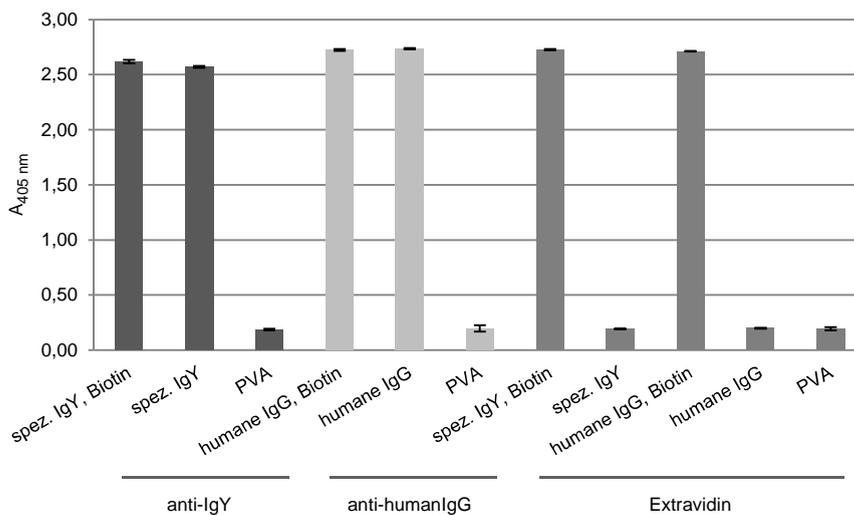


Abbildung 4.33: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Modifikation mit Biotin. (A) Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL (100 µg/mL) der mit TFPA-PEG₃-Biotin umgesetzten bzw. unbehandelten Bet v 1a-spezifischen oder humanen IgG-Antikörpern belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Als Detektionsantikörper wurden sowohl die Fc-spezifischen, AP-konjugierten anti-IgY (1:2000 in 1 % PVA/PBS) und anti-huIgG (1:20000 in 1 % PVA/PBS) als auch AP-markiertes Extravidin (1:70000 in 1 % PVA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

IgY hinsichtlich der Detektion des Fc-Teils bzw. der Biotin-Einheit getestet. In den Abbildungen 4.33 und 4.34 sind die Ergebnisse der ELISA-Analysen dargestellt. Die Untersuchungen zeigen, dass bei direkter Immobilisierung der Antikörper mit anti-IgY bzw. anti-huIgG eine Fc_γ- bzw. Fc_γ-spezifische Detektion einerseits und mit Extravidin eine biotinspezifische Detektion andererseits erzielt werden konnte. Wurden die Bet v 1a-spezifischen Antikörper bezüglich ihrer Allergenspezifität nicht direkt, sondern über die Bindung an immobilisiertes Allergen gebunden, so konnte ebenfalls eine spezifische Detektion der IgY beobachtet werden. Beide ELISA-Analysen zeigen, dass die Antikörper durch Verwendung des photoaktivierbaren Reagenzes TFPA-PEG₃-Biotin unter Bewahrung sowohl der Paratop- als auch Fc-Funktionalität kovalent mit Biotin modifiziert werden konnten.

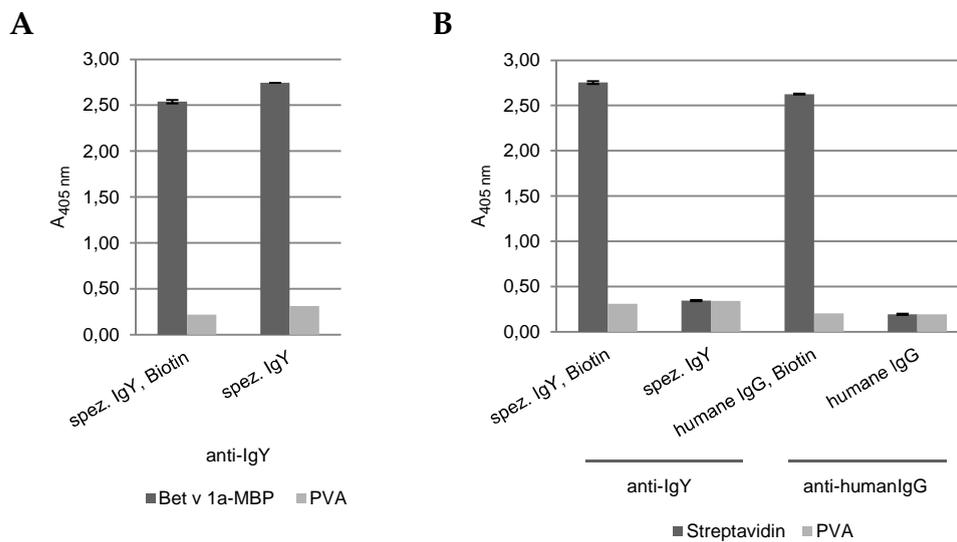


Abbildung 4.34: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Modifikation mit Biotin. (A) Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL (100 µg/mL) der mit TFPA-PEG₃-Biotin umgesetzten bzw. unbehandelten Bet v 1a-spezifischen IgY oder humanen IgG-Antikörpern belegt und mit 1% PVA in PBS blockiert. In der Analyse (B) wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit je 30 µL Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt und mit 1% PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den durch TFPA-Inkubation biotinylierten bzw. unbehandelten Bet v 1a-spezifischen IgY oder humanen IgG-Antikörpern. In beiden Analysen wurden als Detektionsantikörper die Fc-spezifischen AP-konjugierten Antikörper anti-IgY (1:2000 in 1% PVA/PBS) und anti-huIgG (1:20000 in 1% PVA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1% PVA in PBS verwendet.

Selektive Biotinylierung von Immunglobulinen

Die Modifikation der Antikörper durch kovalente Bindung an Biotin sollte durch Oxidation nach MALAPRADE selektiv im Fc-Bereich der konstanten schweren Ketten erfolgen. Geeignete Reagenzien für die Kopplung mit den am Antikörper generierten Aldehydgruppen besitzen idealerweise Amino- oder Hydrazingruppen und erlauben die Ausbildung von Iminbrücken. Das hier gewählte Reagenz (+)-Biotinamidocaproylhydrazid (BACH) ist ein Carbonsäurehydrazid und zeichnet sich im Gegensatz zu den unreaktiven Analoga der Carbonsäureamide durch eine starke Nucleophilie der terminalen Aminofunktion aus. Der Vorzug des Einsatzes eines Carbonsäurehydrazids ist der im Vergleich zu primären Aminen im sauren Bereich liegende pK_S-Wert. Hydrazide sind damit mittelstarke Säuren und besitzen typischerweise pK_S-Werte in der Größenordnung von 2–3. Kopplungsreagenzien mit sauren pK_S-Werten haben den Vorteil, die Reaktivität des Nucleophils bei pH-Werten um 4–5 zu gewährleisten. Hierdurch wird bei Proteinen, die ihren isoelektrischen Punkt im neutralen bis basischen pH-Milieu besitzen, das Gleichgewicht zugunsten der protonierten Form der Aminogruppe verschoben, so dass diese für einen nucleophilen Angriff praktisch nicht mehr oder nur in sehr geringem Ausmaß zur Verfügung stehen. In der Abbildung 4.35 ist die schematische Darstellung

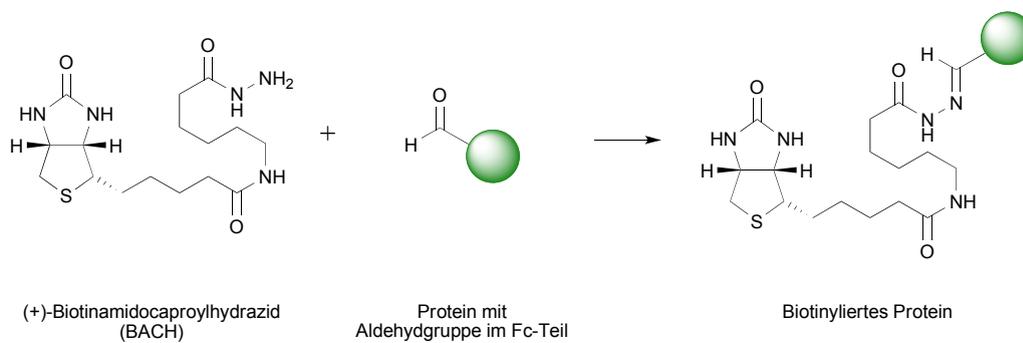


Abbildung 4.35: Schematische Darstellung der Reaktion von (+)-Biotinamidocaproylhydrazid (BACH) mit selektiv im Fc-Teil oxidierten Antikörpern.

der Reaktion des BACH-Reagenzes mit einem selektiv im Fc-Bereich oxidierten Antikörper gezeigt. In Abhängigkeit des pH-Wertes führt die inhärente Nucleophilie des als Säurehydrazid vorliegenden Biotinderivates zu einem Angriff am elektrophilen Kohlenstoffatom der im Fc-Teil generierten Aldehydfunktionen. Die Umlagerung von Protonen und die Abspaltung von Wasser komplettieren die Reaktion und führen zur SCHIFF'schen Base. Die Bildung der Iminbrücke verknüpft Antikörper und Biotin kovalent miteinander.

Für die Biotinylierung der spezifischen avianen und der humanen Antikörper wurden diese zunächst einer Glycolspaltung durch Natrium-*meta*-periodat unterzogen. Nach Abtrennen nicht umgesetzten Periodats wurden die Antikörper in gepufferter Lösung bei zwei unterschiedlichen pH-Werten mit dem BACH-Reagenz zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Reaktionslösungen gegen PBS dialysiert und die Biotinylierung der Immunglobuline im ELISA-System überprüft. Zu diesem Zweck wurden die modifizierten als auch die unbehandelten Antikörper auf einer ELISA-Platte direkt immobilisiert. Die Abbildung 4.36 zeigt die beobachteten Reaktivitäten. Durch Detektion der direkt immobilisierten Antikörper mittels AP-konjugiertem Extravidin konnte die Biotinylierung beider Immunglobulinfraktionen bestätigt werden. Die isotypspezifische Erkennung zeigte keine messbare Beeinträchtigung der Wechselwirkung zwischen Antikörper und jeweiligem Sekundärantikörper. In einem zweiten ELISA konnte die Biotinylierung der spezifischen IgY auch bei allergenvermittelter Immobilisierung nachgewiesen werden, wodurch zusätzlich die erfolgreiche Modifikation unter Erhalt der Paratopfunktionalität gezeigt wurde (s. Abb. 4.37).

Den vorangestellten ELISA-Analysen zur Charakterisierung der biotinylierten Komponenten der polyklonalen Bet v 1a-spezifischen avianen Antikörper und der polyklonalen naiven humanen Immunglobuline der Klasse G sollte sich nun ein fina-

4.4 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch modifizierte Antikörper

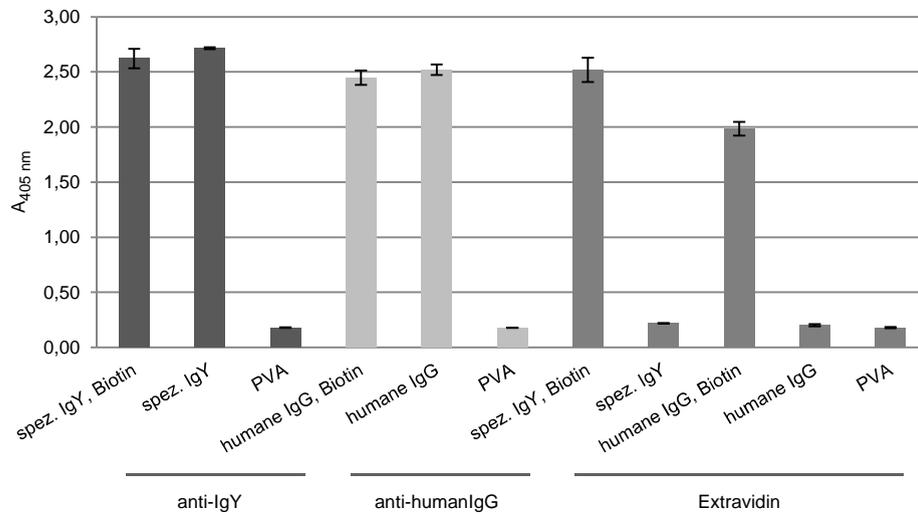


Abbildung 4.36: ELISA-Analyse zur Untersuchung der selektiven Biotinylierung. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) der nach MALAPRADE oxidierten und mit dem Reagenz BACH umgesetzten bzw. unbehandelten Bet v 1a-spezifischen IgY bzw. humanen IgG-Antikörpern belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend wurde mit den Fc-spezifischen, AP-konjugierten Antikörper anti-IgY (1:2000 in 1 % PVA/PBS) bzw. anti-humanIgG (1:20000 in 1 % PVA/PBS) oder dem biotinspezifischen AP-Konjugat Extravidin (1:70000 in 1 % PVA/PBS) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Als Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

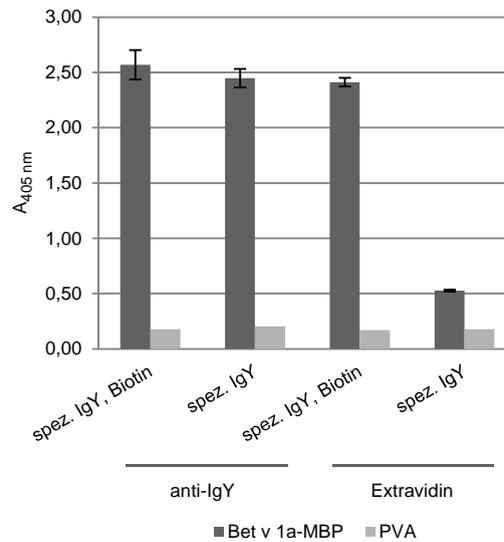


Abbildung 4.37: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität Bet v 1a-spezifischer IgY nach Biotinylierung mit Hilfe des BACH-Reagenzes. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) des zu detektierenden Antikörpers belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Als Detektionsantikörper wurden der polyklonale AP-konjugierte IgY (1:2000 in 1 % PVA/PBS) bzw. Extravidin-AP (1:70000 in 1 % PVA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Als Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

les ELISA-Experiment zur Demonstration der Anwendung einer über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung kombinierte Allergen- und Isotypspezifität anschließen. Hierzu wurden die biotinylierten Komponenten sowie das quervernetzende Protein Streptavidin sowohl in einer sequentiellen als auch einer parallelen Inkubation eingesetzt. Die parallele Vorgehensweise bei der Inkubation ging aus der Überlegung hervor, mit dem Kombinationsreagenz die allergenspezifische Komponente in einem Schritt und in Analogie zu herkömmlichen diagnostischen Assays anzuwenden. Da Streptavidin bis zu vier Moleküle des Vitamins Biotin binden kann, können jedoch unterschiedliche Zusammensetzungen hinsichtlich der an Streptavidin gekoppelten Antikörper hervorgehen. Um diesen Aspekt näher zu betrachten, wurde überdies ein sequentieller Inkubationsansatz verfolgt, der zunächst die Inkubation des immobilisierten Allergens Bet v 1a-MBP mit den spezifischen, biotinylierten IgY vorsah. Anschließend wurde mit zwei Streptavidinkonzentrationen inkubiert, woran sich endlich die Inkubation mit den biotinylierten, humanen IgG-Antikörpern anschloss.

Die Ergebnisse beider ELISA-Analysen sind in Abbildung 4.38 dargestellt. Der sequentielle Ansatz zeigt, dass für zwei verschiedene Konzentrationen ausreichend Streptavidin an die bereits über das immobilisierte Allergen gebundenen avianen Antikörper gekoppelt werden konnte, so dass die nachfolgende Belegung mit biotinylierten humanen IgG die isotypspezifische Detektion erlaubte. Weiter wurde beobachtet, dass eine höhere Konzentration an Streptavidin eine schnellere Immobilisierung desselben erzielte. Für den parallelen Ansatz wurden die biotinylierten spezifischen IgY- und die biotinylierten humanen IgG-Antikörper zuvor in äquimolarem Verhältnis gemischt. Nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Streptavidin wurde das Gemisch zur Inkubation mit dem immobilisierten Allergen eingesetzt. Die Konzentration des Streptavidins wurde in äquimolarem sowie 5fachem und 10fachem molarem Überschuss eingesetzt. Die humanIgG-spezifische Detektion ergab den gezeigten Verlauf (s. Abb. 4.38 B). Höhere Konzentrationen des verknüpfenden Proteins resultierten in verstärkten Signalintensitäten. Danach konnte die Anwendung der via Streptavidin verknüpften allergenspezifischen Einheit mit der assaykompatiblen Detektionseinheit in Analogie zu diagnostischen Assays, d. h. in einem Schritt erfolgreich durchgeführt werden.

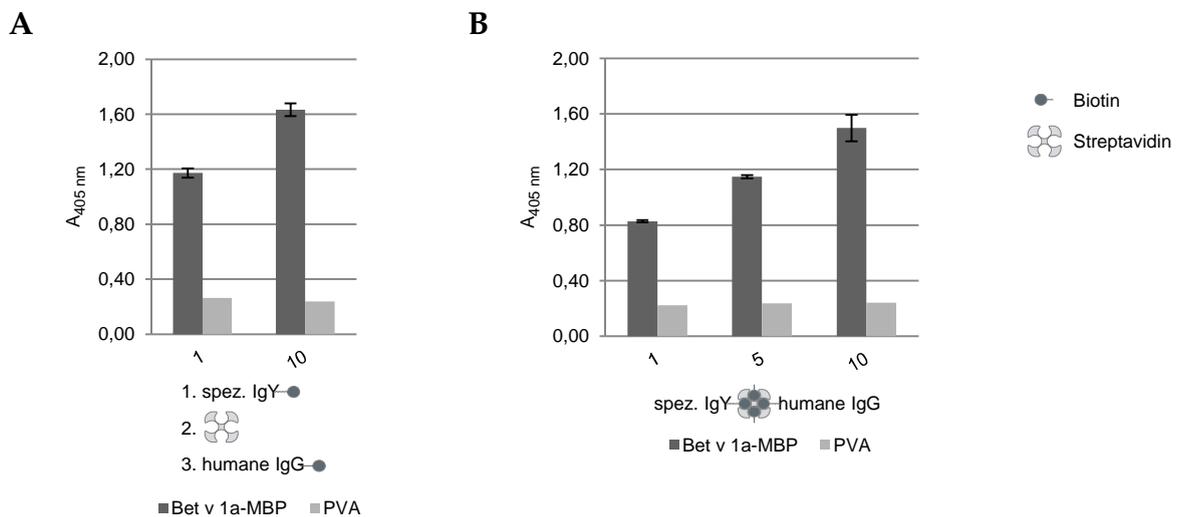


Abbildung 4.38: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität eines über die Streptavidin-Biotin-Interaktion kombinierten Reagens aus allergenspezifischen IgY und humanen IgG. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL rekombinanten Bet v 1a-MBP (100 µg/mL) belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die (A) sequentielle bzw. (B) parallele Inkubation mit einer Kombination der biotinylierten allergenspezifischen IgY und den biotinylierten humanen IgG sowie Streptavidin in variierten Konzentrationen. Als sekundärer Antikörper wurde in beiden ELISA der anti-humanIgG (1:10 000 in 1 % PVA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

4.5 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch genetische Fusion

4.5.1 Darstellung eines rekombinanten verkürzten humanen Fc-Fragmentes mit Spezifität für IgY/FcY

Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Konzepten zur Verknüpfung der antigenspezifischen Einheit mit einer Assay kompatiblen Detektionseinheit, sollte in diesem Ansatz die Generierung eines geeigneten Assayreagenzes mittels genetischer Fusion erzielt werden. Diese besitzt den Vorteil, die Verbindung beider Zielkomponenten bereits auf genetischer Ebene und damit unabhängig von chemischen Modifikationen zu realisieren. Die Etablierung eines solchen Standardreagenzes sollte in Hinblick auf die Detektionseinheit zunächst auf Grundlage der für eine Allergie relevanten Immunglobuline des Isotyps E erfolgen. Die Gestaltung der zweiten Komponente sollte derart vollzogen werden, dass auf eine Modifikation der einzusetzenden spezifischen avianen Antikörper (IgY) und eine damit möglicherweise verbundene Beeinträchtigung der Funktionalität derselben verzichtet werden kann. Diese Voraussetzungen legten eine Vorgehensweise nahe, auf natürliche Proteine zurückzugreifen, die eine hohe Spezifität für Immunglobuline besit-

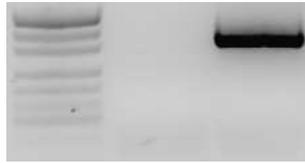


Abbildung 4.39: Gelelektrophoretische Analyse der Amplifikation der DNA-Sequenz des gallinen Immunglobulin-ähnlichen Rezeptors AB1 (CHIR-AB1). Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide CHIR-AB1 SmiI for und CHIR-AB1 SgsI back verwendet und die PCR bei einer *annealing*-Temperatur von 56 °C durchgeführt. Die Analyse erfolgte in einem 1%igen Agarosegel mittels Ethidiumbromidfärbung und UV-Illumination. Bahn 1: pUC19 DNA/*Msp* I-Standard, Bahn 2: Negativkontrolle, Bahn 3: CHIR-AB1 ecd.

zen. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die Fc-Rezeptoren, von denen einige zu der Immunglobulin-Superfamilie gehören. Als Antigen-spezifische Einheit, d. h. mit Spezifität für IgY bzw. FcY, wurde der auf dem avianen Leukozyten-Rezeptor-Cluster (LRC) codierte und auf Hühner-Monozyten präsentierte Rezeptor CHIR-AB1 [158] verwendet.

Amplifikation und Klonierung der extrazellulären Domäne des *chicken immunoglobulin like receptor* CHIR-AB1

Die Amplifikation der DNA-Sequenz der extrazellulären Domäne des gallinen Immunglobulin-ähnlichen Rezeptors AB1 ohne natürliche Signalsequenz (engl. *chicken immunoglobulin-like receptors*, CHIR-AB1) erfolgte mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotide unter Einführung der Restriktionsschnittstellen *Smi* I⁷ und *Sgs* I⁸. Als Template wurde die bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene cDNA-Sequenz, die durch Isolierung lienaler Gesamt-RNA (Splenocyten) des Haushuhns und spezifische, reverse Transkription erhalten wurde, verwendet. Die Analyse des Amplifikats erfolgte gelelektrophoretisch (s. Abb. 4.39). Das PCR-Produkt des avianen Rezeptors zeigte hierbei die erwartete Größe von ca. 300 bp und wurde mittels Fermentas *GeneJET™ Gel Extraction Kit* isoliert.

Das gereinigte DNA-Fragment wurde anschließend für die Klonierung eines chimären, IgY-spezifischen Fcε-Fragmentes eingesetzt.

Klonierung eines chimären, IgY-spezifischen hulgEC_H2-4-Fragmentes

Zur Darstellung eines Fcε-Fragmentes humanen Ursprungs mit Spezifität für Immunglobuline des Typs Y wurden das im vorangehenden Abschnitt amplifizier-

⁷ Isochizomer: *Swa* I

⁸ Isochizomer: *Asc* I

4.5 Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate durch genetische Fusion



Abbildung 4.40: Schematische Darstellung der Expressionskassette für die Klonierung eines IgY-spezifischen huIgEC_H2-4-Konstruktes in pcDNA3.1+/Zeo

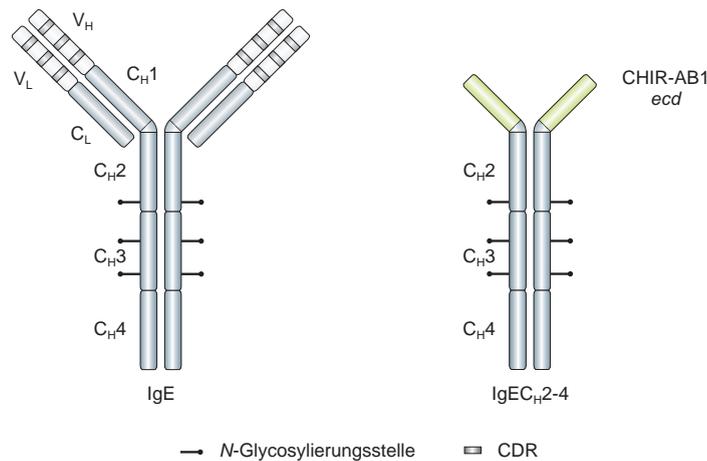


Abbildung 4.41: Schematische Darstellung des humanen Immunglobulins des Typs E im Vergleich zu dem angestrebten Klonierungsprodukt CHIR-AB1-huIgEC_H2-4. Dargestellt sind die schweren (H) und leichten (L) Domänen der konstanten (C) bzw. variablen (V) Ketten der Immunglobuline. Darüber hinaus sind die N-Glycosylierungsstellen sowie die hypervariablen Bereiche (CDR) gekennzeichnet.

te Fragment des avianen Rezeptors CHIR-AB1 und der Expressionsvektor pcDNA3.1 verwendet. Letzterer verfügte über eine Kassette zur Expression homodimerer, C_H1-deletierter humaner IgE-Fragmente und ist für die Produktion löslicher Proteine in HEK-293-Zellen optimiert. Zudem beinhaltet er im 5'-Bereich dieser Kassette ein über die Restriktionsschnittstellen *Smi* I und *Sgs* I fusioniertes scFv. In Abbildung 4.40 ist die gesamte Expressionskassette für die Klonierung des IgY spezifischen Konstruktes in pcDNA3.1+/Zeo dargestellt. Neben einer humanen Signalsequenz (VH3-64-leader, *Homo sapiens*, vgl. Anhang A.2.1) für die Sekretion des Expressionsproduktes in den Kulturüberstand ist auch eine 3'-terminale Sequenz für das Anfügen eines 4fachen Histidin-Tags für die spätere affinitätschromatografische Reinigung zu sehen. Nach Inkubation mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und Entfernen des scFvs wurde der Rezeptor CHIR-AB1 in den Vektor pcDNA3.1+/Zeo subkloniert. Die Insertion des gewünschten Fragmentes wurde mittels *colony*PCR überprüft. Darüber hinaus zeigte die Sequenzierung die korrekte Insertion der DNA-Sequenz im Leserahmen (s. Anhang).

In Abbildung 4.41 ist ein heterotetrameres humanes Immunglobulin des Typs E im Vergleich zu dem chimären, homodimeren Konstrukt aus humanem Fc-Fragment und avianem Rezeptor gezeigt. Letzteres unterscheidet sich von seinem natürlichen

Pendant durch das Fehlen der leichten Kette. Die Spezifität dieses chimären Konstruktes wird hierbei durch den avianen Rezeptor eingeführt, welcher die variable und die erste konstante Domäne der schweren Kette vollständig ersetzt. Wo zuvor jeweils das aus V_L , C_L , V_H und C_{H1} bestehende Fab-Fragment die antigenbindende Einheit des Antikörpers ausmachte, wird diese nun durch den Rezeptor CHIR-AB1 unter Erhalt des bivalenten Charakters repräsentiert.

Der sich anschließende Abschnitt soll im Folgenden die Realisation des chimären IgY-spezifischen Antikörpers durch genetische Fusion und die Expression im mammaliären System behandeln.

Expression des CHIR-AB1-huIgE-Konstruktes

Als Expressionssystem wurden HEK-293-Zellen eingesetzt, bei denen es sich um immortalisierte humane embryonale Zellen der Niere handelt und die damit mammaliären Ursprungs sind. HEK-293-Zellen erlauben im Gegensatz zu prokaryotischen Systemen neben der sekretorischen Produktion löslicher Proteine vor allem auch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise *O*- und *N*-Glycosylierungen an Seryl- bzw. Aspartylresten des Proteins. Da für die Produktion funktionseller, homodimerer Antikörperkonstrukte die korrekte Anordnung zweier identisch gefalteter Peptidketten und deren Stabilisierung über Disulfidbrücken notwendig ist, sind während dieses Prozesses definierte Milieus in der Zelle entscheidend. Die verwendeten HEK-293-Zellen stellen auch für diese Anforderungen das geeignete Expressionssystem dar.

Zur Produktion des homodimeren Antikörperkonstruktes CHIR-AB1-huIgE_{C_H2-4} wurden HEK-293-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und positive Transfektanden durch Inkubation mit dem Antibiotikum Zeocin (Phleomycin) selektiert. Bereits drei Tage nach erfolgter Transfektion konnte in dem Zellkulturüberstand die transiente Expression durch eine ELISA-Analyse nachgewiesen werden. Die transfizierten Zellen wurden zur Stabilisierung und damit zur Integration des Zielgens in das zelleigene Genom weiter unter Zeocin-Selektion kultiviert. In den Kulturüberständen erfolgreich stabilisierter HEK-293-Transfektanden konnte das IgE-Konstrukt mit dem fusionierten IgY-Rezeptor ebenfalls mit Hilfe einer ELISA-Analyse nachgewiesen werden (s. Abb. 4.42).

Des Weiteren zeigte die IgE-spezifische ELISA-basierte Quantifizierung (siehe Abschnitt 3.4.2) eine hocheffiziente Expression des CHIR-AB1-huIgE_{C_H2-4}-Konstruktes

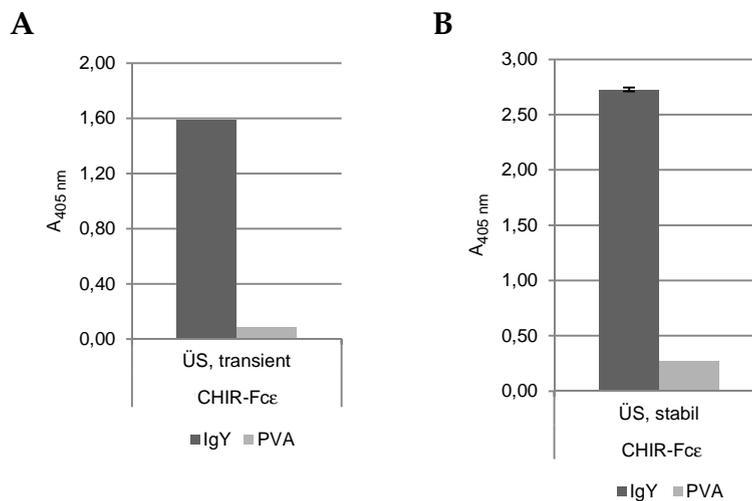


Abbildung 4.42: ELISA-Analyse zur Untersuchung der (A) transienten bzw. (B) stabilen Expression des homodimeren CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4}-Konstruktes (CHIR-Fcε) im Kulturüberstand. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL (100 µg/mL) naiver IgY belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL der Kulturüberstände (ÜS) transfizierter HEK-293-Zellen (A transiente bzw. B stabile Expression). Als Detektionsantikörper wurde der AP-konjugierte monoklonale anti-humanIgE eingesetzt (1:1000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

von 30 µg/mL Überstand. Während der Zellkultivierung wurden die Überstände gesammelt und bei 4 °C gelagert.

Reinigung des CHIR-AB1-hulgE-Konstruktes

Das chimäre Rezeptor-Antikörper-Konstrukt konnte aus den gesammelten und vereinigten Zellkulturüberständen der HEK-293-Expression mit Hilfe einer His-Tag-vermittelten Affinitätschromatographie (Ni-IMAC) isoliert und gereinigt werden. Die Durchführung erfolgte automatisiert mit einem ÄKTaprime™ plus-Gerät unter Verwendung einer HisTrap™-FF-Säule. Entsprechende Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Abbildung 4.43 zeigt das Konstrukt CHIR-AB1-IgEC_{H2-4} nach SDS-PAGE-Analyse und anschließender Coomassie-Färbung bzw. Immunblot.

4.5.2 Spezifität von CHIR-AB1-hulgEC_{H2-4} für IgY

Die aus dem Haushuhn stammende Variante CHIR-AB1 des beschriebenen Leukozytenrezeptors besitzt bekanntermaßen eine Spezifität und hohe Affinität für aviane Immunglobuline des Typs Y. Daher wurde in den vorangestellten initialen Experimenten zur Beurteilung der Expression hinsichtlich Qualität und Quanti-

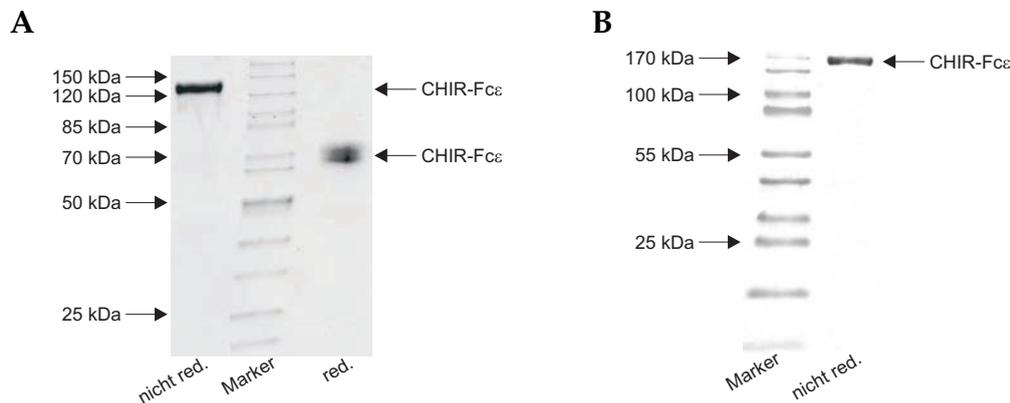


Abbildung 4.43: Analytische SDS-PAGE des chimären Konstruktes CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 (CHIR-Fcε) mit nachfolgender/m Coomassie-Färbung bzw. Immunblot nach Reinigung und Isolierung mittels IMAC aus den Zellkulturüberständen. Nach Reinigung und Dialyse wurde das Produkt in nicht-reduzierendem bzw. reduzierendem Probenpuffer in einem 10%igen Acrylamid-Gel in Tris-Tricin-haltigem Puffer gelelektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte eine (A) Coomassie-Färbung bzw. (B) ein Immunblot mit huIgE-sepezifischem Antikörper und Detektion mit NBT/BCIP in AP-Detektionspuffer. Als Standard wurden die Proteinmarker (A) *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* und (B) *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet. red. = reduziert.

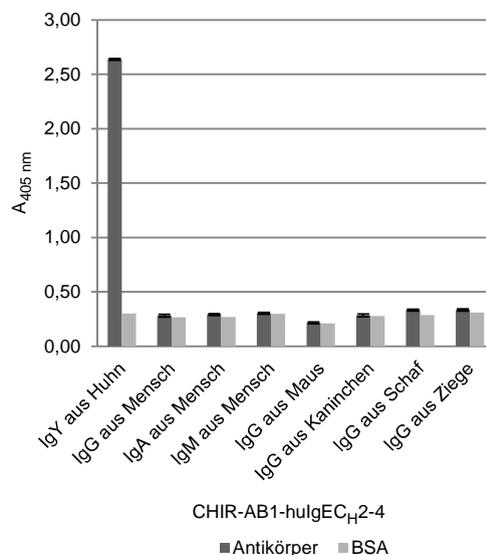


Abbildung 4.44: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Spezifität des chimären CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 für Immunglobulinisotypen unterschiedlicher Herkunft. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL der jeweiligen Antikörper (jeweils 25 µg/mL) belegt und mit 2% BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL Kulturüberstand der CHIR-AB1-huIgEC_H2-4-Produktion. Als sekundärer Antikörper wurde der AP-konjugierte monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1 000 in 2% BSA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurden 2% BSA in PBS verwendet.

tät das chimäre Rezeptorkonstrukt dem Zwecke entsprechend auf der Zielstruktur IgY getestet. Ob das in dieser Arbeit dargestellte bivalente Fusionskonstrukt aus CHIR-AB1 und humanem Fc ϵ ebenfalls reine Spezifität für IgY aufweist, sollte in einem Spezifitätstest demonstriert werden. Immunglobuline unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Isotypen – darunter auch humane IgG, IgA und IgM – wurden auf der Oberfläche einer ELISA-Platte immobilisiert und mit HEK-Zellkulturüberstand von CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 inkubiert. Die Abbildung 4.44 zeigt die aus diesem Test erhaltenen Ergebnisse und bestätigt die ausschließliche Spezifität für IgY; Isotypen der Immunglobuline muriner, leporider oder capriner Herkunft wurden nicht erkannt.

4.5.3 Affinität von CHIR-AB1-huIgEC_H2-4

In einer SPR-spektroskopischen Analyse wurden die apparente Dissoziationskonstante sowie die zugehörigen kinetischen Parameter bestimmt (Die Messungen wurden durch Unterstützung von Dr. Klaus Wiehler, SierraSensors GmbH, Hamburg durchgeführt). Mit einer K_D von 1.89×10^{-10} M liegt dieser Wert im picomolaren Bereich und eine Größenordnung über dem für den avianen Rezeptor CHIR-AB1 berichteten K_D (vgl. Abb. 4.45) [158].

4.5.4 Anwendung von CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 im Festphasenassay

Eine weitere ELISA-Analyse sollte dann die Anwendbarkeit der Kombination aus allergenspezifischen, hier Bet v 1a-spezifischen IgY und IgY-spezifischem IgE-Substitut zeigen. Hierzu wurde das zuvor exprimierte Einzelallergen Bet v 1a-MBP immobilisiert und mit einer vorinkubierten Mischung aus spezifischen IgY und dem Konstrukt CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 belegt. Die Konzentration der eingesetzten IgY wurde hierbei seriell verdünnt, während die Konzentration des CHIR-huIgE-Konstruktes konstant gehalten wurde. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen human-IgE-spezifischen und AP-konjugierten Sekundärantikörper. Abbildung 4.46 zeigt den hierbei erhaltenen Reaktivitätsverlauf.

In Analogie zu dem vorangegangenen ELISA wurde erneut eine serielle Verdünnungsreihe des CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 bei konstanter Konzentration der allergenspezifischen IgY durchgeführt. Der erhaltene konzentrationsabhängige Reaktivitätsverlauf ist in Abbildung 4.47 gezeigt. Zusammenfassend lässt sich anhand die-

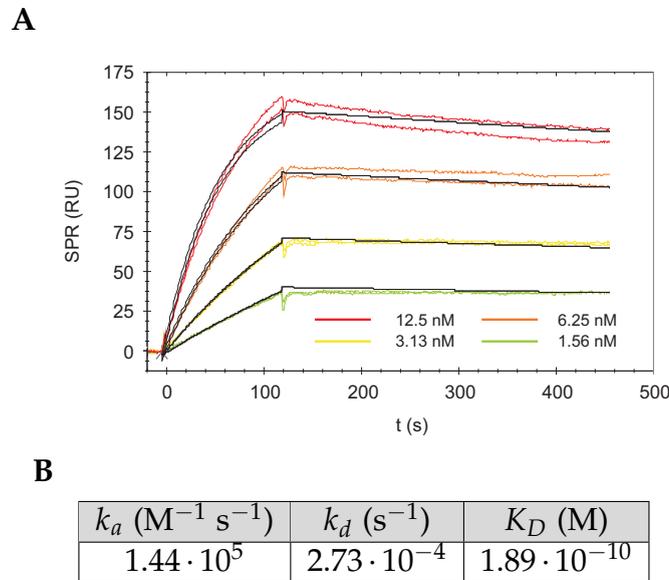


Abbildung 4.45: SPR-spektroskopische Analyse von CHIR-AB1-huIgEC_H2-4. Das IgY-spezifische CHIR-AB1-huFcε-Konstrukt wurde in einer seriellen Konzentrationsreihe (s. Legende) in einem SPR-2-Gerät gemessen (A). Als Flussrate wurden 25 µL/min gewählt, die Assoziationsdauer betrug 2 min und die Dissoziationszeit 5.5 min. Der Sensorchip wurde mit naiven IgY belegt. Zur Referenzierung der Sensorgramme wurde parallel gegen eine unbelegte Flusszelle gemessen. Gezeigt sind die referenzierten Differenzspektren beider Messzellen. In schwarz dargestellt, sind die mit Hilfe der Software *TraceDrawer* erhaltenen Regressionskurven bei Zugrundelegen eines LANGMUIR'schen Absorptionsverhaltens (1:1-Bindungsmodell). (B) Die daraus resultierenden Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d ergeben die Dissoziationskonstante K_D .

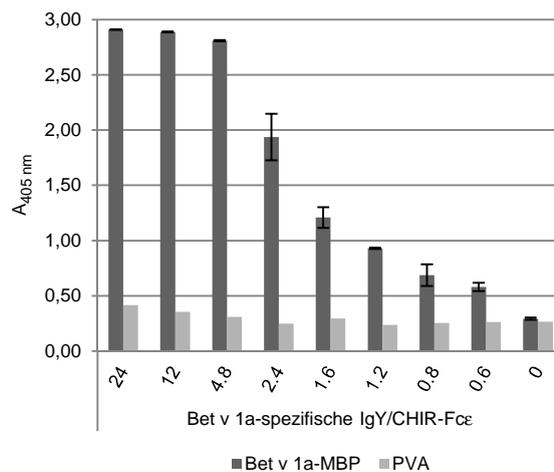


Abbildung 4.46: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität des CHIR-AB1-huIgEC_H2-4-Konstruktes bei variiertem IgY-Konzentration. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL (100 µg/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL einer zuvor präparierten Mischung aus CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 gleichbleibender Konzentration und allergenspezifischen IgY variierender Konzentration (x-Achse: Angaben in µg/mL). Als tertiärer Antikörper wurde der AP-konjugierte monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

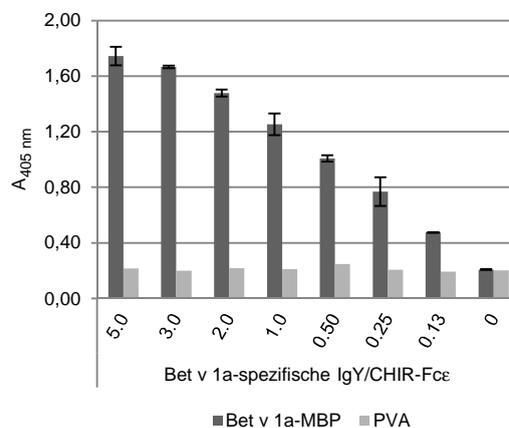


Abbildung 4.47: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität des CHIR-AB1-huIgE_{H2-4}-Konstruktes (CHIR-Fcε) bei variierter Konzentration. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μL (100 μg/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μL einer zuvor präparierten Mischung aus CHIR-AB1-huIgE_{H2-4} variierender Konzentration (x-Achse: Angaben in μg/mL) und allergenspezifischen IgY konstanter Konzentration. Als tertiärer Antikörper wurde der AP-konjugierte monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1 000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz mit pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

ser ELISA-Experimente feststellen, dass das chimäre Fusionskonstrukt aus avianem Rezeptor und konstantem Fcε-Part als Assayreagenz in Verbindung mit avianen Immunglobulinen funktionell ist. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das IgE-Substitut auch in hohen Verdünnungen, d. h. in geringen Konzentrationen zuverlässige Signale liefert.

Der Einsatz polyklonaler Antikörper in der immunologischen Diagnostik ist eine Grundvoraussetzung zur Abdeckung der potentiellen Bandbreite möglicher allergenspezifischer Paratope auf humanen Immunglobulinen der Klasse IgE. Daneben existieren für eine komponentenaufgelöste Diagnostik auch monoklonale (humane) Antikörper, die ursprünglich ebenfalls auf humane Immunglobuline zurückzuführen sind. Diese mittels der Hybridomtechnologie, anschließender Reklonierung und Adaption an die jeweilige Assayspezifität und rekombinanter Produktion erhaltenen Antikörper können zur genauen Untersuchung auf Einzelkomponenten eines komplexen allergenen Gemisches wie beispielsweise Pollenextrakte, Nahrungsmittelallergene etc. in allergologisch-diagnostischen Systemen als Referenz eingesetzt werden. Parallel zur Substitution humaner polyklonaler IgE-Seren durch polyklonale via Immunisierung generierter IgY können ebenfalls monoklonale IgY mit maßgeschneiderter Spezifität Verwendung finden. Ein in diesem Kontext und im Rahmen der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis mittels Hybridomtechnologie und Reklonierung erzeugter Antikörper ist der Bet v 1a-spezifische IgY 2-14.

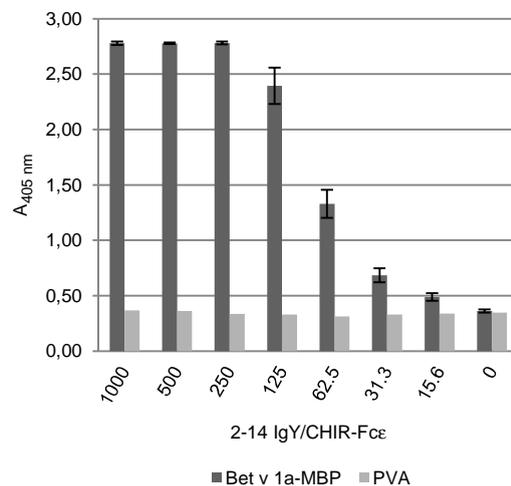


Abbildung 4.48: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität des monoklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY 2-14 in serieller Verdünnung und Kombination mit dem Konstrukt CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 (CHIR-Fce). Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit 30 µL (100 µg/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL einer zuvor präparierten Mischung aus CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 konstanter Konzentration und dem monoklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY-Antikörper 2-14 in serieller Verdünnung (x-Achse: Angaben in µg/mL). Als tertiärer Antikörper wurde der AP-konjugierte monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz mit pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

Dieser monoklonale chimäre Antikörper mit murinen variablen Domänen der leichten und schweren Kette und konstanten ν -Ketten wurde in einer ELISA-Analyse in Verbindung mit demselben CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 getestet. Der IgY 2-14 wurde bei konstanter Konzentration zusammen mit variierten Konzentrationen (serielle Verdünnung) des CHIR-huIgE-Konstruktes analysiert. Das Ergebnis des konzentrationsabhängigen Reaktivitätsverlaufs ist in Abbildung 4.48 zu sehen. Auch auf monoklonaler Ebene der IgY-Technologie konnte der Einsatz des Rezeptor-Konstruktes demonstriert werden.

Die Anwendung der spezifischen IgY in diversen ELISA-Analysen erfolgte stets zusammen mit der Verwendung des Einzelallergens Bet v 1a-MBP. Anders als bei isolierten und gereinigten singulären Proteinen stellen Proteinextrakte ein komplexes Gemisch aus dem Zielallergen und weiteren möglicherweise störenden Bestandteilen dar. Da in der Praxis der allergologischen Diagnostik eine Vielzahl unterschiedlicher Extrakte zur Charakterisierung einer allergischen Symptomatik verwendet werden, sollte im Folgenden und in Analogie ein ELISA unter Einsatz eines Extraktes durchgeführt werden. Die Analyse der polyklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY im Zusammenspiel mit dem CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 hinsichtlich der Reaktivität auf den immobilisierten Birkenextrakt (t3) unterstreicht die Spezifität und Einsetzbarkeit der durch Immunisierung gewonnenen IgY (s. Abb. 4.49).

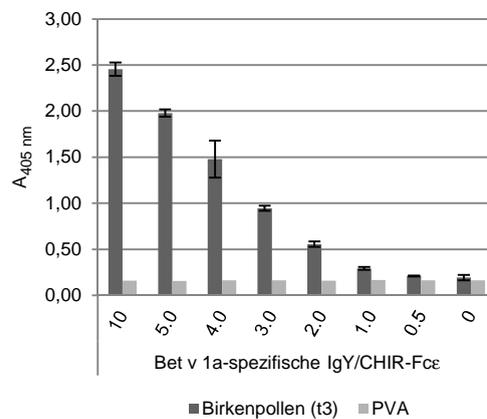


Abbildung 4.49: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität der Bet v 1a-spezifischen IgY in Kombination mit CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4} (CHIR-Fcε) gegenüber Birkenpollenextrakt (t3). Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μL (50 μg/mL) Birkenpollenextrakt (t3) belegt und mit 1% PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μL einer zuvor präparierten Mischung aus CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4} konstanter Konzentration und den polyklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY variierender Konzentration (x-Achse: Angaben in μg/mL). Als tertiärer Antikörper wurde der AP-konjugierte, monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1 000 in 1% PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz mit pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1% PVA in PBS verwendet.

In den vorangehenden Kapiteln wurde durch Verwendung Bet v 1a-spezifischer polyklonaler IgY in Kombination mit dem chimären IgY-spezifischen Konstrukt die Einsatzmöglichkeit zur Generierung neuer Standardreagenzien am Modell der inhalativen Birkenpollenallergie aufgezeigt. Dass sich dieses Konzept auch auf andere Bereiche der Allergologie ausdehnen lässt, sollte in einer weiteren Analyse für den Bereich der Nahrungsmittelallergie gezeigt werden.

Zu diesem Zweck wurden kommerziell erhältliche polyklonale aviane Antikörper, die durch Immunisierung mit der Glutenfraktion von Weizen erhalten wurden, zusammen mit dem chimären Fcγ-spezifischen IgEC_{H2-4} hinsichtlich ihrer Reaktivität auf die wasserlösliche Weizenproteinfraktion nach OSBORN untersucht. Die Daten beider ELISA-Analysen, in der bei konstanter Konzentration einer der beiden Komponenten entweder die (A) IgY-Konzentration oder (B) die CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4}-Konzentration variiert wurde, sind in Abbildung 4.50 gezeigt.

4.5.5 Weitere Formate rekombinanter, verkürzter humaner Fc-Fragmente mit Spezifität für IgY/FcY

Im Gegensatz zu den vorgestellten Konzepten zur Kopplung von Antikörpern, insbesondere zur Verknüpfung der allergenspezifischen Einheit mit einer assaykompatiblen Detektionseinheit, die eine chemische Modifikation der spezifischen avianen Immunglobuline erforderlich machen und für jede allergologisch-diagnostische

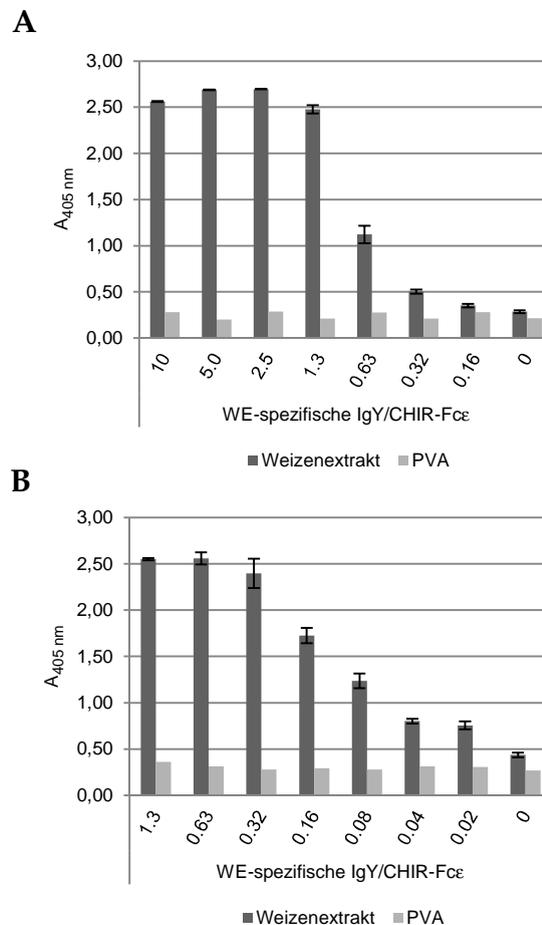


Abbildung 4.50: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität polyklonaler Weizenextrakt-spezifischer IgY in Kombination mit CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4} gegenüber Weizenextrakt. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL Weizenextrakt (Fraktion I nach OSBORN) belegt und mit 1% PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL einer zuvor präparierten Mischung aus CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4} und polyklonaler Weizenextrakt-spezifischer IgY. Hierzu wurden bei konstanter Konzentration eines der beiden Komponenten entweder die Konzentration (A) der spezifischen IgY oder (B) des chimären IgE-Konstruktes variiert (x-Achse: Angaben in µg/mL). Als tertiärer Antikörper wurde der AP-konjugierte, monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1000 in 1% PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz mit pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1% PVA in PBS verwendet.

Anwendung zugeschnitten werden müssen, liegt die Besonderheit des CHIR-huIgE C_{H2-4}-Konstruktes und damit allgemein eines CHIR-AB1-huFc-Konstruktes in der genetischen Kopplung. Diese ermöglicht auf einfache Weise, durch molekularbiologische Methoden zur Reklonierung und Expression den humanen Fcε-Part durch jeden anderen Isotyp auszutauschen und so die Anwendung spezifischer IgY auch für andere Fragestellungen der Allergologie und darüber hinaus für die Autoimmunologie und Infektiologie zu realisieren. In dieser Arbeit wurden neben dem bisher erwähnten CHIR-AB1-huIgEC_{H2-4} auch andere humane Isotypen kloniert und im Mammalia-System produziert. Eine Übersicht über die CHIR-AB1-Fusionskonstrukte mit den humanen Fc-Domänen der Antikörper IgG₁, IgG₄, IgM, IgA₁ und IgA₂ ist im Anhang gezeigt.

Amplifikation der schweren konstanten Ketten humaner Antikörperisotypen

Zur Klonierung der Fc-Fragmente der humanen Antikörper erfolgte zunächst die Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenzen mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotide unter Einführung der Schnittstellen *Sgs I*⁹ und *Xba I* bzw. *Mss I*¹⁰ und Anhängen eines His-Tags. Als Template wurden Vektoren eingesetzt, die bereits in der Arbeitsgruppe vorlagen und die humanen schweren Ketten der konstanten Antikörperdomänen besaßen. Die erzeugten Amplifikate wurden gelelektrophoretisch analysiert und anschließend mit dem Fermentas *GeneJET™ Gel Extraction Kit* isoliert.

Klonierung chimärer, IgY-spezifischer huFc-Fragmente

Als Zielvektor für die Insertion der zuvor amplifizierten und isolierten Fc-Fragmente humanen Ursprungs wurde der Vektor pcDNA3.1+/Zeo-CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 (s. Abschnitt 4.5.1) eingesetzt. Sowohl der Zielvektor als auch die humanen Fc-Fragmente wurden mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen inkubiert. Nach Entfernen des Fc ϵ -Parts und Isolierung des geschnittenen Vektors, wurde im folgenden Schritt je eines der anderen Fragmente inseriert. Die Subklonierung und Insertion des Fragmentes im korrekten Leserahmen wurde durch Sequenzierung bestätigt (s. Anhang).

Expression der CHIR-AB1-huFc-Konstrukte

In Analogie zu dem CHIR-AB1-huIgE-Fusionskonstrukt wurden auch hier HEK-293-Zellen als Expressionssystem eingesetzt, um ebenfalls die Faltung und authentische Glycosylierung sicherzustellen. Für die Produktion der chimären Antikörperkonstrukte wurden HEK-293-Zellen mit der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert und positive Transfektanden durch Inkubation mit dem Antibiotikum Zeocin selektiert. Drei Tage nach erfolgter Transfektion konnte im Zellkulturüberstand die transiente Expression für alle Konstrukte außer dem IgA₁-Analogon durch eine ELISA-Analyse nachgewiesen werden (s. Abb. 4.51 (A)). Die transfizierten Zellen wurden zur Stabilisierung und damit zur Integration des Zielgens in das zelleigene

⁹Isochizomer: *Asc I*

¹⁰Isochizomer: *Pme I*

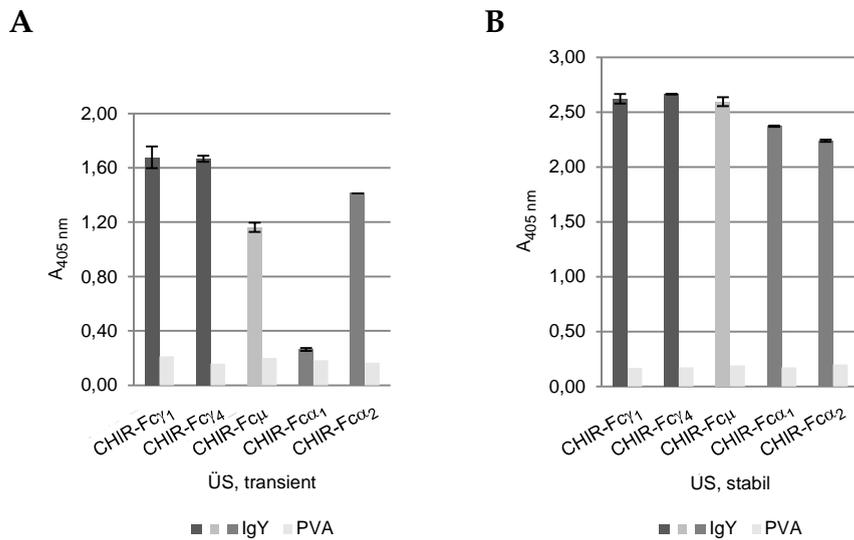


Abbildung 4.51: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Produktion chimärer CHIR-Fc-Konstrukte transient bzw. stabil exprimierender HEK-293-Zellen. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 μ L naiver IgY (100 μ g/mL) belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 μ L der Kulturüberstände (A) transient bzw. (B) stabil exprimierender HEK-293-Zellen. Als sekundäre Antikörper wurden anti-huIgG-AP (Sigma, 1:20 000 in 1 % PBVA/PBS), anti-huIgM-AP (Sigma, 1:10 000 in 1 % PVA/PBS) und anti-huIgA-AP (Sigma, 1:5 000 in 1 % PVA/PBS) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

Genom weiter unter Zeocin-Selektion kultiviert. In den Kulturüberständen erfolgreich stabilisierter HEK-293-Transfektanden konnten die unterschiedlichen chimären Fusionskonstrukte mit humanFc-spezifischen Antikörpern ebenfalls in einem ELISA-Experiment nachgewiesen werden (s. Abb. 4.51 B). Während der Zellkultivierung wurden die Überstände gesammelt und bei 4 °C gelagert.

Reinigung der CHIR-AB1-huFc-Konstrukte

Die Produktionseffizienz des huIgG-analogen Konstruktes lag mit 20 μ g/mL in der gleichen Größenordnung wie die von CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 und konnte ebenfalls aus den vereinigten Zellkulturüberständen der HEK-293-Produktion mit Hilfe der His-Tag-vermittelten Affinitätschromatographie (Ni-IMAC) isoliert und gereinigt werden (vgl. auch Abschnitt 4.5.1). Entsprechende Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Abbildung 4.52 zeigt die gelelektrophoretische Analyse mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden bzw. reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung bzw. Immunblot. Die Kulturüberstände der übrigen Konstrukte wurden lediglich für die oben gezeigten ELISA-Analysen verwendet. Die vorliegenden Konzentrationen scheinen im Vergleich zu den IgE- und IgG₁-Analoga sehr niedrig zu sein, so dass eine gelelektrophoretische Charakterisierung nicht vorgenommen wurde.

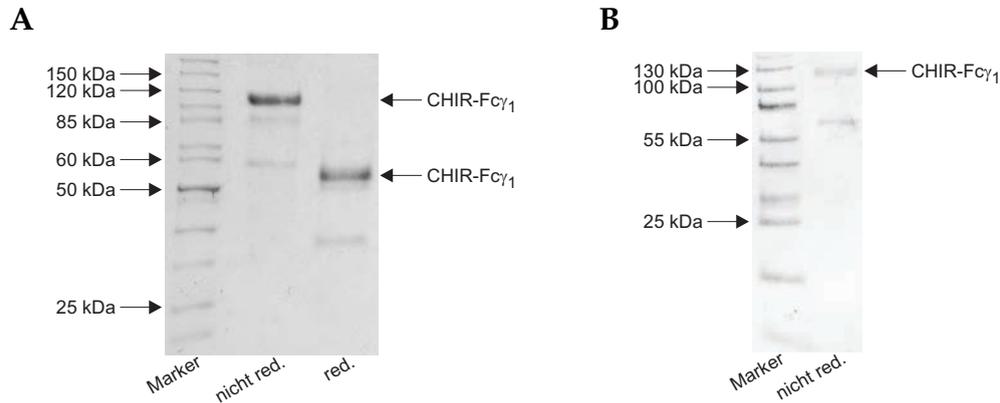


Abbildung 4.52: Analytische SDS-PAGE des chimären Konstruktes CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 (CHIR-Fc γ ₁) mit nachfolgender/m Coomassie-Färbung bzw. Immunblot nach Reinigung und Isolierung mittels IMAC aus den Zellkulturüberständen. Nach Reinigung und Dialyse wurde das Produkt in nicht-reduzierendem bzw. reduzierendem Probenpuffer in einem 10 %igen Acrylamid-Gel in Tris-Tricin-haltigem Puffer gelelektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte eine (A) Coomassie-Färbung bzw. (B) ein Immunblot mit huIgG-sepezifischem Antikörper und Detektion mit NBT/BCIP in AP-Detektionspuffer. Als Standard wurden die Proteinmarker (A) PageRuler™ Unstained Protein Ladder bzw. (B) PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet. red. = reduziert.

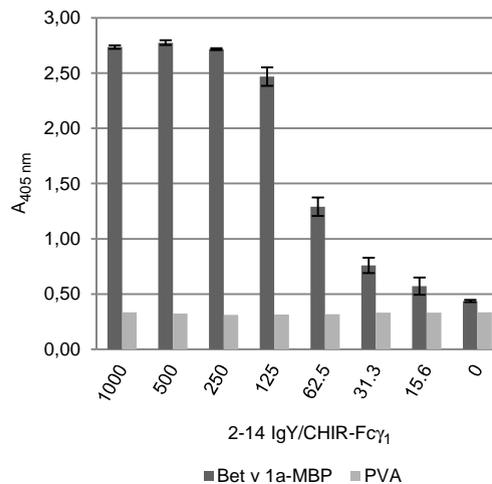


Abbildung 4.53: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität des monoklonalen Bet v a-spezifischen IgY 2-14 in serieller Verdünnung. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL (100 µg/mL) Bet v 1a-MBP belegt und mit 1 % PVA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 30 µL einer zuvor präparierten Mischung aus CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 konstanter Konzentration und dem monoklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY-Antikörper 2-14 in serieller Verdünnung (x-Achse: Angaben in µg/mL). Als tertiärer Antikörper wurde der AP-konjugierte monoklonale anti-huIgE eingesetzt (1:1 000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz mit pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

In Analogie zu CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 sollte in einer ELISA-Analyse die Anwendung des CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 in Kombination mit dem Bet v 1a-spezifischen IgY 2-14 auf monoklonaler Ebene getestet werden. In einer seriellen Verdünnungsreihe des spezifischen IgY in Kombination mit dem in konstanter Konzentration vorliegenden CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 wurde die Reaktivität gegenüber immobilisiertem Bet v 1a-MBP untersucht. Die Abbildung 4.53 zeigt den aus dem ELISA-Experiment erhaltenen Reaktivitätsverlauf. Das IgG-analoge Konstrukt konnte erwartungsgemäß mit spezifischem IgY im ELISA-System angewendet werden.

Im Kontext der heparininduzierten Thrombozytopenie Typ II konnten die durch Immunisierung erhaltenen PF4/DS-10-spezifischen, polyklonalen IgY durch Kombination mit CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 in einem IgG₁-spezifischen ELISA untersucht werden. Der auf der Oberfläche der ELISA-Platte immobilisierte und für das Auftreten spezifischer Autoantikörper verantwortliche Komplex aus Plättchenfaktor 4 und Dextransulfat konnte zwar durch ein zuvor inkubiertes Gemisch aus PF4/DS-10-spezifischen IgY und dem Rezeptorkonstrukt durch IgG-isotypspezifische Detektion mit einem anti-huIgG-Antikörper nachgewiesen werden (s. Abb. 4.54 A), jedoch war selbst das mit höchsten IgY-Konzentration korrespondierende Signal äußerst schwach. Zudem wurde die Güte dieses Experimentes durch den Mangel unzureichend affiner und in geringer Konzentration vorliegender spezifischer IgY limitiert. Dieser Problematik konnte mit einer sequentiellen Anwendung spezifischer IgY und CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 begegnet werden, wobei zwischen den Inkubationsschritten ein Waschschritt zur Entfernung sehr schwach bzw. ungebundener IgY erfolgte. Die nachfolgende Inkubation mit dem CHIR-Fc γ ₁-Konstrukt ermöglichte dann die Bindung an ausschließlich über das Allergen zuvor immobilisierte IgY (s. Abb. 4.54 B). Im Vergleich war der Verlauf der Signalintensitäten beider ELISA-Experimente sehr stark ausgeprägt und zeigte, dass durch Vorinkubation spezifischer IgY mit dem Fc ν -spezifischen Antikörper ein nicht unbeträchtlicher Teil von letzterem durch unspezifische und/oder niedrig-affine IgY gebunden und hierdurch dem Assay der indirekten Interaktion mit dem Allergen entzogen wurden.

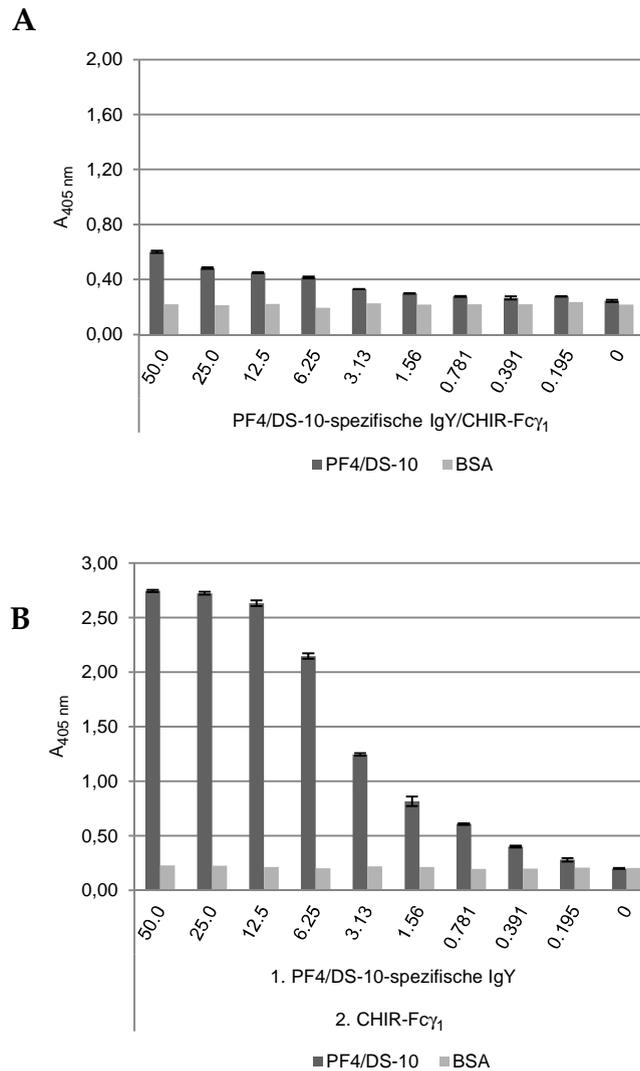


Abbildung 4.54: ELISA-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität PF4/DS-10-spezifischer IgY in Kombination mit CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit je 30 µL eines Komplexes aus PF4 und dem Dextransulfat DS-10 (100 µg/mL) belegt und mit 2 % BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem (A) Gemisch aus oder einer (B) sequentiellen Inkubation mit spezifischen IgY in seriell verdünnter Konzentration (x-Achse: Angaben in µg/mL) und dem produzierten CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 konstanter Konzentration. Als Tertiärantikörper wurde der huIgG-spezifische, AP-konjugierte anti-huIgG eingesetzt (1:20 000 in 1 % PVA/PBS). Die Detektion erfolgte durch Umsatz von pNPP und Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Kontrolle wurde 1 % PVA in PBS verwendet.

5 Diskussion

Die klinische Diagnostik ist für viele Ärzte und einige andere im Gesundheitswesen Tätige zu einem unerlässlichen Hilfsmittel zur näheren Untersuchung und Aufklärung vielfältiger Symptomatiken und Verdachtsdiagnosen avanciert. Im Kontext der allergologischen, autoimmunologischen oder auch infektiologischen Diagnostik existiert eine große Palette unterschiedlicher Methoden, unter denen sich neben rein qualitativen auch quantitative Bestimmungen finden. Zur absoluten Quantifizierung und zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Messergebnisse untereinander werden in quantifizierenden serologischen Assays stets Referenzmaterialien verwendet. Durch den Einsatz eines definierten Referenzmaterials soll garantiert werden, dass serologische Befunde stets auf eine zuvor festgelegte Skala bezogen und vergleichbar werden. Auf internationaler Ebene definiert die Weltgesundheitsorganisation in Bezug auf die vier humanen Antikörperisotypen IgG, IgM, IgA und IgE sogenannte Referenzseren, die aus humanen Einzelseren in konstanter Quantität durch Referenzlaboratorien zusammengestellt und für den Anwender zur Verfügung gestellt werden [60, 63]. Darüberhinaus regelt die Bundesärztekammer auf nationaler Ebene (Deutschland) die Qualitätssicherung im diagnostischen Laboratorium durch besondere Richtlinien (RiLiBÄK), die für alle laboratoriumsmedizinisch arbeitenden Ärzte und Ärztinnen obligatorisch sind. Damit beschränkt sich die Einhaltung und Anwendung dieser Richtlinien nicht nur auf die Fachärzte der Laboratoriumsmedizin und deren Praxen, sondern auf alle, die innerhalb ihrer Praxen im Rahmen der medizinischen Patientenversorgung Untersuchungen durchführen, auswerten und interpretieren [62]. Zusätzlich soll durch die Teilnahme an Ringversuchen eine externe und zertifizierte Qualitätskontrolle erfolgen [62].

Dennoch erwächst für die *In-vitro*-Diagnostik hinsichtlich der Bestimmung des spezifischen IgE-Spiegels eine Problematik. Während die absolute Quantifizierung des unspezifischen Gesamt-IgE mit Hilfe der durch die WHO festgelegten Referenzseren erfolgt, wird die sIgE-Konzentration via heterologer Interpolation, d. h. durch Bezug auf eine mit Gesamt-IgE-Mengen korrelierenden Eichkurve ermittelt. Die

Methoden zur Bestimmung des Gesamt-IgE und des spezifischen IgE weichen jedoch, wie bereits einleitend dargestellt, voneinander ab, so dass eine authentische Quantifizierung des sIgE im eigentlichen Sinne nicht möglich ist. Aus diesem Grunde erscheint die Verwendung neuer Reagenzien als Standard bei der Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper erstrebenswert. Die Bedeutung dieser Reagenzien als Referenzmaterial mit definierter Spezifität liegt nicht zuletzt auch darin begründet, dass insbesondere im Bereich der Allergologie immer mehr Antigene auf rekombinanter Basis Einzug in die spezifische *In vitro*-Diagnostik gehalten haben [159–161].

Der Einsatz humaner IgE-Poolseren könnte hier den Ausweg aus der beschriebenen Problematik bedeuten, da diese hinsichtlich Spezifität und Quantität charakterisiert werden können. Die Nachteile humaner Poolseren sind allerdings zum einen die mangelnde Reproduzierbarkeit einer konstanten Qualität. Zum anderen wird die Frage aufgeworfen, mit welchem Poolserum die insgesamt möglichen Spezifitäten gegenüber bestimmten Antigenen überhaupt abgedeckt werden kann. Humane Seren sind daher gerade in Hinblick auf IgE-Seren mit seltenen Spezifitäten bzw. anders bedingter limitierter Verfügbarkeit nachteilig. Hier bietet die Generierung polyklonaler spezifischer Antikörper durch Immunisierung von Tieren einen vielversprechenden Ansatz, humane Poolseren zu ersetzen. Insbesondere die Attraktivität der Immunisierung des domestizierten Huhns (*Gallus gallus domesticus*) zur Produktion polyklonaler Antikörper steht hier im Vordergrund.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zunächst für das Modell der Bet v 1a-spezifischen Allergie als klassischer Vertreter allergischer Erkrankungen und für den Bereich autoimmunologischer Defekte am Beispiel der heparininduzierten Thrombozytopenie Typ II polyklonale aviane Antikörper generiert und isoliert werden. Diese standen dann Spezifität und Affinität betreffend für die weitere Analyse und Charakterisierung zur Verfügung. Auf Basis der IgY-Technologie konnten dann im zweiten Teil dieser Arbeit Konzepte zur Adaption avianer polyklonaler Antikörper im Einklang mit der Kompatibilität isotypspezifischer Assays evaluiert und realisiert werden.

5.1 Rekombinante Darstellung und Reinigung allergener Zielproteine

Zum Zwecke der Immunisierungen wurden kommerziell erhältlichches Bet v 1a bzw. ein rekombinant hergestellter Komplex aus Plättchenfaktor 4 und Dextransulfat eingesetzt. Die Charakterisierung der auf diese Weise erhaltenen polyklonalen Antikörper sollte dann mit den rekombinanten Varianten dieser Antigene und mit im Kontext der allergischen Erkrankung durch Birkenpollen relevanten kreuzreaktiven Allergenen erfolgen. In dieser Arbeit wurden das Birkenpollenmajorallergen Bet v 1a [162] und zwei darauf basierende verkürzte Versionen sowie die dazu homologen und ebenfalls zur Familie der PR10-Proteine (Bet v 1-Familie) gehörenden Allergene des Apfels (*Malus domestica*) Mal d 1 [163] und der Sojabohne (*Glycine max*) Gly m 4 [164] prokaryotisch produziert. Mit Ausnahme des Sojaproteins Gly m 4, dessen lösliche cytoplasmatische Expression bekannt ist, wurden die Allergene N-terminal mit dem Maltose bindenden Protein fusioniert. C-terminal wurde zusätzlich ein Histidin-Tag für die Reinigung über Ni-NTA-Matrix angefügt. Die Fusion mit MBP bringt einige Vorteile gegenüber den freien nicht-fusionierten Proteinen mit sich. Durch die unmittelbare Nachbarschaft der ribosomalen Bindungsstelle im 5'-Bereich des MBP codierenden Gens wird eine effiziente Initiierung der Translation erreicht, welche in sehr hohen Ausbeuten der MBP-Fusionsproteine im Cytoplasma von *E. coli* resultiert [165]. Ein weiterer, wenn nicht sogar bedeutender Vorteil von MBP-Fusionsproteinen ist die Löslichkeit vermittelnde Eigenschaft. Proteine, die nicht fusioniert unter konventionellen Expressionsbedingungen unlöslich akkumuliert werden, konnten durch die Fusion mit MBP oftmals in löslicher Form und korrekter Faltung erhalten werden [166, 167]. In vorangehenden Arbeiten im Arbeitskreis konnten die Allergene Bet v 1a und Mal d 1 bereits cytoplasmatisch in *E. coli* zwar erfolgreich, jedoch unlöslich produziert werden. Die Expression der genannten Allergene als MBP-Fusionskonstrukte ergab in sehr hoher Konzentration vorliegende und vor allem lösliche Proteine, die unter nativen, nicht denaturierenden Bedingungen gereinigt werden konnten. Als Matrix für die Isolation der Zielproteine aus der *E. coli*-Kultur wurde die als Bestandteil der natürlichen, pflanzlichen Stärke vorkommende Amylose verwendet. Dieses einige hundert Monomere umfassende und aus α -1,4-glykosidisch verknüpften D-Glucose-Einheiten bestehende Polymer diente als Interaktionspartner des Maltose bindenden Proteins. Die Ablösung des Fusionsproteins von der Matrix gelang durch Einsatz freier Maltose, die einen besseren Bindungspartner als die Amylose für MBP darstellt.

Die mittels Reinigung über Amylose erhaltenen Fusionsproteine wurden darüber hinaus durch eine sich anschließende über immobilisierte Nickelmetallionen vermittelte Affinitätschromatographie weiter gereinigt. Diese auch kurz als Ni-IMAC bezeichnete Methode nutzt die Bindungseigenschaften divalenter Kationen, vornehmlich Nickel, gegenüber dem heterocyclischen basischen Molekül Imidazol. Letzteres ist Bestandteil der Seitenkette der Aminosäure Histidin und ermöglicht die Reinigung mit einem His-Tag versehener Proteine. Durch rekombinante Produktion und nachfolgende Reinigung über zwei unterschiedliche Affinitätschromatographien konnten die Allergene Bet v 1a-MBP, Mal d 1-MBP, Bet v 1a*-MBP, Bet v 1a*-MBP E149G und Gly m 4 (unfusioniert) erhalten und für die nachfolgenden Experimente erfolgreich eingesetzt werden.

5.2 Spezifische und polyklonale aviane Antikörper

Während (rekombinante) monoklonale Antikörper auf Grund ihrer definierten Spezifität zwar den Vorteil besitzen, zielgenaue Untersuchungen von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen wie beispielsweise in der komponentenaufgelösten allergologischen Diagnostik zu erlauben, steht hinter deren Entwicklung jedoch ein kompliziertes wie auch zeit- und kostenaufwändiges Ineinandergreifen unterschiedlicher molekularbiologischer Methoden wie der Hybridomtechnologie, dem Phagen-Display oder anderen Klonierungs-, Expressions- und Screeningstechniken [168, 169]. In vielen Methoden der allergologischen, autoimmunologischen oder infektiologischen Diagnostik ist die Eigenschaft der Monoklonalität eines Antikörpers und die damit einhergehende Monospezifität allerdings nicht von Relevanz. Vielmehr soll hier im Zusammenhang geeigneter Referenzmaterialien jede potentiell auftretende oder existierende Spezifität eines Patienten mit einbezogen werden können. Der Einsatz humaner Poolseren ist aus den einleitend genannten Gründen jedoch nicht optimal. Dieses Problem auf der Grundlage monoklonaler rekombinanter Antikörper zu bewältigen, ist ob des technischen und finanziellen Aufwandes nahezu unmöglich und nicht praktikabel. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern bieten hier polyklonale Antikörper den entscheidenden Vorteil, da sie mit wenig Aufwand durch die Immunisierung geeigneter Labortiere zu erhalten sind [95].

5.2.1 Generierung polyklonaler avianer Antikörper durch Immunisierung

Die Bereitstellung polyklonaler Antikörper für die Anwendung in der immunologischen Diagnostik setzt voraus, dass der für eine Immunisierung eingesetzte Organismus auf die Exposition mit dem Zielantigen mit der Produktion hoch spezifischer und hoch affiner Antikörper reagiert. Der Erfolg der Immunisierung hängt dabei sowohl von der Wahl des zur Immunisierung einzusetzenden Tieres als auch von dem gewählten Immunisierungsprotokoll ab [95].

In der vorliegenden Arbeit wurde das domestizierte Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) als Wirtsorganismus für die externe Immunisierung gewählt. Das Huhn zeigt für diese Zwecke einige Vorteile gegenüber den konventionell eingesetzten Tieren wie Kaninchen [170, 171] und Maus [172, 173] oder den nur in wenigen Einzelfällen zu bevorzugenden Tieren wie Ratte [174, 175], Hamster [176, 177] oder Meerschweinchen [178]. Hierzu zählt einerseits, dass ein nicht unbeträchtlicher Anteil der avianen IgY in das Eigelb transferiert wird und aus diesem mittels etablierter Methoden isoliert werden kann [112]. Außerdem ist bekannt, dass aviane Antikörper im Gegensatz zu denen in Mammalia produzierten weder das Komplementsystem von Mammalia aktivieren noch an mammaliäre Komponenten des Serums wie Fc-Rezeptoren oder den Rheumatoiden Faktor binden [112] und die Möglichkeit von nachteiligen Interferenzen in immunologischen Assays minimieren.

5.2.2 Isolierung polyklonaler IgY

Aus der Immunisierung mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1a konnten die in zwei Hühnern produzierten IgY mittels Ammoniumsulfatpräzipitation gereinigt werden. Die gelelektrophoretische Analyse durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung zeigte die Reinheit der isolierten Antikörperfraktionen, deren Spezifität immunologisch bestätigt wurde. Die Untersuchung zeigte zudem, dass unter nicht denaturierenden Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von über 200 kDa zu beobachten war. Dieses Resultat scheint zunächst mit dem massenspektrometrisch ermittelten Molekulargewicht von ca. 168 kDa nicht übereinzustimmen [179], überrascht jedoch nicht unter Berücksichtigung des Laufverhaltens von Proteinen in Acrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen, welches zusätzlich durch kovalent verbundene Kohlenhydratstrukturen am Protein [180]

beeinflusst wird. In Abhängigkeit des Acrylamidgehaltes zeigte sich in einer von AKITA und NAKAI durchgeführten SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten, dem ein apparentes Molekulargewicht von 180 000 kDa entsprach [123] und mit den hier erhaltenen Daten im Einklang stand.

5.2.3 Spezifität der polyklonalen avianen Antikörper

Die Generierung spezifischer Antikörper durch Immunisierung liefert stets polyklonale Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten und variierenden Affinitäten in Bezug auf das eingesetzte Antigen/Allergen. Dabei hängt die Effizienz hinsichtlich Qualität und Quantität nicht nur von dem gewählten Organismus, sondern auch maßgeblich von dem zu Immunisierungszwecken verwendeten Antigen ab. Antigene Proteine, die auf Grund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu einem bestimmten Organismus eine mittlere bis starke Homologie mit den Wirtsproteinen aufweisen, resultieren möglicherweise wegen einer induzierten immunologischen Toleranz nicht mit der Bildung hochspezifischer und hochaffiner Antikörper [95]. In dieser Hinsicht hat sich insbesondere im Zusammenhang mit Mammaliaproteinen das domestizierte Haushuhn als vorteilhaft erwiesen [115]. Auch wenn für das hier gewählte Modell der Birkenpollenallergie eine sich auf die Effizienz der Immunisierung negativ auswirkende Homologie mit avianen Proteinen ausgeschlossen werden konnte, ist der vorstehend genannte Aspekt natürlich bei der Generierung polyklonaler spezifischer Antikörper für die immunologische Diagnostik zu berücksichtigen.

In einer ersten Analyse mit Hilfe eines ELISA konnte gezeigt werden, dass die zuvor isolierten avianen IgY spezifisch für das zur Immunisierung eingesetzte Allergen Bet v 1a-MBP waren. Entsprechende Kontrollen unter Verwendung naiver IgY aus Hühnern, die keine artifiziell induzierte Immunisierung erfahren haben, und mit IgY, die vor Beginn der Immunisierung gesammelt wurden, zeigten weder eine Reaktivität auf Bet v 1a-MBP noch auf das als Löslichkeit vermittelndes Fusionsprotein dienende MBP. In Analogie konnte auch die Spezifität der aus der alternativen Immunisierung resultierenden IgY[†] festgestellt werden. Der Vergleich der postimmunen IgY-Fractionen untereinander zeigte, dass die jeweils höchsten Konzentrationen spezifischer Antikörper mit dem Zeitpunkt der Antigeninjektion korrelierte. Eier, die unmittelbar nach einem *Boost* gesammelt wurden, enthielten mehr spezifische IgY, als die zwischen den *Boosts* liegenden Fractionen. Die in zeitlichen Abständen erfolgten wiederholten Injektionen des Zielimmunogens sollten

im Verlauf einer effektiven Immunisierung sicherstellen, dass für die Induktion der immunologischen Antwort und damit deren Aufrechterhaltung ausreichend Protein vorhanden war. Nur durch eine fortwährende Stimulation durch das Antigen kann die immunologische Antikörperproduktion auf einem maximalen Niveau bestehen. Im Falle der Immunisierung von Huhn 029 konnte die maximale Reaktivität der Bet v 1a-spezifischen IgY der ersten postimmunen Phase nach erneuter Antigeninjektion wiedergewonnen werden (postimmun4*). Dieser Anstieg des spezifischen Antikörpertiters konnte für das Huhn 030 nicht erreicht werden.

Da die in der Regel für die Immunisierung eingesetzten Immunogene meist mehrere Epitope aufweisen, zeigen die mit dieser Methode gewonnenen polyklonalen Antikörper meist auch eine Polyspezifität. Diese bezieht sich nicht nur auf die Spezifität des verwendeten Antigens, sondern kann insbesondere auch homologe bzw. verwandte Proteine mit ähnlichen Epitopmustern betreffen [181–183]. In diesem Zusammenhang wurden die Reaktivitäten der generierten Bet v 1a-spezifischen avianen Antikörper gegenüber dem Apfelmajorallergen Mal d 1 und dem Sojaprotein Gly m 4 untersucht. Beide Allergene gehören zu der Familie der Bet v 1- oder PR10-Proteine [184, 185] und weisen Homologien von bis zu 60 % auf (s. Anhang, S. 195). Die Homologie dieser Allergene spiegelt sich auch auf Ebene der Sekundär- und Tertiärstruktur wider. Ein Vergleich der dreidimensionalen Strukturmodelle von Bet v 1a [186], Mal d 1 und Gly m 4 [187] zeigt die hohe Ähnlichkeit in Struktur und Oberflächenladungsdichte. Als Konsequenz dieser Eigenschaften sollte sich eine Kreuzreaktivität der Bet v 1a-spezifischen IgY für Mal d 1 und Gly m 4 zeigen lassen und die Polyklonalität der Antikörper unterstreichen.

In einem Immunblot ließ sich die immunologische Erkennung der potentiell kreuzreaktiven Allergene durch die aus der Immunisierung hervorgegangenen IgY beobachten. Die Intensität der Detektion von Gly m 4 fiel jedoch schwächer aus, während das Apfelallergen Mal d 1-MBP in einer mit Bet v 1a-MBP vergleichbaren Intensität detektiert werden konnte. Diese Beobachtung ließ sich auch in einer nicht denaturierenden Analyse mittels der ELISA-Methode bestätigen. So konnte die Reaktivität der avianen IgY auf Mal d 1-MBP in vergleichbarer Stärke mit der Bet v 1a-MBP-Reaktivität gemessen werden. Die Reaktivität auf Gly m 4 betrug in dieser Analyse nur etwa 60 % in Bezug auf Bet v 1a-MBP. Aus den Ergebnissen muss angenommen werden, dass die verringerte Reaktivität der polyklonalen IgY gegenüber dem Sojaallergen auf die niedrigere Homologie von Gly m 4 mit Bet v 1a (49 %) im Vergleich zur Homologie von Mal d 1 mit dem Birkenpollenallergen (56 %) zurückzuführen ist. Die schwache Erkennung von Gly m 4 ist

nicht notwendigerweise mit dem Unterschied konformationeller und kontinuierlicher Epitope zu begründen, da sowohl in einer nativen als auch denaturierenden Analyse die in Relation zu Bet v 1a verminderte Detektion von Gly m 4 beobachtet wurde.

Für weitere Aussagen zur Spezifität der IgY wäre in weiteren Studien eine Epitopenalyse wünschenswert. Hier könnten die tatsächlich erkannten Strukturen der Allergene identifiziert und auf Ähnlichkeit überprüft sowie Kreuzreaktivitäten anderer Allergene erklärt werden. Im Kontext der immunologischen Epitoperkennung durch humane Antikörper des Typs E und unter dem Aspekt der phylogenetischen Distanz der avianen Spezies zum Menschen wäre eine solche Analyse ebenfalls sehr interessant, da auf diese Weise detaillierte Einblicke in das sogenannte *epitope sharing* humaner und avianer Antikörper realisierbar wären. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass eine erschöpfende, umfassende Epitopuntersuchung zur Beantwortung der Frage, ob und welche humanen Epitope durch polyklonale, aus Immunisierungen hervorgehende aviane Immunglobuline erkannt werden, kaum realisierbar scheint. Im hiesigen Arbeitskreis konnte bereits ein originäres Epitop des Majorallergens Bet v 1a durch Verwendung eines auf eine spezifische Spenderbibliothek zurückgehenden humanen IgE-Antikörpers und Klonierung verkürzter Varianten des betrachteten Allergens identifiziert werden [151]. Mittels Immunoblot und ELISA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die polyklonalen IgY die verkürzte Variante, die das durch HECKER *et al.* bestimmte humane Epitop umfasst, erkennen. Auch die mutierte Bet v 1a-Variante, die zum vollständigen Verlust des durch den humanen Antikörper erkannten Epitops führte [151], wurde durch die polyklonalen avianen Antikörper gebunden. Diese initialen Ergebnisse zeigen die Polyspezifität avianer IgY und deren Potential, allergologisch relevante humane Epitope zu erkennen.

5.2.4 Effekt des Blockierungsreagenzes auf die Antikörper-Antigen-Bindung

Immunologische Methoden zur Untersuchung der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung, die wie der indirekte ELISA auf einer immobilisierten Festphase basieren, setzen stets ein geeignetes Blockierungsreagenz zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an nicht besetzte Bindungsstellen der Polystyroloberfläche voraus. Die Wahl des Blockierungsreagenzes hängt dabei nicht nur von der Effektivität

ab, freie Bindungsstellen dauerhaft nach der Belegung zu blockieren, sondern auch von der Eigenschaft, mit weiteren Komponenten des Assays zu interferieren [153]. Die beiden meist verbreiteten und effektivsten Reagenzien zur Blockierung sind das bovine Serumalbumin und das als Bestandteil der Milch vorkommende Casein; d. h. Proteine in gepufferter Lösung. Bei der Analyse von Allergenen insbesondere von Nahrungsalergenen im spezifischen ELISA kann es zu Störungen kommen, so dass auf alternative Reagenzien zurückgegriffen werden muss. Nicht-proteinöse Reagenzien könnten hier sicherlich den Vorteil haben, da die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität nur minimal, wenn nicht sogar ausgeschlossen sein sollte. Eine allgemeine Kategorisierung zur Verfügung stehender Blockierungsmittel hinsichtlich Effektivität existiert jedoch nicht, und die Wahl von BSA und Casein erfolgt meist der bekannten Effektivität und Einfachheit halber [188].

Für die hier durchgeführten Experimente wurde auf das Polymer Polyvinylalkohol (PVA) [152] zurückgegriffen, das in einer die Effektivität und Anwendung unterschiedlicher Blockierungsreagenzien untersuchenden Studie [153] neben BSA und Casein als das effektivste und Unspezifitäten minimierende Reagenz ermittelt wurde. Erwartungsgemäß konnte bei der Anwendung der polyklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY in einem indirekten ELISA kein Unterschied in der Reaktivität bei Verwendung der Blockierungsreagenzien PVA bzw. BSA festgestellt und somit der Einsatz von PVA als adäquater Ersatz für BSA bestätigt werden. Die in Analogie durchgeführten ELISA-Analysen zur Reaktivität der spezifischen IgY[‡] und der PF4/DS-10-spezifischen IgY ergaben wider Erwarten einen sich signifikant unterscheidenden Reaktivitätsverlauf. Dieser Effekt kann nicht notwendigerweise und ausschließlich auf die Eigenschaft des Polyvinylalkohols, unspezifische Bindungen zu reduzieren (möglicherweise in stärkerem Maße als BSA), zurückgeführt werden. Denn wäre dies tatsächlich der Fall, so müsste angenommen werden, dass diejenigen Moleküle in den IgY-Präparationen, die die unspezifische Bindung bedingen, in Abhängigkeit der Immunisierung generiert würden. Und dann sollten sich bei der Analyse der Bet v 1a-spezifischen IgY beider Immunisierungen auch unterschiedliche Hintergrundreaktivitäten beobachten lassen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Zusätzlich konnte hier durch Kontrollanalysen gezeigt werden, dass naive IgY, die lediglich das natürliche Immunrepertoire des Tieres widerspiegeln, keine Reaktivitäten auf das Allergen bzw. das Maltose bindende Protein zeigten. Aus diesen Überlegungen heraus wurde vermutet, dass die beobachteten Reaktivitätsverläufe der durch Immunisierungen generierten polyklonalen Antikörper vielmehr auf die Affinität zurückzuführen sind und Polyvinylalkohol als Blockierungsreagenz

niederaffinere IgY durch bisher nicht spezifizierete Wechselwirkungen abschirmt. Welchen Einfluss der amphipathische Charakter von PVA tatsächlich auf die Reduktion unspezifischer Bindungen und eine eventuell parallele Interferenz mit dem immobilisierten Antigen hat, müsste in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden. Wenn die gezeigte verminderte Reaktivität der spezifischen IgY bei Verwendung von PVA anstelle von BSA sich nur durch die Affinität erklären ließe, sollte es möglich sein, erstmals ein System zur (semi-)quantitativen Bewertung der Affinitäten polyklonaler und durch Immunisierung generierter Antikörper auf der Basis eines Enzymimmunoassays und der Verwendung zweier unterschiedlicher Blockierungsreagenzien zu realisieren.

5.2.5 Interaktion und Affinität der polyklonalen avianen Antikörper

Da die Immunisierung von Tieren zur Produktion polyklonaler Antikörper neben einer möglichst hohen Spezifität auch eine hohe Affinität zum Ziel hat, sollte im weiteren Verlauf eine Möglichkeit zur Bestimmung der Affinität der polyklonalen Antikörper gefunden werden. Zudem sollten anhand einer geeigneten Affinitätsmessung weitere Erkenntnisse zu dem Phänomen des Effektes des Blockierungsreagenzes PVA auf die Reaktivität der IgY gewonnen werden. Weiter sollte untersucht werden, in welcher Weise die Affinität polyklonaler Antikörper durch Anreicherung der spezifischen AKs durch immunaffinitätschromatographische Methoden verbessert und damit erhöht werden könnte.

Während für monoklonale heterotetramere Antikörper auf Grund ihrer singulären Spezifität zwei Affinitätskonstanten resultieren, die der bivalenten Charakteristik Rechnung tragen, können bei Vorliegen einer polyklonalen Antikörperpräparation nur zwei apparente dem Durchschnitt entsprechende Konstanten bestimmt werden. Apparente Konstanten charakterisieren lediglich die Probe als Kollektiv; eine Aussage in Bezug auf die Einzelantikörper kann nicht getroffen werden. Die Affinitäten der in dieser Arbeit verwendeten avianen Antikörper mit Spezifität für Bet v 1a bzw. PF4/DS-10 sollten mit Hilfe der biophysikalischen Methode der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) bestimmt werden. Da diese Methode die Wechselwirkung von Antigen und Antikörper mit Hilfe eines Sensorchips analysiert, auf dem einer der beiden Interaktionspartner kovalent (direkt) oder quasikovalent (indirekt) immobilisiert vorliegt [189], und dieser nach jeder Messung regeneriert werden muss, sollte im Vorfeld via Interaktionsanalyse die Bindung zwischen Bet v 1a-MBP und den spezifischen IgY untersucht werden.

Interaktionsanalyse Antikörper – Antigen

Die Analyse der Interaktion zwischen dem Allergen Bet v 1a-MBP und den spezifischen IgY der Immunisierung diente der Evaluation unterschiedlicher Reagenzien zum effektiven Lösen der Antigen-Antikörper-Bindung, wie sie für eine Affinitätschromatographie bzw. für die SPR-Spektroskopie relevant ist. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die optimalen Bedingungen einerseits eine sehr gute Aufhebung der Wechselwirkung und andererseits den vollständigen Funktionalitätserhalt von Paratop und Epitop gewährleisten.

Weit verbreitet und für einige Anwendungen bereits etabliert ist die Ablösung spezifischer Antikörper durch sogenannten *pH-shift* [190]. Am Beispiel der Bet v 1a-spezifischen IgY konnte mittels ELISA-Analyse gezeigt werden, dass immobilisiertes Bet v 1a-MBP, das auf der Polystyroloberfläche mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte inkubiert wurde, zu keiner deutlichen Minderung der Signalintensität nach Bindung durch die Bet v 1a-spezifischen IgY führte. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass immobilisiertes Protein während der Inkubation in verschiedenen pH-Milieus (2.5 bis 10) weder von der Polystyroloberfläche gelöst wurde noch durch extreme pH-Wert-Verlagerung eine zum Verlust der Epitopfunktionalität führende Konformationsänderung erfuhr. Wurden jedoch die spezifischen IgY vor der Bindung an das auf der Polystyroloberfläche gebundene Antigen mit den gleichen Puffern im zuvor gewählten pH-Bereich inkubiert und anschließend neutralisiert, so musste eine drastische Abnahme der Reaktivität unterhalb eines pH-Wertes von 3.5 festgestellt werden. Im Vergleich zu ähnlichen Studien konnte ebenfalls eine deutliche Destabilisierung avianer IgY festgestellt werden [191, 192]. Andere Studien hingegen zeigten wiederum, dass eine Elution spezifischer IgY selbst bei pH-Werten von 2.8 erfolgreich verliefen [190]; dies konnte aber in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Austestung basischer Puffer zeigte bereits die abnehmende Stabilität des Allergens mit steigendem pH-Wert, so dass insgesamt der Ansatz, die Interaktion von Antigen und Antikörper durch *pH-shift* aufzuheben, verworfen werden musste. Eine alternative Methode wurde in der Kombination der Änderung der Ionenstärke und chaotroper Effekte gesehen, da diese meist unter sehr milden Bedingungen durchgeführt werden kann [193]. Chaotrope Reagenzien besitzen die Eigenschaft, die Struktur des Wassers aufzubrechen und auf diese Weise hydrophobe Wechselwirkungen zu destabilisieren. Infolgedessen können auch die Sekundärstruktur und höhere Strukturen von Proteinen (reversibel) destabilisiert werden. Die Verwendung divalenter Kationen wie Magnesium und

Calcium in MgCl_2 und CaCl_2 als effektive Eluenten antigengebundener Antikörper wurde berichtet [194–196], wobei der Erfolg auf mehrere Faktoren zurückzuführen schien. Neben der Erhöhung der Ionenstärke wird mit einer 2–3 M Lösung von MgCl_2 eine 4–6 M Konzentration an Chloridionen erzielt, die bereits hoch genug ist, chaotrope Effekte zu zeigen. Zweitens ist der chaotrope Effekt divalenter Kationen stärker als der von beispielsweise Natrium und Kalium und bei derartigen Konzentrationen größer, um für die Antigen-Antikörper-Bindung relevant zu sein [197]. Darüber hinaus tritt bei hoch konzentrierten Lösungen von Magnesiumchlorid zusätzlich ein den pH-Wert senkender Effekt ein [196].

Im Rahmen der Interaktionsanalyse wurde in dieser Arbeit daher der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen wässriger magnesiumchloridhaltiger Lösungen am Beispiel der Bet v 1a-spezifischen IgY untersucht. ELISA-Analysen haben gezeigt, dass eine 4.5 M Lösung von Magnesiumchlorid die Bindung der spezifischen IgY an das korrespondierende Allergen unterdrückt. Aviane spezifische IgY, die zuvor bei gleicher Konzentration mit Magnesiumchlorid inkubiert und anschließend gegen neutralen Puffer dialysiert wurden, zeigten dieselbe Reaktivität auf Bet v 1a wie unbehandelte IgY. Zudem hatte die MgCl_2 -Konzentration keinen nachteiligen Einfluss auf die Funktionalität des Allergens (Daten nicht gezeigt). Niedrigere Konzentrationen an Magnesiumchlorid in einem Bereich von 2.0 M bis 4.0 M erzielten den gleichen Effekt wie eine 4.5 M Lösung. Wurde die Konzentration auf 1.0 M gesenkt, konnte ein im Vergleich nur geringer Anstieg der Signalintensität beobachtet werden. Bet v 1a-spezifische IgY, die nicht in Anwesenheit von MgCl_2 , sondern erst nach Bindung an das immobilisierte Allergen mit unterschiedlichen Konzentrationen MgCl_2 gewaschen wurden, zeigten einen deutlich anderen Reaktivitätsverlauf im ELISA. Erst eine 4.5 M Lösung von Magnesiumchlorid konnte durch Ablösung spezifischer IgY die Reaktivität um über 80 % reduzieren. Höhere Konzentrationen Magnesiumchlorid wurden wegen der stark zunehmenden Viskosität und der daraus resultierenden eingeschränkten Anwendbarkeit wegen nicht weiter getestet. Zudem wird bereits mit einer 5.7 M Lösung die Löslichkeit des Magnesiumchlorids erreicht und die Gefahr der Präzipitation in Anwesenheit weiterer Moleküle erhöht.

Mit den hier durchgeführten Interaktionsanalysen zur Antikörper-Antigen-Bindung wurde Magnesiumchlorid als effektives Reagenz zur Elution antigengebundener Antikörper unter milden Bedingungen evaluiert.

Bestimmung der Affinität polyklonaler Antikörper durch SPR-Spektroskopie

Für die Beurteilung der Anwendbarkeit polyklonaler IgY in der immunologischen Diagnostik ist die Frage nach der Affinität von Interesse. Hierbei darf jedoch nicht vergessen werden, dass die Affinität polyklonaler Antikörper nicht tatsächlich gemessen werden kann, da diese der Polyklonalität wegen nicht nur ein Epitop erkennen. Im Gegensatz dazu kann die Affinität monoklonaler Antikörper, die sich auf die singuläre Antikörper-Antigen-Bindung bezieht, bestimmt werden und korreliert direkt mit der Bindungsstärke. Die als apparente Affinität bezeichnete Eigenschaft polyklonaler Antikörper bezieht sich eher auf die Avidität, welche die Kombination der einzelnen Affinitäten und Valenzen jedes monoklonalen Antikörpers im Kollektiv beschreibt. In Abhängigkeit des Antigens können IgY ein mono- oder bivalentes Bindungsverhalten zeigen, aus dem bei niedriger Affinität dennoch eine hohe Bindungsstärke resultieren kann.

Zur Einschätzung der apparenten Affinität der durch Immunisierung erhaltenen Bet v 1a-spezifischen Antikörper wurde diese mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie bestimmt. Die Messungen ergaben für die in der ersten Immunisierung generierten Bet v 1a-spezifischen IgY die kinetischen Parameter für die Assoziation und Dissoziation mit $k_a = 2.29 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_d = 3.57 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Die daraus errechnete Dissoziationskonstante betrug $K_D = 156 \text{ nM}$, womit die Antikörper im mittleren bis hochaffinen Bereich lagen. Für die polyklonale IgY[±]-Fraktion der zweiten Immunisierung konnte kein Assoziations- und Dissoziationsverhalten gemessen werden, dessen Auswertung zu realistischen kinetischen Parameterwerten geführt hätte.

Zur Beurteilung der angewandten Spektroskopie-Methode zur Abschätzung der mittleren Affinität polyklonaler Antikörper müssen zwei Hauptaspekte betrachtet werden. Erstens muss die Methode *per se* und die entsprechende Durchführung analysiert werden. Zweitens müssen die erhaltenen Resultate aus Sicht der Immunisierung interpretiert werden. Bei Interaktionsanalysen der Antigen-Antikörper-Bindung wird oftmals die Kopplung des zu untersuchenden Antikörpers auf der Chipoberfläche empfohlen, um den Effekt der bivalenten Wechselwirkung zu vermeiden [198] und die Auswertung der Daten zu vereinfachen. Für die Durchführung wurde hier jedoch zweckmäßigerweise das Allergen kovalent auf dem Sensorchip immobilisiert, da polyklonale Antikörper vermessen wurden. Die Kopplung des Antigens war in diesem Falle vorzuziehen, da es sich nur um ein definiertes Protein handelte und Unterschiede für die Messung lediglich in der Belegungs-

dichte auftreten sollten. Im Gegensatz dazu ist die Zusammensetzung polyklonaler Antikörper nicht definiert und eine Immobilisierung würde auch zur Belegung der Chipoberfläche mit unspezifischen IgY führen.

Die Bestimmung von Affinitäten in der SPR-Spektroskopie erlaubt zwei Methoden der Berechnung. Einerseits kann die Analyse auf Grund des Gleichgewichtszustands der Antigen-Antikörper-Bindung ermittelt werden. Der zweite Weg führt über die Berechnung der kinetischen Parameter für die Assoziation und Dissoziation. In den durchgeführten Messungen konnte das Gleichgewicht während des Assoziationsvorgangs der spezifischen IgY an Bet v 1a nicht erreicht werden, woraufhin die Analyse der kinetischen Parameter erfolgte. Die Berechnung der kinetischen Parameter und damit der apparenten Dissoziationskonstante aus den erhaltenen Sensorgrammen erfolgte computergestützt und durch nicht-lineare Regression auf Basis eines LANGMUIR'schen Absorptionsverhaltens. Die Güte einer Regression kann durch Berechnung des χ^2 -Wertes beurteilt werden und liegt bei absoluter Übereinstimmung der Messwerte mit der ermittelten Funktion bei 1. Der aus den Daten errechnete χ^2 -Wert betrug für die Regression unter Annahme eines 1:1-Bindungsmodells 2.19. Eine ebenfalls durchgeführte Regressionsanalyse für ein bivalentes Bindungsmodell bewirkte keine Optimierung des χ^2 -Wertes (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung zeigte also, dass die erhaltenen Daten der Interaktionsanalyse für die Bindung der polyklonalen spezifischen IgY an Bet v 1a-MBP eher einem monovalenten Verhalten entsprachen. Ob während einer SPR-Messung monovalente oder bivalente Bindungsverhalten auftreten, hängt von mehreren Faktoren ab: zum einen von der Belegungsdichte auf dem Sensor-Chip, zum anderen von der eingesetzten Konzentration des Analyten. Allgemein lässt sich bei hohen Analytkonzentrationen eher eine monovalente Bindung beobachten, da die Antikörper um das jeweilige Epitop konkurrieren. Diese Tendenz kann durch eine niedrige Belegungsdichte mit dem Allergen noch verstärkt werden. Werden hingegen niedrige Konzentrationen des Analyten verwendet, ist die Konkurrenz um die Bindungsstelle geringer und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bivalenten Modus größer. Analog wird dieser Effekt durch eine höhere Belegungsdichte gefördert. Eine exakte Vorhersage des Bindungsmodus ist allerdings nicht möglich. Ebenso können auch Kombinationen mono- wie auch bivalenter Bindung auftreten.

Die polyklonalen Antikörper wurden in einer Konzentration von bis zu 1 000 nM eingesetzt, was bei einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer Teilchenzahl von $15 \cdot 10^{12}$ entsprach. Pro Minute konkurrierten demnach ungefähr $15 \cdot 10^{12}$ Antikörper um die Epitope des Allergens, wodurch der überwiegende Effekt des monovalenten

Modus erklärt werden kann. Die hohen Analytkonzentrationen sind darin begründet, dass bei Analyse eines polyklonalen Antikörpergemisches nur ein Teil spezifisch und ausreichend affin für die Bindung an das Allergen ist. Niedrigere Analytkonzentrationen könnten zwar den beobachteten Effekt des refraktiven Index durch die Probe und die im Sensorgramm auftretenden Signalsprünge zu Beginn und Ende der Assoziationsphase reduzieren, jedoch würde auch das Messsignal insgesamt abnehmen. Im schlechtesten Falle könnten keine auswertbaren Bindungskurven erhalten werden. In den durchgeführten Experimenten der SPR-Spektroskopie konnte dies für die Bet v 1a-spezifischen polyklonalen IgY[‡] der zweiten Immunisierung beobachtet werden. Trotz der 10fach höheren Konzentration der Antikörper konnte keine Bindung beobachtet werden. Die PF4/DS-10-spezifischen IgY wurden daher nicht mittels SPR-Spektroskopie untersucht. Im Vergleich harmonisieren die durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie erhaltenen Resultate mit den Ergebnissen der ELISA-Analysen bei Verwendung der Blockierungsreagenzien PVA und BSA.

Mancherorts wird von der niedrigen Affinität avianer antigenspezifischer Antikörper berichtet. Dessen ungeachtet können jedoch, wenn das zur Immunisierung eingesetzte Antigen auf Grund der Phylogenie des Huhns eine geringere Verwandtschaft aufweist als zu Mammalia Antikörper mit einer breiteren Multivalenz erhalten werden [95]. In Säugetieren wird die ausgesprochen hohe Antikörperdiversität hauptsächlich durch die Rekombination der V_H und V_L codierenden Gensegmente sowie durch anschließende somatische Hypermutation erzeugt. Im Gegensatz zu Mammalia weisen Hühner einzig ein funktionelles V_H- bzw. V_L-Gen auf. Daneben existieren allerdings einige Pseudo-V-Gene, denen die regulatorische Transkriptions- und Signalsequenz fehlen. Die Antikörperdiversität wird im avianen Immunsystem durch Genkonversion und darüber hinaus - den Säugetieren ähnlich - durch Kombination der V-Segmente mit J-Abschnitten und durch somatische Punktmutation erreicht [85, 95]. Hierdurch können Hühner oftmals polyklonale Antikörper generieren, die auch andere als die durch Mammalia-Antikörper erkannten Epitope binden.

Mit Hilfe der Interaktionsanalysen durch Ausnutzung der Oberflächenplasmonenresonanz wurde gezeigt, dass die SPR-Spektroskopie nur eingeschränkt zur Abschätzung der Affinität spezifischer polyklonaler Antikörper anwendbar ist. Verminderte Reaktivitätsphänomene, die durch Einsatz von PVA und BSA als Blockierungsreagenzien gemessen werden konnten und anhand derer qualitative Aussagen über die Affinitäten gemacht wurden, konnten nur im Fall der mittel- bis

hochaffinen Bet v 1a-spezifischen IgY durch SPR-Messungen bestätigt werden. Dies zeigt, dass sich die Abschätzung der Affinitäten polyklonaler Antikörperpräparationen mittels SPR-Spektroskopie dann schwierig gestaltet, wenn eine Mindestaffinität nicht erreicht wird.

Affinitätschromatographie mit polyklonalen IgY

Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie unter Verwendung des rekombinant produzierten Bet v 1a-MBP sollte versucht werden, die spezifisch generierten polyklonalen IgY hinsichtlich ihrer Affinität anzureichern und damit die apparente Affinität zu verbessern. Zwar konnte mit dem für affinitätsbasierte Chromatographiemethoden konzipierte Affi-Gel® eine Bet v 1a-spezifische Matrix hergestellt werden und die Immobilisierung des Allergens durch einen Enzymimmunoassay bestätigt werden, jedoch konnte keine Anreicherung spezifischer und affiner IgY beobachtet werden. In den Elutionsfraktionen wurden Bet v 1a-spezifische IgY nachgewiesen und mit Hilfe der SPR-Spektroskopie untersucht. Die analysierten Fraktionen verhielten sich bzgl. Assoziation jedoch vergleichbar mit den aus der zweiten Immunisierung mit Bet v 1a erhaltenen IgY. Bei unterschiedlichen Konzentrationen konnten keine auswertbaren Sensorgrammdaten erhalten werden. Zur Elution der gebundenen Antikörper wurde 4.5 M Magnesiumchlorid verwendet, das sich im ELISA und in der SPR-Analyse als effektives Reagenz zur Lösung der Antikörper-Antigen-Bindung herausgestellt hatte. Möglicherweise ist unter den Bedingungen der hier durchgeführten Affinitätschromatographie eine vollständige Ablösung der Antikörper von der Matrix nicht realisierbar gewesen, da der beschriebene kombinierte Effekt des Magnesiumchlorid nicht ausreichend wirksam ist. Im Gegensatz zur Elution, bei der die MgCl₂-haltige Lösung die Säulenmatrix passiert, wird der interaktionsunterdrückende Effekt im ELISA durch die Waschschrte bzw. in der SPR-Methode durch den kontinuierlichen Fluss der Lösung eventuell verstärkt. Desweiteren ist eine Aussage über die tatsächlich kovalent immobilisierte und für die Wechselwirkung mit den Antikörpern zur Verfügung stehenden Antigenmoleküle nicht möglich. Die Messung der Proteinkonzentration vor und nach Immobilisierung auf der Matrix reicht allein nicht zur Beurteilung dieses Problems aus. In weiteren Experimenten müsste man die Generierung der spezifischen Chromatographiematrix wiederholen. Neben Konzentrationsbestimmungen vor und nach Kopplung sollte man auch die Stabilität der Matrix und die kovalente Knüpfung untersuchen. Eventuell könnten noch weitere Elutionsreagenzien gesucht werden,

wobei die Verwendung saurer und basischer Puffer mit Vorsicht in Betracht zu ziehen ist. Während die Etablierung zuverlässiger IgY-spezifischer Chromatographiemethoden in Analogie zu der Protein A- und G-Reinigung anderer Isotypen bereits vorangeschritten ist [199], bleibt die allergenspezifische Chromatographie stets eine Herausforderung.

5.3 Aviane Immunglobuline für die immunologische Diagnostik

Die Verwendung polyklonaler Antikörper in der immunologischen Diagnostik, die Zunahme verschärfter Gesetze und Richtlinien zum Schutze des Tieres und der Mangel an adäquaten Standardreagenzien haben zu dem Interesse am Huhn als Lieferant polyklonaler Antikörper geführt. In dem zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten Konzepte zur Adaption der avianen IgY an die in der Allergologie, Autoimmunologie und Infektiologie relevanten humanen Isotypspezifitäten entwickelt werden.

5.3.1 Chemische Kopplung von Antikörpern

Eine Möglichkeit, allgemein Proteine und damit auch Antikörper kovalent miteinander zu verknüpfen, ist die chemische Kopplung [200]. Unter den zur Verfügung stehenden Reaktionsmechanismen für die kovalente Kopplung werden einige durch die funktionellen Gruppen der Primärsequenz eines Proteins bestimmt, die ohne die vorangehende Generierung funktioneller Gruppen auskommen. Hierzu zählen Methoden, die die Reaktivität der inhärenten Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl- oder Thiol-Gruppen ausnutzen. Aminosäuren, die diese Funktionalität in ihren Seitenketten besitzen, sind beispielsweise Cysteine mit ihrer β -Thiolgruppe, Serin und Threonin mit einer Hydroxylgruppe, Aspartat und Glutamat mit einer Carboxylgruppe und Lysin mit einer ϵ -Aminogruppe. Letztere haben den Vorteil, auf Grund der vier zwischen dem Stereozentrum und der endständigen Aminogruppe befindlichen Methylenheiten, meist gut zugänglich zu sein.

Aminoreaktive Kopplung durch Glutardialdehyd

Die kovalente Verknüpfung zweier Aminogruppen konnte bereits durch die Verwendung des homobifunktionellen Reagenzes Glutardialdehyd [201–203] gezeigt werden. Dieses Reagenz besitzt zwei terminale Carbonylfunktionen, die unter Ausbildung einer Iminbrücke durch Nucleophile angegriffen werden können. Der Vorteil der Reaktion besteht in der einfachen Durchführung der Kopplung, da vor Zugabe des Glutardialdehyds die zu koppelnden Proteine nur in Lösung und bei geeignetem pH-Wert vorgelegt werden müssen [200].

Zur Untersuchung der Kopplungseffizienz von Antikörpern durch Glutardialdehyd wurden aviane Immunglobuline des Typs Y verwendet. Die IgY wurden in unterschiedlichen Konzentrationen von GDA inkubiert und die Reaktion gelelektrophoretisch analysiert. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass sowohl in neutralem Milieu (pH 7.5) als auch bei basischem pH-Wert (pH 10) Konjugate der Antikörper erhalten werden konnten. Erwartungsgemäß wurde im Vergleich zu eher neutralen Bedingungen bei basischem pH-Wert das Auftreten oligomerisierter Antikörper bei niedrigeren Konzentrationen des Aldehyds beobachtet. Der apparente isoelektrische Punkt avianer IgY liegt zwischen 5.7 und 7.4 [154]. Antikörper, die mit ihrem isoelektrischen Punkt nahe an dem durch den Puffer bestimmten pH-Wert liegen, erscheinen nach außen hin neutral geladen. In Analogie zu der Struktur von Betain liegen die Carboxylgruppen als negativ geladene Carboxylate und die Aminogruppen als positiv geladene Ammoniumionen vor. Lysinreste, deren Seitenketten in protonierter Form vorliegen, besitzen keine Nucleophilie mehr und gehen im Sinne eines nucleophilen Angriffs keine Reaktion mit dem Carbonylkohlenstoffatom des Glutardialdehyds mehr ein. Durch die Erhöhung des pH-Wertes ließ sich eine höhere Kopplungseffizienz der Antikörper erhalten, was zeigt, dass der Bicarbonatpuffer besser für die Kopplung geeignet war. In beiden Fällen wurden durch die kovalente Verknüpfung zwei Oligomerisierungsprodukte erhalten, von denen das mit der höheren gelelektrophoretischen Mobilität dem Dimer zweier IgY gleichkommen und der gewünschten Verknüpfung zweier Immunglobuline entsprechen könnte. Welche Zusammensetzung dieses Konjugat tatsächlich besitzt, bleibt in weiteren Experimenten zu klären. Hinsichtlich des zweiten Produktes, das in wesentlich größeren Mengen entstand, handelt es sich um ein Konjugat bzw. mehrere Konjugate, die die Verknüpfung mehrerer Antikörper umfassen. Zudem zeigte sich bereits das Auftreten von Insolubilisierungsphänomenen und der in der SDS-PAGE nicht mehr messbaren Mobilität dieser Konjugate. Die Verwendung

von Glutaraldehyd zur Markierung von Antikörpern mit den Enzymen Meerrettichperoxidase und Alkalische Phosphatase sind in der Literatur als effizientes Reagenz unter Erhalt eines Großteils der immunologischen Funktionalität und enzymatischen Aktivität beschrieben worden [204–206]. Allerdings wurde auch berichtet, dass durch diese Art der Kopplung Präzipitate auftreten [204], die folglich nicht mehr zum Einsatz in unterschiedlichen Assays herangezogen werden können. Die kovalenten Kopplungsprodukte können unter bestimmten Bedingungen wie der Anwesenheit interferierender Nucleophile meist eine verminderte Stabilität aufweisen [200]. Dieser auf die Iminbrücke zurückzuführende Instabilität wird häufig mit sich anschließenden Behandlungen mit reduzierenden Reagenzien wie Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid [207] und sogar Ascorbinsäure [208] begegnet und beruht auf der Reduktion der Iminbindung zur der stabileren Aminbindung. Die Wahl des Reduktionsreagenzes ist dennoch für jeden Antikörper hinsichtlich der Stabilität zu testen [207]. Im Gegensatz dazu wurden allerdings auch via Glutaraldehyd verknüpfte Proteine untersucht, deren Stabilität nicht allein durch Iminbrücken erklärt werden konnte, sondern auch durch α,β -ungesättigte Glutaraldehydpolymere [201–203]. Im Jahr 2004 konnten von MIGNEAULT *et al.* der pH-abhängige Mechanismus für das Auftreten von Glutaraldehyd und potentiellen Varianten in Lösung aufgeklärt werden [209]. Die in dieser Arbeit dargestellten Konjugate wurden für die Analysen nicht zuvor reduziert, und es konnten gelelektrophoretisch keine Instabilitäten beobachtet werden.

Zusammenfassend musste für die hier angewandte Glutaraldehyd-Kopplung festgestellt werden, dass trotz der Effizienz diese Methode nur eingeschränkt zur kovalenten Verknüpfung von Antikörpern geeignet erscheint. Das Verhältnis auftretender Konjugate ist in Betracht des Reaktionsverlaufes nicht vorhersagbar und die Reaktion dementsprechend schwierig zu steuern. Zudem kann auch eine Beeinträchtigung der Paratopunktionalität stattfinden.

Glycolspaltung nach MALAPRADE und aminoreaktive Kopplung

Als alternativer Ansatz zur Glutaraldehyd-Methode wurde die Glycolspaltung nach MALAPRADE und die anschließende aminoreaktive Kopplung der Antikörper untersucht. Die Glycolspaltung bietet den Vorteil, selektiv die Fc-residenten Kohlenhydratstrukturen durch Umsatz mit Periodat in einer Oxidationsreaktion zu spalten und Aldehydgruppen zu generieren [129, 130]. Da aviane Organismen ähnlich den Mammalia ebenfalls Glycostrukturen im Fc-Bereich der produzierten

Antikörper tragen [210, 211], wurde hier die Möglichkeit gesehen, IgY durch oxidative Spaltung der Glycane einer aminoreaktiven Kopplung mit einem weiteren Antikörper zugänglich zu machen.

Im selben Kontext der Adaption avianer Antikörper für immunologisch relevante Assayspezifitäten wurden in dieser Arbeit polyklonale IgY durch oxidative Spaltung mit Natrium-*meta*-periodat modifiziert. Die Kontrolle der Spaltung und damit der Nachweis von Aldehydgruppen gelingt allgemein durch die Verwendung des Reagenzes 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald®), das durch Reaktion mit einer Aldehydgruppe in Anwesenheit von Luftsauerstoff das Derivat eines im visuellen Bereich absorbierenden Triazoltetrazins bildet [212, 213]. Die hier oxidierten IgY konnten jedoch nicht mit diesem Reagenz nachgewiesen werden, da mit den eingesetzten und üblicherweise verwendeten Antikörperkonzentrationen von unter 1 mg/mL die Nachweisgrenze des spezifischen und sensitiven Reagenzes von 10^{-4} M deutlich unterschritten wurde [212]. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration würde eventuell die Detektion ermöglichen, scheint aber zur Untersuchung der IgY-Spaltung nicht zweckmäßig. Die Kontrolle wurde auf der Ebene der Kopplungsprodukte vorgenommen, da eine Verknüpfung der Antikörper nur nach erfolgreicher Glycolspaltung möglich sein sollte. Nach gelelektrophoretischer Analyse sowie Proteinfärbung und Immunblot konnte die Verknüpfung der Antikörper durch Glycolspaltung und anschließender Iminbildung beobachtet werden. Zudem konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die im Gegensatz zur Glutardialdehyd-Methode erhaltenen Konjugate keinen Insolubilisierungseffekt zeigten. Auf Basis der elektrophoretischen Mobilität wurde vermutet, dass die Kopplungsprodukte dem Dimer zweier Antikörper entsprechen könnten. Des Weiteren wurde die höhere Effizienz der Kopplung erfolgreich gezeigt, die ob des isoelektrischen Bereiches avianer IgY in basischerem Milieu besser ablief. Die vollständige Umsetzung der freien Antikörper zu einem Konjugat gelang jedoch nicht. Der mögliche Widerspruch intensiver gefärbter Coomassiebanden für die Antikörperkonjugate als für die freien IgY-Moleküle im Vergleich zu den im Immunblot erhaltenen umgekehrten Bandenintensitäten, könnte auf die Modifizierung am Fc-Part und den damit einhergehenden Verlust des Glycotops und/oder einer konformationellen Änderung zurückgehen. Ob der verwendete sekundäre und Fc α -spezifische Antikörper durch Verlust der ursprünglichen Kohlenhydratstruktur weniger sensitiv reagiert, ist nicht bekannt.

Insgesamt konnte mit dem Konzept der Antikörperverknüpfung durch Kombination der oxidativen Glycolspaltung und aminoreaktiver Kopplung ein der Glutardi-

aldehyd-Methode überlegener Ansatz entwickelt werden. Durch selektive Generierung der Aldehydgruppen im Fc-Bereich können spezifische IgY ohne die Gefahr des Verlustes der Paratopfunktionalität modifiziert werden und mit der zweiten Komponente, d. h. mit den humanen Isotypen über deren Aminogruppen kovalent verknüpft werden. Die bei der Glutardialdehyd-Methode nachteilige Konstellation, dass zwei Antikörper des gleichen Isotyps miteinander verbunden werden, besteht auch hier, jedoch sollte die Wahrscheinlichkeit durch die reaktive terminale Carbonylgruppe an nur einem der beiden Komponenten und durch den im Vergleich im Überschuss vorhandenen Aminofunktionen der anderen Komponente minimiert werden. In weiteren Untersuchungen sollte man die Effizienz der vollständigen kovalenten Verknüpfung optimieren. Ebenso könnte der stabilisierende Effekt durch Reduktion der Imin- zur sekundären Aminbindung analysiert werden.

5.3.2 Hapten-Derivatisierung allergenspezifischer Antikörper

Neben den Methoden zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen besteht die Möglichkeit, Allergenspezifität durch IgY mit der Isotypspezifität für humane Immunglobuline zu verbinden, auch in der Modifizierung durch Haptene. Mit einem hapten-spezifischen humanen Antikörper, z. B. humaner IgE im allergologischen Kontext, können dann die spezifischen polyklonalen IgY gebunden und die Assaykompatibilität erreicht werden. Haptene besitzen den Vorteil, vergleichbar den Antigenen ebenfalls spezifisch durch Antikörper erkannt zu werden [214–216]. Der entscheidende Unterschied der Haptene zu Antigenen, auf Grund ihrer Größe keine Quervernetzung zu bewirken und keine immunologische Antwort zu initiieren, ist für das hier verfolgte Ziel von keiner Relevanz. Vielmehr ist die Größe ein entscheidender Vorteil der Haptene, da sie den zu modifizierenden Antikörper weniger in Konformation und Funktionalität beeinträchtigen sollten.

Eines der kleinsten bekannten Haptene ist der Explosivsprengstoff TNT (2,4,6-Trinitrotoluol), der seiner Eigenschaft als Umweltschadstoff wegen im Interesse der Spurenanalytik steht. Im Bereich der immunologischen Analytik konnten – unter anderem auch im hiesigen Arbeitskreis – bereits sensitive und hochaffine Antikörper gegen dieses Hapten und seine Analoga TNP (2,4,6-Trinitrophenyl) und DNP (2,4-Dinitrophenyl) selektiert werden [217–219]. Der hier verfolgte Ansatz der Verknüpfung avianer allergenspezifischer IgY und humaner IgE-Antikörper sollte hier durch Hapten-Modifizierung der polyklonalen IgY untersucht werden.

Die aus der Immunisierung erhaltenen Bet v 1a-spezifischen IgY wurden erfolgreich mit dem Reagenz 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure umgesetzt, welches im mechanistischen Sinne einer nucleophilen Substitutionsreaktion die TNT-analoge Trinitrophenyl-Gruppe in das Protein einführte. Es konnte gezeigt werden, das TNP-markierte IgY in einem direkten ELISA sowohl isotypspezifisch durch anti-IgY als auch haptenspezifisch durch einen im Arbeitskreis bereits vorliegenden TNP-spezifischen Antikörper detektiert wurden. In einem indirekten ELISA mit dem immobilisierten Allergen Bet v 1a-MBP wurde allerdings der Verlust der allergenspezifischen Reaktivität nach entsprechender Hapten-Modifizierung festgestellt. TNP-markierte IgY konnten in diesem indirekten ELISA haptenspezifisch nicht nachgewiesen werden. Die Detektion mit dem anti-IgY-Antikörper erfolgte auch nur sehr schwach. Auf Grund dieses Resultats wurde angenommen, dass das unselektive, da nur aminoreaktive Reagenz TNBS zu einem nachteiligen Effekt auf die Paratop-funktionalität selbst oder die Interaktion des Antikörpers mit dem Allergen führte. Möglicherweise kommt die Hydrophobizität der TNP-Gruppe so stark zum Tragen, als dass die Bindung zum Allergen verhindert wird. Welcher Natur dieser Effekt ist, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Trotz Verlust der Allergenbindung muss sich die hydrophobe Eigenschaft der Trinitrophenylgruppe nicht zwingend auf die Fähigkeit auswirken, an die Oberfläche der Mikrotiterplatte zu binden. Durch den für ELISA-Mikrotiterplatten häufig verwendeten Kunststoff Polystyrol sind nämlich vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen für die Proteinimmobilisierung wichtig [220–222].

Die bereits bei der chemischen Kopplung von Antikörpern angewandte Methode der oxidativen Glycolspaltung erlaubt durch die Generierung reaktiver Carbonylgruppen auch die aminoreaktive Modifizierung mit Haptenen. Mit diesem Konzept der Haptenmarkierung sollte der Vorteil der Fc-selektiven TNPylung der polyklonalen Antikörper evaluiert werden. Anstelle des zuvor verwendeten Sulfonsäurederivats TNBS musste ein Reagenz eingesetzt werden, das nicht aminoreaktiv ist, sondern selbst die Aminogruppe für die nucleophile Addition an die Carbonylgruppe enthält. Zu diesem Zweck sollte das TNBS mit dem bifunktionellen Reagenz 1,10-Decandiamin umgesetzt werden, um das TNP-Derivat *N*-(2,4,6-Trinitrophenyl)-1,10,decandiamin (TNPA) zu erhalten. Die erfolgreiche Synthese von TNPA wurde massenspektrometrisch bestätigt. Das unerwünschte Nebenprodukt des doppelt modifizierten Diamins wurde sogar mit weniger als 2 % gebildet. Die polyklonalen Bet v 1a-spezifischen Antikörper wurden dann mit dem TNPA nach vorangehender Glycolspaltung modifiziert. Ein Vergleich zwischen den un-

markierten und den TNP-modifizierten allergenspezifischen Antikörpern zeigte, dass ein Teil der IgY nicht oder nur sehr schwach markiert wurden, obwohl das TNPA in großem Überschuss eingesetzt wurde. Der Erfolg der Fc-selektiven Haptenmarkierung konnte dennoch im ELISA gezeigt werden. Sowohl in der direkten als auch in der indirekten ELISA-Analyse konnten die isotypspezifische und die haptenspezifische Detektion unter Erhalt der Allergenspezifität beobachtet werden. Darüber hinaus gelang die Haptenmarkierung auch in Anwesenheit der häufig als konservierende Zusätze verwendeten Reagenzien BSA und Natriumazid.

5.3.3 Kopplung durch Streptavidin-Biotin-Interaktion

Parallel zu den dargestellten Konzepten der chemischen Modifikation und der Haptenmarkierung zur Verknüpfung der Allergenspezifität (IgY) mit der Assayspezifität (huIgE etc.) wurde die Interaktion von Biotin und Streptavidin untersucht. Während die chemische Kopplung von Proteinen zu einer kovalenten Bindung führt, wird mit der Methode der Haptenmodifizierung lediglich das Hapten kovalent an das Protein gebunden; die entscheidende Verbindung von IgY und humanem Immunglobulin basiert dann auf einer nicht-kovalenten, sondern durch van-der-Waals-Kräfte, ionischen Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufenen Antigenerkennung. Zwischen der chemischen und der Haptenmodifizierung nimmt die Bindung der Biotin-Streptavidin-Interaktion eine Sonderstellung ein, da es sich bei dieser zwar um eine nicht-kovalente, aber wegen ihrer Dissoziationskonstante von 4×10^{-14} M um eine sehr starke, quasi-kovalente Bindung handelt [155]. Die Kopplung biotinylierter Antikörper sollte sich daher über die stabile Vernetzung durch Streptavidin realisieren lassen.

Das Anfügen des Vitamins Biotin an die allergenspezifischen polyklonalen und die humanen Antikörper erfolgte auf zwei Weisen, bei denen ebenfalls eine unselektive sowie eine Fc-selektive Modifizierung unterschieden werden konnte. Die unselektive Biotinylierung nutzte das photoinduzierbare Reagenz TFPA-PEG₃-Biotin, das in C-H- und N-H-Bindungen insertiert. Antikörper, die mit diesem Biotinylierungsreagenz umgesetzt wurden, zeigten in direkten ELISA-Analysen sowohl eine isotypspezifische als auch eine durch Extravidin vermittelte biotinspezifische Detektion. Die weiteren Untersuchungen im direkten ELISA entweder mit immobilisiertem Bet v 1a-MBP oder Streptavidin bestätigten die erfolgreiche Funktionalisierung durch Biotin unter Erhalt der Spezifität.

Die selektive Biotinylierung wurde in Analogie zur selektiven Haptenmodifizierung durchgeführt: durch Kombination der oxidativen Glycolspaltung nach MALAPRADE und anschließender Reaktion mit einem nucleophilen Biotinderivat. Als Biotinderivat wurde das (+)-Biotin- ϵ -aminocaprinsäurehydrazid (BACH) verwendet, das im Gegensatz zu Aminen eine noch höhere Nucleophilie durch den α -Effekt besitzt [223, 224]. Die polyklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY und polyklonale humane IgG wurden nach vorangehender Glycolspaltung mit dem BACH-Reagenz umgesetzt und der Erfolg der Biotinylierung im direkten sowie indirekten ELISA gezeigt. Sowohl die isotypspezifische als auch die biotinspezifische Reaktivität konnte deutlich beobachtet werden.

In einer abschließenden ELISA-Analyse sollte die Anwendung der biotinylierten Komponenten in Kombination mit Streptavidin als Quervernetzer demonstriert werden. Hierzu wurden die Reaktivitäten in einem sequentiellen bzw. parallelen Ansatz überprüft. Die mittels unselektiver Biotinylierung durch das photoinduzierbare Reagenz erhaltenen Antikörper konnten weder in der sequentiellen noch in der simultanen Anwendung hinsichtlich ihrer Bindung an das immobilisierte Allergen positiv getestet werden. Obwohl die zuvor durchgeführten Studien den Erfolg der Biotinylierung unter Erhalt der Paratopfunktionalität bestätigten, konnte durch Zugabe von Streptavidin kein allergenspezifisches und als humaner Isotyp detektierbares Reagenz erhalten werden. Die durch selektiv im Fc-Bereich biotinylierten Antikörper zeigten sowohl nach sequentieller als auch in der simultanen Anwendung beider Komponenten eine Reaktivität auf immobilisiertes Bet v 1a. Zudem konnte erfolgreich dargestellt werden, dass eine höhere Streptavidin-Konzentration in dem hier betrachteten Bereich in beiden Fällen zu einer Steigerung der Signalintensität führte. Da die Anzahl der im Fc-Bereich generierten Aldehydgruppen nicht bestimmbar ist, konnten bezüglich der Biotinmoleküldichte auf dem Antikörper keine Aussagen getroffen werden. Daher ist eine genaue Bestimmung der zur effektiven Kopplung der Antikörper führenden Streptavidinmenge nicht möglich. Bei Anwendung des vorgestellten Konzeptes zur Adaption spezifischer polyklonaler IgY an einen entsprechenden Assay ist für jede Charge biotinylierter Komponenten die einzusetzende Streptavidinkonzentration auszutesten, wobei unterschiedliche Szenarien der Kopplung auftreten können: zu wenig Streptavidin würde in erster Linie zur maximal erreichbaren Reaktivität führen, da nicht alle Komponenten miteinander verknüpft würden. Eine niedrige Konzentration ist jedoch in der Hinsicht vorteilhaft, als dass sichergestellt werden muss, dass Allergenspezifität sowie Isotypspezifität tatsächlich miteinander gekoppelt werden.

Höhere Konzentrationen würden zwar bis zu einem bestimmten kritischen Wert in einer Reaktivitätssteigerung resultieren, dann aber die Effizienz der Quervernetzung wieder vermindern, da den jeweiligen Biotinresten mehr und mehr Streptavidinmoleküle gegenüberstehen. Im Idealfall sollten je vier Moleküle Biotin den vier Bindungsstellen eines Streptavidinmoleküls gegenüberstehen [155]. Inwieweit alle Bindungsstellen des Streptavidins tatsächlich von den an den Antikörpern kovalent gebundenen Biotinmolekülen besetzt werden, hängt nicht zuletzt auch von den sterischen Verhältnissen benachbarter Antikörper ab.

5.4 Chimäre Antikörperkonstrukte mit Spezifität für IgY

Die aufgezeigten Möglichkeiten der Verknüpfung allergenspezifischer polyklonaler IgY mit den assayrelevanten humanen Isotypen basierten entweder auf der direkten Kopplung durch chemische Modifikation oder auf der indirekten Kopplung durch Haptenmodifizierungen in Kombination mit haptenspezifischen Antikörpern. Ungeachtet der Effizienz jedes einzelnen Verfahrens und des Funktionalitätserhalts beinhalteten alle Methoden die direkte Modifikation der einzusetzenden Komponenten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres vielversprechendes Konzept zur Umgehung des Modifikationsschrittes entwickelt und evaluiert. Die Ebene des Proteins verlassend, wurde dieses Konzept auf der Stufe der genetischen Information angegangen. Ziel war es, die Isotypspezifität am Beispiel des allergologisch relevanten humanen IgE und eine Spezifität für den Fc-Teil der IgY genetisch zu fusionieren. Der von VIERTLBÖCK erstmals im Huhn identifizierte und beschriebene Fc γ -Rezeptor CHIR-AB1 bindet hochaffin und spezifisch an die C $_H$ 3- und C $_H$ 4-Domänen avianer IgY [158, 225].

Die extrazelluläre Domäne des avianen Rezeptors CHIR-AB1 konnte, ausgehend von der lienenalen Gesamt-RNA, amplifiziert und in einen für das Mammaliensystem geeigneten Expressionsvektor zur Produktion der humanen Fc ϵ -Kette kloniert werden. In HEK-293-Zellen wurde dann die erfolgreiche Produktion des homodimeren, aus der CHIR-Domäne und den konstanten Bereichen C $_H$ 2 bis C $_H$ 4 bestehenden Antikörpers erzielt. Die Reaktivität des Konstruktes gegen IgY unmittelbar nach Transfektion und in Überständen der stabilen Zellkultur konnte erfolgreich im indirekten ELISA beobachtet werden. Die Bindung des Rezeptorkonstruktes sollte hierbei keine pH-Abhängigkeit zeigen, da auch für den avianen Rezeptor CHIR-AB1 in anderen Experimenten keine pH-abhängige Bindung an IgY bzw.

FcY gefunden wurde. Durch die hier eingesetzten Überstände mit einem pH-Wert zwischen 7.5 und 8.0 konnte dies bestätigt werden. Im Gegensatz zu CHIR-AB1 bindet ein weiterer bekannter Rezeptor im Huhn IgY in pH-abhängiger Weise [226, 227]. Dieser dem neonatalen Fc-Rezeptor der Säugetiere analoge und als FcRY bezeichnete Rezeptor ist im Eigelbsack membranständig und besitzt bei einem pH-Wert von 6.0 eine nanomolare Affinität für IgY. In leicht basischem Milieu, bereits ab pH 7.4, dissoziieren IgY von dem Rezeptor und eine Bindung ist nicht mehr nachweisbar [120]. Als Ursache wird hierfür im Vergleich zu FcRn ein eher konformationeller denn chemischer Effekt diskutiert [120, 228, 229]. Strukturanalysen an FcRY und CHIR-AB1 haben gezeigt, dass trotz der hohen Spezifität für IgY der Aufbau beider Rezeptoren sehr unterschiedlich ist. Der ausschließlich in funktioneller Hinsicht den Fc-Rezeptoren der MHC-Familie in Mammalia äquivalente FcRY zeigt eine Homologie von 55 % zu dem Phospholipase A₂-Rezeptor [120]. Die Interaktion des avianen Rezeptors CHIR-AB1 ähnelt hingegen sehr der Wechselwirkung zwischen Mammalia-IgA und dem entsprechenden Rezeptor Fc α RI [230]. In Analogie zur Bindung des Fc α RI-Rezeptors an die C α 2- und C α 3-Domänen von Mammalia-IgA [231, 232] sind die Domänen C α 3 und C α 4 des gallinen IgY-Antikörpers an der Interaktion mit CHIR-AB1 beteiligt [230]. Das stöchiometrische Verhältnis von Fc-Rezeptor zu Antikörper entspricht hierbei 2:1 [225]. Beide Rezeptormoleküle sind auf dem Leukozyten-Rezeptor-Cluster (LRC) codiert, wodurch sich ihre große Ähnlichkeit erklären lässt [158, 233].

Mit dem chimären Konstrukt CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 liegt ein potentiell bivalenter Antikörper mit IgY-Spezifität vor. Auf Grund der bekannten Eigenschaften von CHIR-AB1 sollte für das chimäre Fusionskonstrukt auch ein bivalentes Bindungsverhalten an IgY bzw. Fc α angenommen werden. In der Theorie sind zwei Bindungsmodelle denkbar. Das erste Szenario beschreibt die Bindung des Rezeptorkonstruktes an IgY mit einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. D. h., dass bei ausreichender Flexibilität der „Rezeptorarme“ genau ein CHIR-Fc-Antikörper pro IgY-Molekül gebunden wird. Von Antikörpern, denen eine *hinge*-Region fehlt, ist eine eingeschränkte Flexibilität bekannt. Das Fehlen einer solchen Region in CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 wird in einem zweiten denkbaren Bindungsmodell berücksichtigt. Die resultierende Stöchiometrie entspräche dann eher einer 2:1-Bindung, bei der ein IgY-Antikörper von zwei Rezeptorkonstrukten flankiert würde. Die jeweils freien, also nicht an IgY gebundenen Rezeptormoleküle könnten an weiteren Bindungen beteiligt sein, so dass eine Oligomerisierung von IgY stattfinden könnte. Eine Oligomerisierung, die zur Bildung sehr großer Aggregate und möglicherwei-

se zur Präzipitation führen würde, konnte in den hier durchgeführten Arbeiten nicht beobachtet werden. In welcher Form der bivalente Bindungsmodus tatsächlich in Erscheinung tritt, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden. Durch dynamische Lichtstreuungsexperimente (DLS) oder auch Gelfiltrationschromatographien im Gleichgewicht könnte das Bindungsverhalten näher analysiert werden. Mit Hilfe von DLS-Messungen könnten Aussagen über die Größe der entstehenden Immunglobulinkonjugate getroffen werden. Die Methode zieht hierzu die zeitliche Variation der Streuintensität zur Partikelgrößenbestimmung heran. Die Gleichgewichtsgelfiltration kann Aufschluss über das Verhältnis der Interaktionspartner geben, indem einer der zu analysierenden Substanzen bereits in dem verwendeten Laufpuffer enthalten ist. Die eigentliche Probe besteht dann aus einem definierten Verhältnis beider Analyten. Das Auftreten von Peaks oder Tälern im Chromatogramm lässt schließlich Rückschlüsse auf den Bindungsmodus zu.

In anderen Studien wurden für den Rezeptor CHIR-AB1 Affinitäten von 5.4 nM und 27 nM für die Bindung an Fc_γ bzw. IgY erhalten [158]. SPR-spektroskopische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben für CHIR-AB1-huIgE_{C_H2-4} eine apparente Dissoziationskonstante von 2×10^{-10} M. Die hier ermittelte apparente Affinität lag somit eine Größenordnung höher im Vergleich zu dem freien Rezeptor CHIR-AB1. Die gesteigerte Affinität wurde durch den bivalenten Effekt des IgY-spezifischen Konstruktes erklärt. Im Zusammenhang mit der Affinität müsste für andere Systeme der *in vitro*-Diagnostik untersucht werden, ob eine mögliche Dissoziation des Rezeptorkonstruktes von den gebundenen IgY auftreten und die Messung nachteilig beeinflussen könnte. Für Assaymethoden mit wesentlich stringenteren Prozessbedingungen als im Festphasensystem könnte der potentiellen Schwachstelle durch die nicht-kovalente Verknüpfung von IgY und humaner Isotypspezifität mit Hilfe einer chemischen Modifikation zur kovalenten Stabilisierung entgegen gewirkt werden.

Die IgE-spezifische Quantifizierung der Zellkulturüberstände zeigte eine hocheffiziente Produktion von 30 µg/mL Protein. Eine effektive Reinigung des IgE-Konstruktes wurde mit Hilfe der histidinvermittelten Affinitätschromatographie unter milden Bedingungen durchgeführt. Die Spezifität des neuen chimären Antikörpers wurde in einer ELISA-Analyse verifiziert, welche die humanen Isotypen IgG, IgM und IgA sowie die nicht-humanen IgG-Antikörper aus Maus, Kaninchen, Schaf und Ziege berücksichtigte. Die gezeigte ausschließliche Spezifität für IgY ist eine Grundvoraussetzung für die Anwendung polyklonaler IgY in diagnostischen Systemen, um sich nachteilig auswirkende Interferenzen zu vermeiden und um den

Vorteil avianer Antikörper gegenüber polyklonalen IgG zu erhalten.

In Kombination mit den Bet v 1a-spezifischen IgY wurde die Anwendung des chimären Antikörpers in weiteren Experimenten evaluiert. Der indirekte ELISA mit immobilisiertem Allergen Bet v 1a-MBP zeigte die erfolgreiche Applikation eines zuvor hergestellten Gemisches aus allergenspezifischen polyklonalen IgY und chimärem IgE-Antikörper. Durch die Möglichkeit, die verwendeten Komponenten vor dem eigentlichen Assay inkubieren zu können, wird mit diesem Konzept der Verknüpfung von Allergenspezifität und assaykompatibler Isotypspezifität ein originäres Substitut für humane Seren in der immunologischen Diagnostik bereitgestellt. Die Anwendbarkeit konnte mit einem Bet v 1a-spezifischen und aus einer Hybridomzelllinie erhaltenen Antikörper auf monoklonaler Ebene bestätigt werden. Die variable Kombination des chimären CHIR-IgE-Fc-Konstruktes mit der durch polyklonale IgY determinierten Spezifität wurde darüber hinaus in einem Assay mit immobilisiertem Weizenextrakt erfolgreich demonstriert. Dies zeigte, dass nicht nur für Einzelallergene, sondern auch für in der Diagnostik relevante allergene Extrakte dieses Substitut für IgE-Antikörper anwendbar ist.

Der weitere Vorteil dieses Konzeptes ist vor allem auch in der variablen Gestaltung des chimären Antikörpers zu sehen. Durch Austausch der Fc-Domänen können durch einfache Reklonierung sämtliche gewünschte Isotypspezifitäten realisiert werden. So wurden neben IgE auch die anderen humanen Isotypen IgG₁, IgG₄, IgA₁, IgA₂ und IgM mit dem avianen Rezeptor genetisch fusioniert. Neben IgE steht auch der IgG₄-Isotyp im Fokus der allergologischen Diagnostik [3, 234]. Inwiefern die generelle Messung von IgG₄ gegen Nahrungsmittelallergene einen diagnostischen Wert trotz der weiten Verbreitung dieses Antikörpers in der gesamten Bevölkerung hat, wird kontrovers diskutiert [235, 236]. Das Auftreten einer starken IgG₄-Antwort auf Nahrungsmittelallergene kann jedoch mit einer ebenfalls starken T_H2-induzierten Immunreaktion und Bildung von Autoantikörpern assoziiert und im Rahmen einer immunpathologischen Diagnostik relevant sein [237, 238]. Je nach Art der Allergenaufnahme und unabhängig von anderen – auch angeborenen – Faktoren sowie in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer eines Pathogens kann die in eine Soforttyp-Reaktion resultierende T_H2-Polarität in eine stärker T_H1-dirigierte Reaktion übergehen. Infolge dieses Polaritätswechsels werden dann auch Immunantworten mit Bildung von IgG- und IgA-Antikörpern initiiert. IgG₄-Antikörpern wird in einigen Studien eine blockierende Funktion zugeschrieben. So können bei Patienten, die im Rahmen einer spezifischen Desensibilisierungsmaßnahme (SIT) therapiert werden, ein erhöhter IgG₄-Titer mit dem Erfolg der SIT korreliert wer-

den [239]. Dieser Sachverhalt konnte jedoch in anderen Untersuchungen widerlegt werden [240, 241]. Vielmehr konnte bei Personen mit allergischer Symptomatik ein Anstieg der IgG₄-Antikörper im Vergleich zu Nicht-Allergikern beobachtet werden [242, 243]. Bei der Bienengiftallergie könnte eine erhöhte IgG₄-Konzentration im Rahmen einer SIT möglicherweise Hinweise für ein niedrigeres Risiko einer akuten Immunreaktion geben, jedoch ist die Bestimmung der IgG-Subklassenantikörper nicht in jedem Fall ausreichend [244].

Im Kontext der infektiologischen Diagnostik sind vor allem IgG₁- und IgM-Antikörper von Bedeutung, da anhand der zeitlichen und quantitativen Verteilung dieser Antikörper und durch Bestimmung der IgG-Affinität zwischen verschiedenen Formen und Stufen einer bestimmten Infektion unterschieden werden kann [245, 246]. Bei einer erstmaligen Infektion sind Immunglobuline des Isotyps M in pentamerer Form die ersten der Immunabwehr dienenden Antikörper. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich nur wenige hochaffine IgG-Antikörper im Serum, die erst im Laufe der fortschreitenden Infektion an das Pathogen durch Affinitätserhöhung angepasst werden. Der Nachweis niedrigaffiner IgG-Antikörper und damit die Diagnose einer frühen Infektion erfolgt durch die Bestimmung des sogenannten relativen Aviditätsindex'. Dieser Index ist für den jeweiligen Assay spezifisch und hinsichtlich eines Bereiches für das Vorliegen einer frühen Infektion für viele infektiologische Krankheitsbilder bestimmt worden. Alternativ bzw. zusätzlich steht mit der Bestimmung des Verhältnisses im Zusammenhang mit einer Infektion auftretender IgM- und IgG-Antikörper eine weitere Methode zur Verfügung, die die Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Infektion gestattet [245]. Typische Anwendungsbereiche IgM- und IgG-spezifischer Antikörper sind beispielsweise Assays zur Diagnose und Analyse der Infektion mit Borrelien, dem Epstein-Barr-Virus, Chlamydien, Erreger von Tropenkrankheiten u. a. Darüber hinaus ist in der Diagnostik autoimmunologischer Erkrankungen die Messung spezifischer IgG-Reaktivitäten wichtig (z. B. Heparin-induzierte Thrombozytopenie [42]). In manchen Fällen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist zudem die Bestimmung reaktiver IgM-Antikörper eine zuverlässige und teils auch verlässlichere Methode [247].

In allen mucosalen Geweben sind die Immunglobuline der Klasse A die dominierenden Antikörper der humoralen Immunabwehr und kommen in hohen Konzentrationen im Blut vor. Durch die Interaktion mit dem Fc α -Rezeptor werden wichtige Effektormechanismen zur Pathogenabwehr in Gang gesetzt, wobei nicht zwischen IgA₁ und IgA₂ unterschieden wird [248]. Eine Änderung der IgA-Serumkonzentration gegenüber den üblichen Normalwerten kann für die Diagnostik von Relevanz

sein. IgA-Antikörper sind daher sowohl allgemein bei der Untersuchung von Immundefizienzen als auch im Besonderen bei der Diagnose von z. B. Lebererkrankungen [249], allergischer Erkrankungen [250] und insbesondere von Störungen der Schleimhaut-assoziierten Immunabwehr [251, 252] von Bedeutung.

Die erfolgreiche Bindung aller Konstrukte an IgY und die gleichzeitige Detektion als humaner Antikörper wurden in ELISA-Analysen gezeigt. Für das IgG₁-Konstrukt konnte ebenfalls eine sehr effektive Produktion festgestellt werden. Am Beispiel des monoklonalen Bet v 1a-spezifischen IgY wurde die Funktionalität des IgG-Analogons verifiziert. Schließlich konnte in Kombination dieses chimären IgG mit den polyklonalen PF4/DS-10-spezifischen IgY die Anwendung in einem indirekten ELISA mit immobilisiertem PF4/DS-10-Komplex demonstriert werden. Dies unterstreicht erneut die Vielseitigkeit eines auf genetischer Ebene fusionierten Immunglobulinkonjugats; durch Austausch des Fc ϵ -Parts durch eine Fc γ ₁-Domäne konnte das chimäre Konstrukt erfolgreich an die IgG-Spezifität des HIT-Assays adaptiert werden. Die Konzentrationen der übrigen chimären Rezeptor-humanFc-Varianten konnten nicht bestimmt werden, da diese für eine Abschätzung in der Proteinfärbung nicht ausreichend stark konzentriert waren. Warum die Expressionsrate für die Isotypen IgA₁, IgA₂, IgG₄ und IgM deutlich niedriger ausfielen, kann unterschiedliche Gründe haben, unter denen vor allem das als Positionseffekt-Variegation bekannte Phänomen zu nennen ist [253]. Hierbei kommt es durch epigenetische Modifizierungen zur Änderung des Chromatinzustands. DNA, die in Bereiche des Heterochromatins integriert wird, unterliegt überwiegend oder ausschließlich einer transkriptionellen Genstilllegung. Eine Integration in aktive euchromatische Genabschnitte resultiert in der Regel in der transgenen Expression, erlaubt jedoch häufig keine Langzeitexpression [253]. Die herunterregulierte Aktivität des CMV-Promotors in dem pcDNA3.1/Zeo-Vektorsystem durch Methylierung [254] oder Deacetylierung der Histone [255] konnte in Mammalia-Zelllinien bereits beobachtet werden. Zur Steigerung der Expression der dargestellten chimären Antikörperkonstrukte könnte in weiteren Arbeiten der Effekt protektiver *cis*-regulatorischer Elemente wie beispielsweise Andockstellen (*attachment sites*) [256] oder ubiquitäre Chromatin öffnende Elemente [257] untersucht werden. Auch die Analyse des blockierenden Effektes der Histondeacetylierung durch Natriumbutyrat wäre denkbar [258, 259].

5.5 Ausblick

Im Zusammenhang mit der Evaluierung verschiedener Konzepte zur Darstellung assaykompatibler Immunglobulinkonjugate stellen die chimären IgY-spezifischen Rezeptorkonstrukte einen sehr vielversprechenden Ansatz zur Umgehung der Problematik humaner Poolseren als Referenzmaterial für die *in vitro*-Diagnostik dar. In breit angelegten Studien muss nun die Anwendbarkeit in sämtlichen der immunologischen Diagnostik zur Verfügung stehenden Assaysystemen evaluiert und bewertet werden. Hierbei muss auch die Korrelation eines auf diesem Rezeptorkonstrukt und polyklonalen spezifischen Antikörpern basierenden Substituts mit realen klinischen Proben humaner Seren analysiert werden.

Nach erfolgreicher Evaluation der Anwendung des Rezeptorkonstruktes zusammen mit spezifischen, polyklonalen avianen Antikörpern in den diversen Testsystemen schließe sich dann der Prozess zur Neuvalidierung der kommerziell erhältlichen Assaysysteme seitens der Hersteller an. Im Zuge dessen könnte dann die seit langem geforderte und notwendige Standardisierung in der immunologischen *in vitro*-Diagnostik auf nationaler wie internationaler Ebene begonnen werden.

Zusammenfassung

Ziel der *in vitro*-Diagnostik ist die qualitative und quantitative Bestimmung spezifischer Antikörperisotypen. Zu diesem Zweck stehen zahlreiche im Laufe der Zeit etablierte und optimierte Systeme zur Verfügung. Trotz der klinischen Relevanz der *in vitro*-Diagnostik ist es erstaunlich, dass bis heute keine einheitliche Standardisierung vorgenommen wurde. Die Verwendung humaner Poolseren als Referenzmaterial in beispielsweise IgE-spezifischen Assaysystemen bietet zwar den Vorteil, der Problematik heterologer Gesamt-IgE-Standardkurven bei der quantitativen Bestimmung des sIgE zu entfliehen, ist allerdings in vielen Fällen mit dem Nachteil einer erschwerten Zugänglichkeit oder Verfügbarkeit, hoher Kosten und variierender Qualität behaftet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf Basis der IgY-Technologie unterschiedliche Konzepte zur Umgehung dieser Problematik am Beispiel der Bet v 1a-induzierten Birkenpollenallergie erarbeitet und evaluiert. Zunächst konnten durch Immunisierungen von Hühnern mit dem Allergen Bet v 1a spezifische polyklonale Antikörper erhalten und aus dem Eigelb mit Hilfe der Präzipitation isoliert werden. In Analysen zur weiteren Charakterisierung konnten im ELISA-System unterschiedliche Effekte der Blockierungsreagenzien Polyvinylalkohol und bovines Serumalbumin auf das Bindungsverhalten der polyklonalen IgY festgestellt werden, wodurch die Diskriminierung der Affinitäten durch Immunisierung erhaltener Antikörper auf qualitativer Ebene möglich war. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung der apparenten Affinität der allergenspezifischen IgY bestätigten die zuvor beobachteten Tendenzen.

Nach Generierung der spezifischen, polyklonalen Antikörper wurde die Realisation der für die human-immunologische *in vitro*-Diagnostik erforderlichen Adaption evaluiert. Hierzu wurden zum einen chemische Modifikationen mit Glutardialdehyd bzw. durch oxidative Glycolspaltung zur kovalenten Kopplung der IgY mit humanen Antikörpern untersucht. Darüber hinaus wurde auch eine Haptenmarkierung für die Detektion mit spezifischen humanen Isotypen und die nicht-kovalente

Verknüpfung durch die Biotin-Streptavidin-Interaktion analysiert. Als zielführende Methode, da auf Modifikationen der IgY verzichtend und die Antigen-spezifität erhaltend, wurde die genetische Fusion des gallinen IgY-spezifischen Rezeptors CHIR-AB1 mit dem humanen Fc ϵ -Teil etabliert. Dazu wurde die Sequenz des Rezeptors CHIR-AB1 amplifiziert und mit der humanen Fc ϵ -Sequenz in dem für die Expression in Mammaliazellen geeigneten Vektorsystem pcDNA3.1 fusioniert. Durch Expression in HEK-293-Zellen konnte das chimäre Konstrukt CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 in vergleichsweise hoher Quantität erhalten und durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Untersuchung der Interaktion des Konstruktes mit IgY durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ergab eine apparente Dissoziationskonstante im picomolaren Bereich. Mit Hilfe der genetischen Fusion der IgY-Spezifität mit der assayrelevanten Isotypspezifität wurde ein bivalentes und in seiner Affinität dem CHIR-AB1-Rezeptor gegenüber gesteigertes Konstrukt erhalten. CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 wurde erfolgreich in Kombination mit den zuvor isolierten Bet v 1a-spezifischen IgY durch Vorinkubation in einem Festphasenassay getestet. Ebenso konnte das Konstrukt mit polyklonalen avianen Antikörpern mit Spezifität für den wässrigen Allergenextrakt aus Weizen erfolgreich angewendet werden und zeigte die generelle Übertragbarkeit des Konstruktes auf andere Assayanforderungen.

Der Vorteil des Konzeptes der genetischen Fusion gegenüber den anderen hier evaluierten Methoden liegt in dem Adaptionspotential des chimären Rezeptorkonstruktes. Durch Austausch der Fc ϵ -Sequenzen durch weitere im allergologischen, autoimmunologischen oder infektiologischen Kontext stehenden humanen Fc-Sequenzen wurden die analogen chimären Konstrukte für IgG₁, IgG₄, IgM, IgA₁ und IgA₂ produziert. Im Zusammenhang mit der autoimmunologischen Erkrankung einer heparininduzierten Thrombozytopenie II wurde CHIR-AB1-huIgG₁-C_H2+3 erfolgreich mit IgY – spezifisch für den Komplex aus Plättchenfaktor 4 und heparinanalogen Dextransulfat – im Festphasenassay appliziert.

Mit den hier dargestellten chimären IgY-spezifischen Antikörperkonstrukten wurde ein vielseitiges Tool für die Substitution humaner Poolseren zur Verfügung gestellt, das die schnelle Adaption durch einfachen Fc-Austausch und die Applikation polyklonaler Hühner-Antikörper erlaubt. Unter Berücksichtigung tierschutzrechtlicher Bestrebungen zur Minimierung nachteiliger Effekte für das Labortier könnte sich nach Validierung in weiteren diagnostischen Systemen die seit langem geforderte Standardisierung für die *in vitro*-Diagnostik realisieren lassen.

Abstract

Over the years, numerous different methods have been established and optimized for *in vitro* diagnostics with the objective of qualitative and quantitative determination of specific immunoglobulin isotypes. However, it is astonishing that in face of the clinical relevance of *in vitro* diagnostics no uniform standardization has been developed until now. The use of human pool sera as reference material for Ig-specific assays (*e.g.* IgE) provides the advantage to circumvent the problems arising with total IgE calibration curves. Nevertheless, human pool sera are associated in many cases with drawbacks due to accessibility, availability, high costs and variable quality.

In this work different concepts on the basis of the IgY technology were developed and evaluated to address these unsolved problems using the example of Bet v 1a induced birch pollen allergy. First of all Bet v 1a specific polyclonal antibodies were generated by immunization of hens and were isolated from hen's egg yolk by salt precipitation. Further characterization experiments in ELISA revealed different blocking effects of polyvinyl alcohol and bovine serum albumin on the interaction of the polyclonal IgY, thereby allowing for qualitative discrimination of the affinity of antibodies produced via immunization. The apparent affinity of the allergen specific IgY was determined by surface plasmon resonance spectroscopy experiments, which confirmed the previously observed tendencies.

After generation of the specific and polyclonal antibodies several concepts for adaptation to human *in vitro* diagnostics were developed and evaluated. These concepts included a chemical modification with glutaraldehyde and oxidative cleavage of carbohydrate structures for covalent coupling of IgY with human immunoglobulins. Moreover, the decoration with haptens for specific detection by human isotypes and the non-covalent binding through strong interaction with streptavidin upon biotinylation were investigated. As a most promising method the genetic fusion of the galline IgY specific receptor CHIR-AB1 with the human Fc ϵ moiety was established. The CHIR-AB1 sequence was amplified and fused to the Fc ϵ gene

by subcloning it into the mammalian expression vector pcDNA3.1. The chimeric CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 was produced with relative high amount and purified by affinity chromatography. Surface plasmon resonance spectroscopic measurements determined an apparent dissociation constant in the picomolar range for the interaction of the construct with IgY. Thus, a bivalent and higher affine construct could be designed by means of genetic fusion of the receptor CHIR-AB1 with the relevant Fc part of human antibodies. CHIR-AB1-huIgEC_H2-4 was successfully applied as a preincubated combination with the previously isolated Bet v 1a specific IgY in solid phase assay. In addition the general ability for adaptation to other assay conditions was successfully demonstrated by application of the construct combined with IgY specific for the aqueous fraction of wheat extract.

This concept of genetic fusion is advantageous over the evaluated methods due to its potential for easy adaptation of the chimeric receptor construct. Within the context of further allergological, autoimmunological or infectiological relevant human immunoglobulin isotypes analogues of the receptor construct for IgG₁, IgG₄, IgM, IgA₁ and IgA₂ were designed. The heparin induced thrombocytopenia II served as a model for autoimmune diseases and CHIR-AB1-huIgG₁C_H2+3 in combination with IgY specific for the complex of platelet factor 4 and heparin-like dextran sulfate were applied in solid phase assay.

In this work IgY specific chimeric antibody constructs were designed as versatile tools for the substitution of human pool sera allowing for easy adaptation by the exchange of Fc moieties and application of polyclonal avian chicken antibodies. In consideration of animal health and welfare and upon validation for further diagnostic systems progress in the recommended and long-demanded standardization for *in vitro* diagnostics might now be achieved.

Literatur

- [1] Kay, A. B. „Allergy and allergic diseases. First of two parts.“ *N Engl J Med* **2001**, *344*, 30–37.
- [2] Gell, P. G. H. und Coombs, R. R. A. „Clinical Aspects of Immunology. 2nd ed.“ Blackwell, **1968**, 1356.
- [3] Kemeny, D. M. *et al.* „The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals.“ *Clin Exp Allergy* **1989**, *19*, 545–549.
- [4] Romagnani, S. „Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more.“ *Immunol Today* **1991**, *12*, 256–257.
- [5] Ebner, C. *et al.* „Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients.“ *J Immunol* **1995**, *154*, 1932–1940.
- [6] Till, S. *et al.* „IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression.“ *Immunology* **1997**, *91*, 53–57.
- [7] Till, S. *et al.* „IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis.“ *Clin Exp Immunol* **1997**, *110*, 114–121.
- [8] Kay, A. B. „Allergy and allergic diseases. Second of two parts.“ *N Engl J Med* **2001**, *344*, 109–113.
- [9] Larché, M., Akdis, C. A. und Valenta, R. „Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy.“ *Nat Rev Immunol* **2006**, *6*, 761–771.
- [10] Akdis, M. und Akdis, C. A. „Mechanisms of allergen-specific immunotherapy.“ *J Allergy Clin Immunol* **2007**, *119*, 780–791.
- [11] Geha, R. S., Jabara, H. H. und Brodeur, S. R. „The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination.“ *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 721–732.
- [12] Gould, H. J. und Sutton, B. J. „IgE in allergy and asthma today.“ *Nat Rev Immunol* **2008**, *8*, 205–217.
- [13] Galli, S. J., Tsai, M. und Piliponsky, A. M. „The development of allergic inflammation.“ *Nature* **2008**, *454*, 445–454.
- [14] Hammad, H. und Lambrecht, B. N. „Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma.“ *Nat Rev Immunol* **2008**, *8*, 193–204.
- [15] Kauffman, H. F. *et al.* „House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms.“ *Clin Mol Allergy* **2006**, *4*, 5.
- [16] Jeong, S. K. *et al.* „Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery.“ *J Invest Dermatol* **2008**, *128*, 1930–1939.
- [17] Lindsell, C. E. *et al.* „Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1.“ *Cell* **1995**, *80*, 909–917.

- [18] Robey, E. *et al.* „An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages.“ *Cell* **1996**, *87*, 483–492.
- [19] Amsen, D. *et al.* „Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells.“ *Cell* **2004**, *117*, 515–526.
- [20] Galli, S. J., Gordon, J. R. und Wershil, B. K. „Cytokine production by mast cells and basophils.“ *Curr Opin Immunol* **1991**, *3*, 865–872.
- [21] Kinet, J. P. „The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology.“ *Annu Rev Immunol* **1999**, *17*, 931–972.
- [22] Metcalfe, D. D., Baram, D. und Mekori, Y. A. „Mast cells.“ *Physiol Rev* **1997**, *77*, 1033–1079.
- [23] Kashiwakura, J.-I., Otani, I. M. und Kawakami, T. „Monomeric IgE and mast cell development, survival and function.“ *Adv Exp Med Biol* **2011**, *716*, 29–46.
- [24] Marshall, J. S. „Mast-cell responses to pathogens.“ *Nat Rev Immunol* **2004**, *4*, 787–799.
- [25] Kraft, S. und Kinet, J.-P. „New developments in Fc epsilon RI regulation, function and inhibition.“ *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 365–378.
- [26] Sarin, S. *et al.* „The role of the nervous system in rhinitis.“ *J Allergy Clin Immunol* **2006**, *118*, 999–1016.
- [27] Cevikbas, F. *et al.* „Neuroimmune interactions in allergic skin diseases.“ *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2007**, *7*, 365–373.
- [28] Laloo, U. G., Barnes, P. J. und Chung, K. F. „Pathophysiology and clinical presentations of cough.“ *J Allergy Clin Immunol* **1996**, *98*, S91–6, S91–6.
- [29] Finkelman, F. D. „Anaphylaxis: lessons from mouse models.“ *J Allergy Clin Immunol* **2007**, *120*, 506–15, 506–15.
- [30] Galli, S. J. *et al.* „Mast cells as ‘tunable’ effector and immunoregulatory cells: recent advances.“ *Annu Rev Immunol* **2005**, *23*, 749–786.
- [31] Barnes, P. J. „Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.“ *Nat Rev Immunol* **2008**, *8*, 183–192.
- [32] Stockinger, B. und Veldhoen, M. „Differentiation and function of Th17 T cells.“ *Curr Opin Immunol* **2007**, *19*, 281–286.
- [33] Weaver, C. T. *et al.* „Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties.“ *Immunity* **2006**, *24*, 677–688.
- [34] Holgate, S. T. „Epithelium dysfunction in asthma.“ *J Allergy Clin Immunol* **2007**, *120*, 1233–44, 1233–44.
- [35] Schleimer, R. P. *et al.* „Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses.“ *J Allergy Clin Immunol* **2007**, *120*, 1279–1284.
- [36] Ward, C. *et al.* „Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma.“ *Thorax* **2002**, *57*, 309–316.
- [37] Ward, C. und Walters, H. „Airway wall remodelling: the influence of corticosteroids.“ *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2005**, *5*, 43–48.
- [38] Schmitt, B. P. und Adelman, B. „Heparin-associated thrombocytopenia: a critical review and pooled analysis.“ *Am J Med Sci* **1993**, *305*, 208–215.
- [39] Arepally, G. und Cines, D. B. „The Pathogenesis and Clinical Relevance of Heparin-Induced Autoantibodies.“ In: „The Decade of Autoimmunity.“ Shoenfeld, Y. (Hrsg.), Elsevier, **1999**.
- [40] Warkentin, T. E. und Kelton, J. G. „Heparin-induced thrombocytopenia.“ *Annu Rev Med* **1989**, *40*, 31–44.

- [41] Denomme, G. A. *et al.* „Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the Fc gammaRIIa “low responder” (his131) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia.“ *J Lab Clin Med* **1997**, *130*, 278–284.
- [42] Ahmed, I., Majeed, A. und Powell, R. „Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update.“ *Postgrad Med J* **2007**, *83*, 575–582.
- [43] Kelton, J. G. *et al.* „Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4.“ *Blood* **1994**, *83*, 3232–3239.
- [44] Kaliner, M. A. und Giacco, S. D. „The practice of allergology.“ In: „WAO White Book on Allergy.“ Pawankar, R. *et al.* (Hrsg.), Milwaukee, WI: World Allergy Organization, **2011**.
- [45] Pawankar, R. *et al.* „Introduction and Executive Summary.“ In: „WAO White Book on Allergy.“ Pawankar, R. *et al.* (Hrsg.), Milwaukee, WI: World Allergy Organization, **2011**.
- [46] Eigenmann, P. A., Oh, J.-W. und Beyer, K. „Diagnostic testing in the evaluation of food allergy.“ *Pediatr Clin North Am* **2011**, *58*, 351–62, ix.
- [47] Mantoux, C. „Intradermoréaction de la tuberculose.“ *CR Acad Sci* **1908**, *147*, 355.
- [48] Lewis, T. und Grant, R. „Vascular reactions of the skin to injury.“ *Heart* **1926**, *13*, 219–225.
- [49] Majamaa, H. *et al.* „Cow’s milk allergy: diagnostic accuracy of skin prick and patch tests and specific IgE.“ *Allergy* **1999**, *54*, 346–351.
- [50] Scientific Affairs PoA: A. C. on. „In vivo diagnostic testing and immunotherapy for allergy.“ *JAMA* **1987**, *258*, 1363–1367.
- [51] Bernstein, I. L. *et al.* „Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter.“ *Ann Allergy Asthma Immunol* **2008**, *100*, S1–148.
- [52] Calabria, C. W. und Hagan, L. „The role of intradermal skin testing in inhalant allergy.“ *Ann Allergy Asthma Immunol* **2008**, *101*, 337–47, quiz 347, 418.
- [53] Järvinen, K. M. und Sicherer, S. H. „Diagnostic oral food challenges: procedures and biomarkers.“ *J Immunol Methods* **2012**, *383*, 30–38.
- [54] Tantilipikorn, P., Vichyanond, P. und Lacroix, J. S. „Nasal provocation test: how to maximize its clinical use?“ *Asian Pac J Allergy Immunol* **2010**, *28*, 225–231.
- [55] Cockcroft, D. W. „Direct challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance.“ *Chest* **2010**, *138*, 18S–24S.
- [56] Wide, L., Bennich, H. und Johansson, S. G. „Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies.“ *Lancet* **1967**, *2*, 1105–1107.
- [57] Faraj, B. A., Camp, V. M. und Lories, P. „Histamine-dependent allergy blood test. Clinical evaluation.“ *Allergy* **1986**, *41*, 526–531.
- [58] Turjanmaa, K. *et al.* „Basophil histamine release and lymphocyte proliferation tests in latex contact urticaria. In vitro tests in latex contact urticaria.“ *Allergy* **1989**, *44*, 181–186.
- [59] Hamilton, R. G. und Adkinson, N. F. „Quantitative aspects of solid phase immunoassays.“ In: „ELISA and Other Solid Phase Immunoassays.“ Kemeny, D. M. und Challacombe, S. J. (Hrsg.), John Wiley & Sons Ltd., **1989**.
- [60] WHO Expert Committee on Biological Standardization, World Health Organization Technical Report Series No. 658, 31st report, Geneva, **1981**.
- [61] Renz, H. *et al.* „In-vitro-Allergiediagnostik, Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI).“ *Allergo J* **2002**, *11*, 492–506.

- [62] Renz, H. *et al.* „In-vitro-Allergiediagnostik, Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) unter Beteiligung des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG).“ *Allergo J* **2010**, *19*, 110–128.
- [63] WHO Expert Committee on Biological Standardization, World Health Organization Technical Report Series, No. 463, 23rd report, Geneva, **1971**.
- [64] Ishizaka, K., Tomioka, H. und Ishizaka, T. „Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes.“ *J Immunol* **1970**, *105*, 1459–1467.
- [65] Bazaral, M. und Hamburger, R. N. „Standardization and stability of immunoglobulin E (IgE).“ *J Allergy Clin Immunol* **1972**, *49*, 189–191.
- [66] Sowerwine, K. J., Holland, S. M. und Freeman, A. F. „Hyper-IgE syndrome update.“ *Ann N Y Acad Sci* **2012**, *1250*, 25–32.
- [67] Beck, O. E. und Kaiser, P. E. „Rate nephelometry of human IgE in serum.“ *Clin Chem* **1982**, *28*, 1349–1351.
- [68] Boccagni, P. *et al.* „Comparison of four in vitro assays for specific IgE detection.“ *Int J Clin Lab Res* **1994**, *24*, 102–105.
- [69] Crobach, M. J. *et al.* „The Phadiatop test compared with RAST, with the CAP system; proposal for a third Phadiatop outcome: “inconclusive”.“ *Allergy* **1994**, *49*, 170–176.
- [70] Johansson, S. G. und Yman, L. „In vitro assays for immunoglobulin E. Methodology, indications, and interpretation.“ *Clin Rev Allergy* **1988**, *6*, 93–139.
- [71] Holford-Strevens, V. *et al.* „Serum total immunoglobulin E levels in Canadian adults.“ *J Allergy Clin Immunol* **1984**, *73*, 516–522.
- [72] Zetterström, O. und Johansson, S. G. „IgE concentrations measured by PRIST in serum of healthy adults and in patients with respiratory allergy. A diagnostic approach.“ *Allergy* **1981**, *36*, 537–547.
- [73] Berciano, F. A. *et al.* „Serum levels of total IgE in non-allergic children. Influence of genetic and environmental factors.“ *Allergy* **1987**, *42*, 276–283.
- [74] Burney, P. *et al.* „The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey.“ *J Allergy Clin Immunol* **1997**, *99*, 314–322.
- [75] Williams, P. B. *et al.* „Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard.“ *J Allergy Clin Immunol* **2000**, *105*, 1221–1230.
- [76] Szeinbach, S. L. *et al.* „Precision and accuracy of commercial laboratories’ ability to classify positive and/or negative allergen-specific IgE results.“ *Ann Allergy Asthma Immunol* **2001**, *86*, 373–381.
- [77] Vignati, G. *et al.* „In vitro allergy diagnosis: comparison of a new method of fully automated determination of specific IgE, using Immulite 2000 compared with UniCAP 100.“ *Eur Ann Allergy Clin Immunol* **2003**, *35*, 285–294.
- [78] Hamilton, R. G. und Adkinson, N. F. „In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders.“ *J Allergy Clin Immunol* **2004**, *114*, 213–25, quiz 226.
- [79] Kontis, K. J. *et al.* „Correlation of the turbo-MP RIA with ImmunoCAP FEIA for determination of food allergen-specific immunoglobulin E.“ *Ann Clin Lab Sci* **2006**, *36*, 79–87.

- [80] Ollert, M. *et al.* „Allergen-specific IgE measured by a continuous random-access immunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing.“ *Clin Chem* **2005**, *51*, 1241–1249.
- [81] Warner, N. L., Szenberg, A. und Burnet, F. M. „The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness.“ *Aust J Exp Biol Med Sci* **1962**, *40*, 373–387.
- [82] Cooper, M. D. *et al.* „The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken.“ *J Exp Med* **1966**, *123*, 75–102.
- [83] Cooper, M. D. *et al.* „Development and function of the immunoglobulin producing system. I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins and antibody production.“ *Int Arch Allergy Appl Immunol* **1969**, *35*, 242–252.
- [84] Olah, I. und Glick, B. „The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius.“ *Poult Sci* **1978**, *57*, 1445–1450.
- [85] Pastoret, P.-P. *et al.* „Avian Immunology.“ In: „Handbook of Vertebrate Immunology.“ Academic Press Ltd., **1998**.
- [86] Ratcliffe, M. J. *et al.* „Avian CD Nomenclature Workshops, Montreal, June 1991, Budapest, August 1992 and Tours, September 1992.“ *Vet Immunol Immunopathol* **1993**, *38*, 375–386.
- [87] Bernot, A. und Auffray, C. „Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 2550–2554.
- [88] Chan, M. M. *et al.* „Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens.“ *J Immunol* **1988**, *140*, 2133–2138.
- [89] Luhtala, M. *et al.* „Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species.“ *Hybridoma* **1993**, *12*, 633–646.
- [90] Koskinen, R. *et al.* „The structure of avian CD5 implies a conserved function.“ *J Immunol* **1998**, *160*, 4943–4950.
- [91] Young, J. R. *et al.* „Monomeric homologue of mammalian CD28 is expressed on chicken T cells.“ *J Immunol* **1994**, *152*, 3848–3851.
- [92] Peault, B. *et al.* „Phylogenetically conserved antigen on nerve cells and lymphocytes resembles myelin-associated glycoprotein.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 814–818.
- [93] Cooper, M. D. *et al.* „Avian T cell ontogeny.“ *Adv Immunol* **1991**, *50*, 87–117.
- [94] Warr, G. W., Magor, K. E. und Higgins, D. A. „IgY: clues to the origins of modern antibodies.“ *Immunol Today* **1995**, *16*, 392–398.
- [95] Hanly, W. C., Artwohl, J. E. und Bennett, B. T. „Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry.“ *ILAR J* **1995**, *37*, 93–118.
- [96] Kincade, P. W. und Cooper, M. D. „Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken. An immunofluorescent analysis using purified antibodies to mu, gamma and light chains.“ *J Immunol* **1971**, *106*, 371–382.
- [97] Mansikka, A. „Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes.“ *J Immunol* **1992**, *149*, 855–861.
- [98] Leslie, G. A. und Clem, L. W. „Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VI. 17S, 7.5S and 5.7S anti-DNP of the turtle, *Pseudamys scripta*.“ *J Immunol* **1972**, *108*, 1656–1664.

- [99] Magor, K. E. *et al.* „Structural relationship between the two IgY of the duck, *Anas platyrhynchos*: molecular genetic evidence.“ *J Immunol* **1992**, *149*, 2627–2633.
- [100] Davison, F., Magor, K. E. und Kaspers, B. „Structure and Evolution of Avian Immunoglobulins.“ In: „Avian Immunology.“ Davison, F., Kaspers, B. und Schat, K. A. (Hrsg.), Elsevier Ltd., **2008**.
- [101] Fellah, J. S. *et al.* „Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of *Ambystoma mexicanum* epsilon chain deduced from cDNA sequence.“ *Immunogenetics* **1993**, *38*, 311–317.
- [102] Faith, R. E. und Clem, L. W. „Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population.“ *Immunology* **1973**, *25*, 151–164.
- [103] Chen, C. L., Lehmeier, J. E. und Cooper, M. D. „Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes.“ *J Immunol* **1982**, *129*, 2580–2585.
- [104] Davison, F., Kaspers, B. und Schat, K. A., Hrsg. „Avian Immunology.“ Elsevier Ltd., **2008**.
- [105] Ratcliffe, M. J. und Jacobsen, K. A. „Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development.“ *Semin Immunol* **1994**, *6*, 175–184.
- [106] Tonegawa, S. „Somatic generation of antibody diversity.“ *Nature* **1983**, *302*, 575–581.
- [107] Reynaud, C. A. *et al.* „A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity.“ *Cell* **1985**, *40*, 283–291.
- [108] Reynaud, C. A. *et al.* „Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region.“ *Cell* **1989**, *59*, 171–183.
- [109] Reynaud, C. A., Anquez, V. und Weill, J. C. „The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire.“ *Eur J Immunol* **1991**, *21*, 2661–2670.
- [110] Reynaud, C. A. *et al.* „A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire.“ *Cell* **1987**, *48*, 379–388.
- [111] Larsson, A. und Sjöquist, J. „Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference.“ *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **1990**, *13*, 199–201.
- [112] Larsson, A. *et al.* „Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review.“ *Poult Sci* **1993**, *72*, 1807–1812.
- [113] Horton, J. J. *et al.* „Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling: studies with beta 2-microglobulin.“ *J Invest Dermatol* **1985**, *84*, 96–99.
- [114] Song, C. S. *et al.* „Antibodies to the alpha-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens.“ *J Immunol* **1985**, *135*, 3354–3359.
- [115] Gassmann, M. *et al.* „Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein.“ *FASEB J* **1990**, *4*, 2528–2532.
- [116] Larsson, A. und Sjöquist, J. „Binding of complement components C1q, C3, C4 and C5 to a model immune complex in ELISA.“ *J Immunol Methods* **1989**, *119*, 103–109.
- [117] Larsson, A. *et al.* „Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA.“ *J Immunol Methods* **1992**, *156*, 79–83.
- [118] Larsson, A. und Sjöquist, J. „Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests.“ *J Immunol Methods* **1988**, *108*, 205–208.
- [119] Kricka, L. J. „Human anti-animal antibody interferences in immunological assays.“ *Clin Chem* **1999**, *45*, 942–956.

- [120] West, A. P., Herr, A. B. und Bjorkman, P. J. „The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog.“ *Immunity* **2004**, *20*, 601–610.
- [121] Polson, A., Wechmar, M. B. von und Regenmortel, M. H. van. „Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens.“ *Immunol Commun* **1980**, *9*, 475–493.
- [122] Polson, A., Wechmar, M. B. von und Fazakerley, G. „Antibodies to proteins from yolk of immunized hens.“ *Immunol Commun* **1980**, *9*, 495–514.
- [123] Akita, E. M. und Nakai, S. „Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY).“ *J Immunol Methods* **1993**, *162*, 155–164.
- [124] Ko, K. Y. und Ahn, D. U. „Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography.“ *Poult Sci* **2007**, *86*, 400–407.
- [125] Pauly, D. *et al.* „IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation.“ *J Vis Exp* **2011**, *51*, 1–5.
- [126] Narat, M. „Production of antibodies in chickens.“ *Food Technology and Biotechnology* **2003**, *41*, 259–267.
- [127] Staak, C. und Schwarzkopf, C. „Gewinnung von Antikörpern aus dem Hühnerei.“ Merkblatt Nr. 9, Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e. V., **2009**.
- [128] Graham, F. L. *et al.* „Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.“ *J Gen Virol* **1977**, *36*, 59–74.
- [129] Malaprade, L. „Action of polyalcohols on periodic acid and alkaline periodates.“ *Bulletin de la Societe Chimique de France, Memoires* **1934**, *1*, 833–852.
- [130] Bobbitt, J. M. „Periodate oxidation of carbohydrates.“ *Adv Carbohydr Chem* **1956**, *48*, 1–41.
- [131] Wolfe, C. A. und Hage, D. S. „Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate.“ *Anal Biochem* **1995**, *231*, 123–130.
- [132] Hage, D. S. „Periodate oxidation of antibodies for site-selective immobilization in immunoaffinity chromatography.“ *Methods Mol Biol* **2000**, *147*, 69–82.
- [133] Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. „Molecular cloning: a laboratory manual.“ Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
- [134] Murray, V. „Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction.“ *Nucleic Acids Res* **1989**, *17*, 8889.
- [135] Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [136] Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. „One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 2172–2175.
- [137] Mandel, M. und Higa, A. „Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.“ *J Mol Biol* **1970**, *53*, 159–162.
- [138] Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. „High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.“ *Nucleic Acids Res* **1988**, *16*, 6127–6145.
- [139] Ausubel, F. *et al.*, Hrsg. „Current Protocols in Molecular Biology.“ Wiley & Sons, Inc, New York, **1996**.
- [140] Petty, K. J. „Metal-Chelate Affinity Chromatography.“ In: „Current Protocols in Molecular Biology.“ (Hrsg.), Wiley & Sons, Inc, New York, **2001**.

- [141] Laemmli, U. K. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [142] Boel, E. *et al.* „Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments.“ *J Immunol Methods* **2000**, *239*, 153–166.
- [143] Huls, G. A. *et al.* „A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments.“ *Nat Biotechnol* **1999**, *17*, 276–281.
- [144] Norderhaug, L. *et al.* „Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells.“ *J Immunol Methods* **1997**, *204*, 77–87.
- [145] Persic, L. *et al.* „An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries.“ *Gene* **1997**, *187*, 9–18.
- [146] Andersson, S. *et al.* „Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme.“ *J Biol Chem* **1989**, *264*, 8222–8229.
- [147] Boshart, M. *et al.* „A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus.“ *Cell* **1985**, *41*, 521–530.
- [148] Nelson, J. A., Reynolds-Kohler, C. und Smith, B. A. „Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene.“ *Mol Cell Biol* **1987**, *7*, 4125–4129.
- [149] Boussif, O. *et al.* „A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 7297–7301.
- [150] Brissault, B. *et al.* „Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection.“ *Bioconjug Chem* **2003**, *14*, 581–587.
- [151] Hecker, J. *et al.* „Generation and epitope analysis of human monoclonal antibody isotypes with specificity for the Timothy grass major allergen Phl p 5a.“ *Mol Immunol* **2011**, *48*, 1236–1244.
- [152] Rodda, D. J. und Yamazaki, H. „Poly(vinyl alcohol) as a blocking agent in enzyme immunoassays.“ *Immunol Invest* **1994**, *23*, 421–428.
- [153] Huber, D. *et al.* „Effectiveness of natural and synthetic blocking reagents and their application for detecting food allergens in enzyme-linked immunosorbent assays.“ *Anal Bioanal Chem* **2009**, *394*, 539–548.
- [154] Dávalos-Pantoja, L. *et al.* „A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles.“ *J Biomater Sci Polym Ed* **2000**, *11*, 657–673.
- [155] Green, N. M. „Avidin.“ *Adv Protein Chem* **1975**, *29*, 85–133.
- [156] Reiser, A. und Marley, R. „Photolysis of aromatic azides. III. Quantum yield and mechanism.“ *Transactions of the Faraday Society* **1968**, *64*, 1806–15.
- [157] Smolinsky, G., Wasserman, E. und Yager, W. A. „Electron paramagnetic resonance (E.P.R.) of ground-state triplet nitrenes.“ *J Am Chem Soc* **1962**, *84*, 3220–1.
- [158] Viertlboeck, B. C. *et al.* „The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 11718–11723.
- [159] Caubet, J.-C. *et al.* „Molecular diagnosis of egg allergy.“ *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2011**, *11*, 210–215.
- [160] Mari, A. „Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis.“ *Int Arch Allergy Immunol* **2001**, *125*, 57–65.

- [161] Shreffler, W. G. „Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing.“ *J Allergy Clin Immunol* **2011**, *127*, 843–9, 843–9.
- [162] Spangfort, M. D. *et al.* „Characterization of purified recombinant Bet v 1 with authentic N-terminus, cloned in fusion with maltose-binding protein.“ *Protein Expr Purif* **1996**, *8*, 365–373.
- [163] Loon, L. C. van und Strien, E. A. van. „The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.“ *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1999**, *55*, 85–97.
- [164] Crowell, D. N. *et al.* „Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean.“ *Plant Mol Biol* **1992**, *18*, 459–466.
- [165] Waugh, D. S. „MBP Fusion FAQ.“(unveröffentlicht).
- [166] Kapust, R. B. und Waugh, D. S. „Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused.“ *Protein Sci* **1999**, *8*, 1668–1674.
- [167] Fox, J. D. und Waugh, D. S. „Maltose-Binding Protein as a Solubility Enhancer.“ In: „Methods in Molecular Biology.“ Vaillancourt, P. E. (Hrsg.), 205. Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2003**.
- [168] Donzeau, M. und Knappik, A. „Recombinant monoclonal antibodies.“ *Methods Mol Biol* **2007**, *378*, 14–31.
- [169] Beerli, R. R. und Rader, C. „Mining human antibody repertoires.“ *MAbs* **2010**, *2*, 365–378.
- [170] Stills, H. F. „Polyclonal antibody production.“ In: „The Biology of the Laboratory Rabbit.“ Manning, P. J., Ringler, D. H. und Newcomer, C. E. (Hrsg.), Academic Press, San Diego, **1994**.
- [171] Fanger, M. W. und Smyth, D. G. „The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Asymmetric attachment of C2-oligosaccharide.“ *Biochem J* **1972**, *127*, 767–774.
- [172] Cartledge, C., McLean, C. und Landon, J. „Production of polyclonal antibodies in ascitic fluid of mice: time and dose relationships.“ *J Immunoassay* **1992**, *13*, 339–353.
- [173] Tung, A. S. „Production of large amounts of antibodies, nonspecific immunoglobulins, and other serum proteins in ascitic fluids of individual mice and guinea pigs.“ *Methods Enzymol* **1983**, *93*, 12–23.
- [174] Tung, A. S. „Production, purification, and characterization of antigen-specific murine monoclonal antibodies of IgE class.“ *Methods Enzymol* **1983**, *92*, 47–66.
- [175] Garvey, J. S., Cremer, N. E. und Sussdorf, D. H. „Methods in Immunology.“ W. A. Benjamin, Inc., **1977**.
- [176] Sanchez-Madrid, F. und Springer, T. A. „Production of Syrian and Armenian hamster monoclonal antibodies of defined specificity.“ *Methods Enzymol* **1986**, *121*, 239–244.
- [177] Van Hoosier, G. L. J. und McPherson, C. W. „Laboratory Hamsters.“ Van Hoosier, G. L. J. und McPherson, C. W. Academic Press, Orlando, Fla., **1987**.
- [178] Odell, W. *et al.* „Production of antisera for polypeptide and steroid radioimmunoassay.“ *Biol Reprod* **1972**, *6*, 427–442.
- [179] Sun, S. *et al.* „Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus.“ *Rapid Commun Mass Spectrom* **2001**, *15*, 708–712.
- [180] Raju, T. S. „Glycosylation Variations with Expression Systems.“ *BioProcess International* **2003**, *1*, 44–53.
- [181] Aalberse, R. C., Akkerdaas, J. und Ree, R. van. „Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens.“ *Allergy* **2001**, *56*, 478–490.

- [182] Spitzauer, S. *et al.* „Major cat and dog allergens share IgE epitopes.“ *J Allergy Clin Immunol* **1997**, *99*, 100–106.
- [183] Wiche, R. *et al.* „Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen.“ *Biochem J* **2005**, *385*, 319–327.
- [184] Schenk, M. F. *et al.* „Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen.“ *BMC Plant Biol* **2009**, *9*, 24.
- [185] Liu, J.-J. und Ekramoddoullah, A. K. M. „The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses.“ *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2006**, *68*, 3–13.
- [186] Gajhede, M. *et al.* „X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy.“ *Nat Struct Biol* **1996**, *3*, 1040–1045.
- [187] Berkner, H. *et al.* „Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins.“ *Biosci Rep* **2009**, *29*, 183–192.
- [188] Vogt, R. F. *et al.* „Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates.“ *J Immunol Methods* **1987**, *101*, 43–50.
- [189] Willander, M. und Al-Hilli, S. „Analysis of biomolecules using surface plasmons.“ *Methods Mol Biol* **2009**, *544*, 201–229.
- [190] Kummer, A. und Li-Chan, E. C. „Application of an ELISA-elution assay as a screening tool for dissociation of yolk antibody-antigen complexes.“ *J Immunol Methods* **1998**, *211*, 125–137.
- [191] Shimizu, M. *et al.* „Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G.“ *Biosci Biotechnol Biochem* **1992**, *56*, 270–274.
- [192] Hatta, H. *et al.* „Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG.“ *Biosci Biotechnol Biochem* **1993**, *57*, 450–454.
- [193] Yarmush, M. L. *et al.* „Immunoabsorption: strategies for antigen elution and production of reusable adsorbents.“ *Biotechnol Prog* **1992**, *8*, 168–178.
- [194] Civalleri, L., Federico, R. und Pini, C. „Single-step purification of superoxide dismutase from bovine erythrocytes by immunosorbent column.“ *Biotechnol Appl Biochem* **1986**, *8*, 387–391.
- [195] Mains, R. E. und Eipper, B. A. „Biosynthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary tumor cells.“ *J Biol Chem* **1976**, *251*, 4115–4120.
- [196] Tsang, V. C. und Wilkins, P. P. „Optimum dissociating condition for immunoaffinity and preferential isolation of antibodies with high specific activity.“ *J Immunol Methods* **1991**, *138*, 291–299.
- [197] Hippel, P. H. von. „Neutral Salt Effects on the Conformational Stability of Biological Macromolecules: Model Studies.“ *Eur J Biochem* **1976**, *246*, 19–26.
- [198] Luo, J. *et al.* „Antibody-antigen interactions measured by surface plasmon resonance: global fitting of numerical integration algorithms.“ *J Biochem* **2001**, *130*, 553–559.
- [199] Verdoliva, A., Basile, G. und Fassina, G. „Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand.“ *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2000**, *749*, 233–242.
- [200] Hermanson, G. T. „Bioconjugate Techniques.“ 2nd. Academic Press, **2008**.
- [201] Hardy, P. M., Nicholls, A. C. und Rydon, H. N. „The Nature of Glutaraldehyde in Aqueous Solution.“ *Chem Commun* **1969**, *65*, 565.

- [202] Hardy, P. M., Nicholls, A. C. und Rydon, H. N. „The nature of the cross-linking of proteins by glutaraldehyde. Part I. Interaction of glutaraldehyde with the amino-groups of 6-aminohexanoic acid and of alpha-N-acetyl-lysine.“ *J Chem Soc Perkin 1* **1976**, 9, 958–962.
- [203] Monsan, P., Puzo, G. und Mazarguil, H. „Études de mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines.“ *Biochimie* **1975**, 57, 1281–1292.
- [204] Avrameas, S. „Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies.“ *Immunochemistry* **1969**, 6, 43–52.
- [205] Avrameas, S. und Ternynck, T. „The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents.“ *Immunochemistry* **1969**, 6, 53–66.
- [206] King, T. P. und Kochoumian, L. „A comparison of different enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay.“ *J Immunol Methods* **1979**, 28, 201–210.
- [207] Peng, L., Calton, G. J. und Burnett, J. W. „Effect of borohydride reduction on antibodies.“ *Appl Biochem Biotechnol* **1987**, 14, 91–99.
- [208] Hornsey, V. S., Prowse, C. V. und Pepper, D. S. „Reductive amination for solid-phase coupling of protein. A practical alternative to cyanogen bromide.“ *J Immunol Methods* **1986**, 93, 83–88.
- [209] Migneault, I. *et al.* „Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking.“ *Biotechniques* **2004**, 37, 790–6, 798–802.
- [210] Ohta, M. *et al.* „Structures of asparagine-linked oligosaccharides from hen egg-yolk antibody (IgY). Occurrence of unusual glucosylated oligo-mannose type oligosaccharides in a mature glycoprotein.“ *Glycoconj J* **1991**, 8, 400–413.
- [211] Raju, T. S. *et al.* „Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics.“ *Glycobiology* **2000**, 10, 477–486.
- [212] Dickinson, R. G. und Jacobsen, N. W. „A New Sensitive and Specific Test for the Detection of Aldehydes: Formation of 6-Mercapto-3-substituted-s-triazolo[4,3-*b*]-s-tetrazines.“ *J Chem Soc D* **1970**, 24, 1799–1720.
- [213] Lee, C. H. und Frasch, C. E. „Quantification of bacterial polysaccharides by the purpald assay: measurement of periodate-generated formaldehyde from glycol in the repeating unit.“ *Anal Biochem* **2001**, 296, 73–82.
- [214] Landsteiner, K. „Über heterogenetisches Antigen und Hapten. XV. Mitteilung über Antigene.“ *Biochem Z* **1921**, 119, 294–306.
- [215] Benacerraf, B., Paul, W. E. und Green, I. „Hapten-carrier relationships.“ *Ann N Y Acad Sci* **1970**, 169, 93–104.
- [216] Shreder, K. „Synthetic haptens as probes of antibody response and immunorecognition.“ *Methods* **2000**, 20, 372–379.
- [217] Rabbany, S. Y. *et al.* „Trace detection of explosives using a membrane-based displacement immunoassay.“ *J Immunol Methods* **2000**, 246, 69–77.
- [218] Deckers, S. *et al.* „Establishment of hapten-specific monoclonal avian IgY by conversion of antibody fragments obtained from combinatorial libraries.“ *Biotechnol Appl Biochem* **2009**, 52, 79–87.
- [219] Ramin, S. und Weller, M. G. „Extremely sensitive and selective antibodies against the explosive 2,4,6-trinitrotoluene by rational design of a structurally optimized hapten.“ *J Mol Recognit* **2012**, 25, 89–97.

- [220] Brash, J. L. und Lyman, D. J. In: „The Chemistry of Bio-surfaces.“ Hair, M. L. (Hrsg.), Decker, New York, **1971**.
- [221] Morrissey, B. W. „The adsorption and conformation of plasma proteins: a physical approach.“ *Ann N Y Acad Sci* **1977**, 283, 50–64.
- [222] Cantarero, L. A., Butler, J. E. und Osborne, J. W. „The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays.“ *Anal Biochem* **1980**, 105, 375–382.
- [223] Smith, M. B. und March, J. „March’s Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure.“ Wiley & Sons, New York, **2001**, 445.
- [224] Minegishi, S. und Mayr, H. „How constant are Ritchie’s “constant selectivity relationships”? A general reactivity scale for n-, pi-, and sigma-nucleophiles.“ *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 286–295.
- [225] Arnon, T. I. *et al.* „The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor.“ *J Mol Biol* **2008**, 381, 1012–1024.
- [226] Linden, C. D. und Roth, T. F. „IgG receptors on foetal chick yolk sac.“ *J Cell Sci* **1978**, 33, 317–328.
- [227] Tressler, R. L. und Roth, T. F. „IgG receptors on the embryonic chick yolk sac.“ *J Biol Chem* **1987**, 262, 15406–15412.
- [228] Kim, J. K. *et al.* „Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor.“ *Eur J Immunol* **1994**, 24, 2429–2434.
- [229] Martin, W. L. *et al.* „Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding.“ *Mol Cell* **2001**, 7, 867–877.
- [230] Pürzel, J. *et al.* „Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction.“ *J Immunol* **2009**, 183, 4554–4559.
- [231] Carayannopoulos, L., Hexham, J. M. und Capra, J. D. „Localization of the binding site for the monocyte immunoglobulin (Ig) A-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between Calpha2 and Calpha3 in human IgA1.“ *J Exp Med* **1996**, 183, 1579–1586.
- [232] Pleass, R. J. *et al.* „Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human Fc alpha receptor (FcalphaR) CD89.“ *J Biol Chem* **1999**, 274, 23508–23514.
- [233] Wende, H. *et al.* „Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4.“ *Mamm Genome* **1999**, 10, 154–160.
- [234] Aalberse, R. C. und Schuurman, J. „IgG4 breaking the rules.“ *Immunology* **2002**, 105, 9–19.
- [235] Bernardi, D. *et al.* „Time to reconsider the clinical value of immunoglobulin G4 to foods?“ *Clin Chem Lab Med* **2008**, 46, 687–690.
- [236] Stapel, S. O. *et al.* „Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report.“ *Allergy* **2008**, 63, 793–796.
- [237] Carini, C. und Fratazzi, C. „Detection of IgG subclasses with anti-IgE activity in patients with atopic diseases.“ *Int Arch Allergy Immunol* **1992**, 98, 227–232.
- [238] Nagpal, S. *et al.* „IgG4 autoantibodies to DNA in systemic lupus erythematosus patients.“ *Int Arch Allergy Appl Immunol* **1991**, 95, 1–6.
- [239] Rossi, R. E. *et al.* „Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy.“ *Vaccine* **2007**, 25, 957–964.

- [240] Aalberse, R. „The role of IgG antibodies in allergy and immunotherapy.“ *Allergy* **2011**, *66 Suppl 95*, 28–30.
- [241] Ejrnaes, A. M. *et al.* „The blocking activity of birch pollen-specific immunotherapy-induced IgG4 is not qualitatively superior to that of other IgG subclasses.“ *Mol Immunol* **2004**, *41*, 471–478.
- [242] Geroldinger-Simic, M. *et al.* „Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies.“ *J Allergy Clin Immunol* **2011**, *127*, 616–22.e1.
- [243] Ahrens, B. *et al.* „The role of hen’s egg-specific IgE, IgG and IgG4 in the diagnostic procedure of hen’s egg allergy.“ *Allergy* **2010**, *65*, 1554–1557.
- [244] Wilson, A. B. *et al.* „A comparative study of IgG subclass antibodies in patients allergic to wasp or bee venom.“ *Allergy* **1994**, *49*, 272–280.
- [245] Prince, H. E., Yeh, C. und Lapé-Nixon, M. „Utility of IgM/IgG ratio and IgG avidity for distinguishing primary and secondary dengue virus infections using sera collected more than 30 days after disease onset.“ *Clin Vaccine Immunol* **2011**, *18*, 1951–1956.
- [246] De Paschale, M. und Clerici, P. „Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions“. *World J Virol* **2012**, *1*, 31–43.
- [247] Bas, S. *et al.* „Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors.“ *Rheumatology (Oxford)* **2002**, *41*, 809–814.
- [248] Fanger, M. W., Pugh, J. und Bernier, G. M. „The specificity of receptors for IgA on human peripheral polymorphonuclear cells and monocytes.“ *Cell Immunol* **1981**, *60*, 324–334.
- [249] Gabeta, S. *et al.* „Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis.“ *J Clin Immunol* **2007**, *27*, 378–387.
- [250] Mandić, Z., Marušić, M. und Boranić, M. „Low levels of immunoglobulin A in children with intrinsic asthma: a possible protection against atopy.“ *Med Hypotheses* **2004**, *62*, 600–604.
- [251] Macpherson, A. J. *et al.* „The immune geography of IgA induction and function.“ *Mucosal Immunol* **2008**, *1*, 11–22.
- [252] Murphy, K., Travers, P. und Walport, M., Hrsg. „Janeway’s Immunobiology.“ Garland Science, New York, **2008**.
- [253] Wurm, F. M. „Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.“ *Nat Biotechnol* **2004**, *22*, 1393–1398.
- [254] Curradi, M. *et al.* „Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation.“ *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 3157–3173.
- [255] Rietveld, L. E. G., Caldenhoven, E. und Stunnenberg, H. G. „In vivo repression of an erythroid-specific gene by distinct corepressor complexes.“ *EMBO J* **2002**, *21*, 1389–1397.
- [256] Girod, P.-A. und Mermod, N. „Use of scaffold/matrix-attachment regions for protein production.“ In: „Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells.“ Makrides, S. C. (Hrsg.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, **2003**.
- [257] Antoniou, M. *et al.* „Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing.“ *Genomics* **2003**, *82*, 269–279.
- [258] Gorman, C. M., Howard, B. H. und Reeves, R. „Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate.“ *Nucleic Acids Res* **1983**, *11*, 7631–7648.

- [259] Cuisset, L., Tichonicky, L. und Delpesch, M. „A protein phosphatase is involved in the inhibition of histone deacetylation by sodium butyrate.“ *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *246*, 760–764.
- [260] Breiteneder, H. *et al.* „The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene.“ *EMBO J* **1989**, *8*, 1935–1938.
- [261] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, Allergen Nomenclature, Bet v 1:
URL: <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=129> (abgerufen am **15. Mai 2012**).
- [262] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, Allergen Nomenclature, Mal d 1:
URL: <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=425> (abgerufen am **15. Mai 2012**).
- [263] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, Allergen Nomenclature, Gly m 4:
URL: <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=345> (abgerufen am **15. Mai 2012**).

Anhang

A.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von *metabion* Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

Oligonukleotide zur Amplifizierung des avianen Rezeptors CHIR-AB1

01 CHIR-AB1 SmaI for	gatcatttaaattgtgtccagtgtctgccccaacctc cctgtc
02 CHIR-AB1 SmaI back	gatcggcgcgccatgggaccactccttggcacc

Oligonukleotide zur Amplifizierung und Klonierung von Gly m 4

03 Glym4 Hyb for	actttccttgaggatggagaaaccaagtttgtgttgc
04 Glym4 Hyb back	ttggtttctccatcctcaaggaaagtatcttcttg
05 Glym4 NcoI for pETER-22	gatcccatggggtgtttcacattcgaggatg
06 Glym4 XhoI back pETER-22	gatcctcgaggttgaatcgggatgggcca

Oligonukleotide zur Amplifizierung und Klonierung von Mal d 1-MBP

07 Mald1 BamHI for	gatcggatccatgggtgtctacacatttgag
08 Mald1 His Sall back	caccccgacgatacaaccaccatcaccacca tactgagtcgacgatc

Oligonukleotide zur Klonierung des modifizierten Vektors pET-22b(+)

09 pET His V5 I for	ctctaccgaaaacctgtacttccagggccagg gcatggatatcggaattaattcg
10 pET His V5 II for	gatcccgaaccgctgctgggtctggactcta ccgaaaacctgtacttc
11 pET His V5 III for	gatccatatgcaccaccaccaccacggta aacgatcccgaaccgctgc
12 pET DH back	gctagggcgctggcaag

Oligonukleotide zur Amplifizierung der humanen Fc-Domänen

13 scFv linker for	tcctcaggtggaggcggttcaggcggagg
14 BGH back	tagaaggcacagtgcaggctg
15 huigmascfor	gatcggcgcgccagtgattgccgagctgcc
16 IgM cH4 MssI 4xHis stop back	gatcgtttaaactcagtgggtgggtgggtgg ggtagcaggtgccagctgtg

A.2 Sequenzdaten

A.2.1 VH3-64-leader, *Homo sapiens*

atggaattggggctgagctggggttttccttgctgctatTTTTaaaggtgtccagtgt 57
 M E L G L S W V F L V A I F K G V Q C

A.2.2 *Chicken immunoglobulin like receptor AB1 ecd*

ctgcccccaaccctccctgtcgctgcaccccagccaggggggtgccttgggggacactgtc 60
 L P Q P S L S L H P S Q G V S L G D T V
 accctgcgctgccacctgccccgcatggctgcctgggtccagctctggctcaatggaact 120
 T L R C H L P R M A A W V Q L W L N G T
 ctgagatttgacaaggaaaaagacaaggagcaggatgcagctgagttctcctttgctgtc 180
 L R F D K E K D K E Q D A A E F S F A V
 acaaacctggaggacgccgggacatatcagtgctcggtaccaggtgtcagagccactgtgg 240
 T N L E D A G T Y Q C R Y Q V S E P L W
 acatcaaatacagagtgaccccgaggctgggtgctgacaggtgccaaggagtggtcccat 300
 T S N Q S D P V E L V L T G A K E W S H

A.2.3 Allergene

	Bet v 1a	Mal d 1	Gly m 4
WHO/IUIS	Bet v 1.0101	Mal d 1.0201	Gly m 4.0101
Klasse	<i>Magnoliopsida</i>		
Ordnung	<i>Rosales</i>		<i>Fabales</i>
Art	<i>Betula verrucosa</i>	<i>Malus domestica</i>	<i>Glycine max</i>
GenBank Nucleotide	X15877	L42952	X60043
UniProt	P15494	Q40280	P26987
PDB	1BTV	-	2H7K
Referenzen	[186, 260, 261]	[262]	[187, 263]

Bet v 1a

ggtgtatttaattatgagactgagaccacctctggtatcccagcagctaggctggtcaag 60
G V F N Y E T E T T S V I P A A R L F K
gcctttatcctcgatggcgataatctcattccaaagggtgcaccccnagccattagcagt 120
A F I L D G D N L I P K V A P X A I S S
gttgaaaacattgaaggaaatggaggcctggaaccattaagaagatcagctttcccgaa 180
V E N I E G N G G P G T I K K I S F P E
ggcttccctttcaagtacgtgaaggacagagttgatgaggtggaccacacaaacttcaa 240
G F P F K Y V K D R V D E V D H T N F K
tacaattacagcgtgatcgagggcggtcccatagggcgacacattggagaagatctccaac 300
Y N Y S V I E G G P I G D T L E K I S N
gagataaagctagtggaacccctgatggaggatccatcttgaagatcagcaacaagtac 360
E I K L V A T P D G G S I L K I S N K Y
cacaccaaagggcgaccatgaggtgaaggcagagcaggttaaggcaagtaagaaatgggc 420
H T K G D H E V K A E Q V K A S K E M G
gagacacttttgagggccggttgagagctacctcttggcacactccgatgcctacaac 480
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N

Mal d 1

ggtgtctacacatttgagaacgagtacacctctgagattccaccaccaagattggtcaag 60
G V Y T F E N E Y T S E I P P P R L F K
gcctttgtcctcgatgctgataacctcatccccaagattgcaccccaggcaatcaagcat 120
A F V L D A D N L I P K I A P Q A I K H
gctgagatccttgaggagacggtggccctggaaccatcaagaagatcacttttggtgaa 180
A E I L G G D G G P G T I K K I T F G E
ggcagccaatacggctacgtgaagcacaagatcgactcggttgacgaggcaaactactca 240
G S Q Y G Y V K H K I D S V D E A N Y S
tacgcctacactttgattgaaggagatgctttgacagacaccattgagaaggctctcttac 300
Y A Y T L I E G D A L T D T I E K V S Y
gagaccaagctggtggcatctggaagtggttccatcatcaagagtatcagccactaccac 360
E T K L V A S G S G S I I K S I S H Y H
accaagggatgattgagaccaaggaagagcacgtcaaggctggcaaagagaaggctcat 420
T K G D V E T K E E H V K A G K E K A H
ggtttggtcaagcttattgagagctaccttaagggccaccccgacgcatacaac 480
G L F K L I E S Y L K G H P D A Y N

Gly m 4

ggtgttttcacattcgaggatgaaatcaactcccctgtggctcctgctactctttacaag 60
 G V F T F E D E I N S P V A P A T L Y K
 gccctagttacagatgccgacaacgtcatcccaaaggctcttgattccttcaagagtgtt 120
 A L V T D A D N V I P K A L D S F K S V
 gaaaacgttgagggaaatggtggcccaggaacctcaagaagatcactttccttgaggat 180
 E N V E G N G G P G T I K K I T F L E D
 ggagaaaccaagtttgtgctgcacaaaatagaaagcattgatgaggcgaacttgggatat 240
 G E T K F V L H K I E S I D E A N L G Y
 agctacagcgtggttgggggtgctgcattgccagacacggcggagaagatcacattcgac 300
 S Y S V V G G A A L P D T A E K I T F D
 tccaaattggttgcgtgggtcccaatggagggctctgctgggaagctcactgtcaaatacгаа 360
 S K L V A G P N G G S A G K L T V K Y E
 acaaaaggagatgctgagcccaaccaagacgaactcaaaactggaaaagccaaggctgat 420
 T K G D A E P N Q D E L K T G K A K A D
 gctctcttcaaggccattgaggcttaccttttggcccatcccgattacaac 480
 A L F K A I E A Y L L A H P D Y N

Bet v 1a*

aaaggcgaccatgaggtgaaggcagagcaggttaaggcaagtaagaaatgggcgagaca 60
 K G D H E V K A E Q V K A S K E M G E T
 cttttgagggccggttgagagctacctcttggcacactctgatgcctacaac 120
 L L R A V E S Y L L A H S D A Y N

Bet v 1a* E149G

aaaggcgaccatgaggtgaaggcagagcaggttaaggcaagtaagaaatgggcgagaca 60
 K G D H E V K A E Q V K A S K E M G E T
 cttttgagggccggttgagagctacctcttggcacactctgatgcctacaac 120
 L L R A V G S Y L L A H S D A Y N

A.2.4 Primärsequenzalignment der Allergene

Bet v 1a – Mal d 1

Bet v 1a	G V F N Y E T E T T S V I P A A R L F K A F I L D	25
Mal d 1	G V Y T F E N E Y T S E I P P P R L F K A F V L D	25
	* * : : * * * * * * * * * * * * : * *	
Bet v 1a	G D N L I P K V A P X A I S S V E N I E G N G G P	50
Mal d 1	A D N L I P K I A P Q A I K H A E I L G G D G G P	50
	* * * * * * : * * * * * * * : * : * * *	
Bet v 1a	G T I K K I S F P E G F P F K Y V K D R V D E V D	75
Mal d 1	G T I K K I T F G E G S Q Y G Y V K H K I D S V D	75
	* * * * * * : * * * * * * : * * * : : * * *	
Bet v 1a	H T N F K Y N Y S V I E G G P I G D T L E K I S N	100
Mal d 1	E A N Y S Y A Y T L I E G D A L T D T I E K V S Y	100
	* : * * : : * * * * : * * : * * : *	
Bet v 1a	E I K L V A T P D G G S I L K I S N K Y H T K G D	125
Mal d 1	E T K L V A S - G S G S I I K S I S H Y H T K G D	124
	* * * * * : * * * : * : * * * * *	
Bet v 1a	H E V K A E Q V K A S K E M G E T L L R A V E S Y	150
Mal d 1	V E T K E E H V K A G K E K A H G L F K L I E S Y	149
	* * * * * * * * * * * * : : * * *	
Bet v 1a	L L A H S D A Y N	159
Mal d 1	L K G H P D A Y N	158
	* * * * *	

Bet v 1a – Gly m 4

Bet v 1a	G V F N Y E T E T T S V I P A A R L F K A F I L D	25
Gly m 4	G V F T F E D E I N S P V A P A T L Y K A L V T D	25
	* * * : * * * : * * : * * : *	
Bet v 1a	G D N L I P K V A P X A I S S V E N I E G N G G P	50
Gly m 4	A D N V I P K - A L D S F K S V E N V E G N G G P	49
	* * : * * * * : * * * * * *	
Bet v 1a	G T I K K I S F P E G F P F K Y V K D R V D E V D	75
Gly m 4	G T I K K I T F L E D G E T K F V L H K I E S I D	74
	* * * * * : * * * : * : : : *	
Bet v 1a	H I G D T L E K I S N E T N F K Y N Y S V I E G G	100
Gly m 4	E L P D T A E K I T F D A N L G Y S Y S V V G G A	99
	: * * * * * : : * * : * * * : *	
Bet v 1a	P H T K G D I K L V A T P D G G S I L K I S N K Y	125
Gly m 4	A E T K G D S K L V A G P N G G S A G K L T V K Y	124
	* * * * * * * * * * : * * * * : : * *	
Bet v 1a	H E V K A E Q V K A S K E M G E T L L R A V E S Y	150
Gly m 4	A E P N Q D E L K T G K A K A D A L F K A I E A Y	149
	* : : * * * : * : * : * : *	
Bet v 1a	L L A H S D A Y N	159
Gly m 4	L L A H P D - Y N	157
	* * * * * * * *	

Gly m 4 – Mal d 1

Gly m 4	G V F T F E D E I N S P V A P A T L Y K A L V T D	25
Mal d 1	G V Y T F E N E Y T S E I P P P R L F K A F V L D	25
	* * : * * * : * * : * * : * * * *	
Gly m 4	A D N V I P K - A L D S F K S V E N V E G N G G P	49
Mal d 1	A D N L I P K I A P Q A I K H A E I L G G D G G P	50
	* * * : * * * * : * * * : * * * *	
Gly m 4	G T I K K I T F L E D G E T K F V L H K I E S I D	74
Mal d 1	G T I K K I T F G E G S Q Y G Y V K H K I D S V D	75
	* * * * * * * * * * : * * * * : * * *	
Gly m 4	E A N L G Y S Y S V V G G A A L P D T A E K I T F	99
Mal d 1	E A N Y S Y A Y T L I E G D A L T D T I E K V S Y	100
	* * * * : * : : : * * * * * * : : :	
Gly m 4	D S K L V A G P N G G S A G K L T V K Y E T K G D	124
Mal d 1	E T K L V A S - G S G S I I K S I S H Y H T K G D	124
	: : * * * * * * * * * * * * * * *	
Gly m 4	A E P N Q D E L K T G K A K A D A L F K A I E A Y	149
Mal d 1	V E T K E E H V K A G K E K A H G L F K L I E S Y	149
	* : : : * * * * * * * * * * * * : *	
Gly m 4	L L A H P D - Y N	157
Mal d 1	L K G H P D A Y N	158
	* * * * * *	

A.2.5 Maltose bindendes Protein (MBP)

Die erste und letzte Aminosäure der MBP-Sequenz sind grau hinterlegt.

```

atgaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggattaacggcgataaaggctataacgggt      60
M K I E E G K L V I W I N G D K G Y N G
ctcgctgaagtcggttaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccggttgagcat    120
L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H
ccgataaactggaagagaaattcccacaggttgcggaactggcgatggccctgacatt      180
P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I
atcttctgggcacacgaccgctttgggtggctacgctcaatctggcctggttgctgaaatc    240
I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I
accccgacaaaagcgttccaggacaagctgtatccgtttacctgggatgccgtacgttac    300
T P D K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y
aacggcaagctgattgcttaccgatcgctggtgaagcgttatcgctgatttataacaaa    360
N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K
gatctgctgccgaacccgccaaaaacctgggaagagatcccgcgctggataaagaactg    420
D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L
aaagcgaaaggtaagagcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccg    480
K A K G K S A L M F N L Q E P Y F T W P
ctgattgctgctgacgggggttatgcttcaagtatgaaaacggcaagtacgacattaaa    540
L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K
gacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttctggttgacctgatt    600
D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I
aaaaacaaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaa    660
K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K
ggcgaaacagcgatgaccatcaacggcccgtgggcatggtccaacatcgacaccagcaaa    720
G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K
gtgaattatggtgtaacgggtactgccgaccttcaagggtcaaccatccaaaccgttcgtt    780
V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V
ggcgtgctgagcgcaggtattaacgccgccagtcgcaacaaagagctggcaaaagagttc    840
G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F
ctcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcggttaataaagacaaaccgctg    900
L E N Y L L T D E G L E A V N K D K P L
ggtgccgtagcgtgaagtcttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgcc    960
G A V A L K S Y E E E L A K D P R I A A
actatggaaaacgccagaaaggtgaaatcatgccgaacatcccgcagatgtccgctttc    1020
T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S A F

```

```

tggatgcccgtgcgtactgcggtgatcaacgccgccagcggtcgtcagactgtcgatgaa      1080
  W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E
gccctgaaagacgcgcagactaattcgagctcgaacaacaacaataacaataacaac      1140
  A L K D A Q T N S S S N N N N N N N N N
aacctcgggatcgaggaaggatttcagaattcggatcctctagagtcgacctgcaggca      1200
  N L G I E G R I S E F G S S R V D L Q A
agcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaa      1260
  S L A L A V V L Q R R D W E N P G V T Q
cttaatcgccttgcagcacatcccccttccgccagctggcgtaatagcgaagaggccgc      1320
  L N R L A A H P P F A S W R N S E E A R
accgatcgccttcccaacagttgcgagcctgaatggcgaatggcagcttggctgtttt      1380
  T D R P S Q Q L R S L N G E W Q L G C F
ggcgga                                                                    1440
  G G

```

A.2.6 CHIR-AB1-huFc-Konstrukte

Gezeigt sind jeweils die letzten fünf Aminosäuren des avianen Rezeptors und der Übergang in den Fc-Part der schweren Ketten humaner Antikörperisotypen. Erste und letzte Aminosäure des Fc-Parts sind grau hinterlegt.

humanFcεC_H2-4

```

aaggagtgggtcccatggcgcgcccaccgtgaagatcttacagtcgctcctgcgacggcggc      60
  K E W S H G A P T V K I L Q S S C D G G
gggcacttccccccgaccatccagctcctgtgcctcgtctctgggtacaccccagggact      120
  G H F P P T I Q L L C L V S G Y T P G T
atcaacatcacctggctggaggacgggcaggtcatggacgtggacttgtccaccgcctct      180
  I N I T W L E D G Q V M D V D L S T A S
accacgcaggaggggtgagctggcctccacacaaagcgagctcaccctcagccagaagcac      240
  T T Q E G E L A S T Q S E L T L S Q K H
tggctgtcagaccgcacctacacctgccaggtcacctatcaaggtcacacctttgaggac      300
  W L S D R T Y T C Q V T Y Q G H T F E D
agcaccaagaagtgtgcagattccaacccgagaggggtgagcgcctacctaagccggccc      360
  S T K K C A D S N P R G V S A Y L S R P
agcccgttcgacctgttcatccgcaagtgcgccacgatcacctgtctggtgggtggacctg      420
  S P F D L F I R K S P T I T C L V V D L

```

gcaccagcaaggggaccgtgaacctgacctggtcccggggccagtgggaagcctgtgaac 480
 A P S K G T V N L T W S R A S G K P V N
 cactccaccagaaaggaggagaagcagcgcaatggcacgttaaccgtcacgtccaccctg 540
 H S T R K E E K Q R N G T L T V T S T L
 ccggtgggcacccgagactggatcgagggggagacctaccagtgcagggtgacccacccc 600
 P V G T R D W I E G E T Y Q C R V T H P
 cacctgccagggccctcatgcggtccacgaccaagaccagcggcccgcgtgctgccccg 660
 H L P R A L M R S T T K T S G P R A A P
 gaagtctatgcgtttgcgacgccggagtggccggggagccgggacaagcgcaccctcgcc 720
 E V Y A F A T P E W P G S R D K R T L A
 tgctgatccagaacttcatgcctgaggacatctcggtgcagtggtgcacaacgaggtg 780
 C L I Q N F M P E D I S V Q W L H N E V
 cagctcccggacgcccggcacagcacgacgcagccccgcaagaccaagggctccggcttc 840
 Q L P D A R H S T T Q P R K T K G S G F
 ttcgtcttcagccgctggaggtgaccagggccgaatgggagcagaaagatgagttcatc 900
 F V F S R L E V T R A E W E Q K D E F I
 tgccgtgcagtcctatgaggcagcgagcccctcacagaccgtccagcgcagcgggtgtctgta 960
 C R A V H E A A S P S Q T V Q R A V S V
 aatcccggtaaacaccatcaccac 1020
 N P G **K** H H H H

humanFc γ_1 C_{H2+3}

aaggagtgggtcccattggcgcgcccacaaatcttgtagacaaaactcacacatgcccaccgtgc 60
 K E W S H G A P **K** S C D K T H T C P P C
 ccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaaccaaggac 120
 P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D
 accctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtgggtggacgtgagccacgaa 180
 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E
 gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca 240
 D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T
 aagccgcgggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg 300
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L
 caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccca 360
 H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P
 gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac 420
 A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y

accctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtc 480
 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V
 aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac 540
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
 aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag 600
 N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K
 ctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat 660
 L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H
 gaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaacaccac 720
 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K H H
 caccaccac 780
 H H H

humanFcγ₄C_H2+3

aaggagtgggtcccatggcgcgcccagcaacaccaaggtggacaggagagttgagtccaaa 60
 K E W S H G A P S N T K V D R R V E S K
 tatgggtccccatgcccacatgcccagcacctgagttcctggggggaccatcagtcttc 120
 Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V F
 ctgttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgc 180
 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C
 gtgggtggtagcgtgagccaggaagacccccgagatccagttcaactggtacgtggatggc 240
 V V V D V S Q E D P E I Q F N W Y V D G
 gtggaggtgcataatgccaagacaaggccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgt 300
 V E V H N A K T R P R E E Q F N S T Y R
 gtggtcggcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgc 360
 V V G V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
 aaggctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg 420
 K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G
 cagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaac 480
 Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N
 caggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgg 540
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
 gagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac 600
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
 ggctccttcttctctacagcaggtaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggggagt 660
 G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G S

gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctc 720
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
tcctgtctctgggtaaacatcaccacat 780
S L S L G K H H H H

humanFc μ C_H2-4

gccaaggagtggatcccatggcgcgccagtgattgccgagctgcctcccaaagtgagcgtc 60
A K E W S H G A P V I A E L P P K V S V
ttcgtcccacccccgcgacggcttcttcagcaacccccgcaagtcctcaagctcatctgccag 120
F V P P R D G F F S N P R K S K L I C Q
gccacgggtttcagtcctcccgagattcaggtgtcctggctgcgagggggaagcaggtg 180
A T G F S P R Q I Q V S W L R E G K Q V
gggtctggcgtcaccacggaccaggtgcaggctgaggccaaagagtctgggcccacgacc 240
G S G V T T D Q V Q A E A K E S G P T T
tacaaggtgaccagtacactgaccatcaaagagagcgactggctcagccagagcatgttc 300
Y K V T S T L T I K E S D W L S Q S M F
acctgccgcgtggatcacagggcctgaccttcagcagaatgcgtcctccatgtgtgtc 360
T C R V D H R G L T F Q Q N A S S M C V
cccgatcaagacacagccatccgggtcttcgccatcccccatcctttgccagcatcctc 420
P D Q D T A I R V F A I P P S F A S I L
ctcaccaagtccaccaagttgacctgcctggtcacagacctgaccacctatgacagcgtg 480
L T K S T K L T C L V T D L T T Y D S V
accatctcctggaccgccagaatggcgaagctgtgaaaacccacaccaacatctccgag 540
T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E
agccacccaatgccactttcagcgcctgggtgaggccagcacctccgaggatgactgg 600
S H P N A T F S A V G E A S T S E D D W
aattccgggggagaggttcacgtgcaccgtgaccacacagacctgccctcgccactgaag 660
N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K
cagaccatctcccggcccaaggggggtggccctgcacaggcccgatgtctacttgtgcc 720
Q T I S R P K G V A L H R P D V Y L L P
ccagcccgggagcagctgaacctgcgggagtcggccaccatcacgtgcctgggtgacgggc 780
P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G
ttctctcccgcggacgtcttcgtgcagtgatgacaggggggcagcccttgtcccggag 840
F S P A D V F V Q W M Q R G Q P L S P E
aagtatgtgaccagcgcaccaatgcctgagccccaggccccaggccggtacttcgccac 900
K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H

agcatcctgaccgtgtccgaagaggaatggaacacgggggagacctacacctgcgtggtg 960
 S I L T V S E E E W N T G E T Y T C V V
 gcccatgaggccctgcccacaggggtcaccgagaggaccgtggacaagtccaccggtaaa 1020
 A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K
 cccaccctgtacaacgtgtccctgggtcatgtccgacacagctggcacctgctaccaccac 1080
 P T L Y N V S L V M S D T A G T C Y H H
 caccaccaccac 1140
 H H H H

humanFc α ₁C_H2+3

aaggagtgggtcccatggcgcgcccgttccctcaactccacctaccccatctccctcatgc 60
 K E W S H G A P V P S T P P T P S P S C
 tgccacccccgactgtcactgcaccgaccggccctcgaggacctgctcttaggttcagag 120
 C H P R L S L H R P A L E D L L L G S E
 gcgaacctcacgtgcacactgaccggcctgagagatgcctcaggtgtcaccttcacctgg 180
 A N L T C T L T G L R D A S G V T F T W
 acaccctcaagtggaaagagcgtgttcaaggaccacctgagcgtgacctctgtggctgc 240
 T P S S G K S A V Q G P P E R D L C G C
 tacagcgtgtccagtgtcctgcccgggtgcgcccagccatggaacctgggaagaccttc 300
 Y S V S S V L P G C A E P W N H G K T F
 acttgcactgctgcctaccccgagtccaagaccccgctaaccgccaccctctcaaaatcc 360
 T C T A A Y P E S K T P L T A T L S K S
 ggaaacacattccggcccgggtccacctgctgccgcccgcgtcggaggagctggccctg 420
 G N T F R P E V H L L P P P S E E L A L
 aacgagctgggtgacgctgacgtgcctggcacgcggcttcagcccccaaggacgtgctggtt 480
 N E L V T L T C L A R G F S P K D V L V
 cgctggctgcaggggtcacaggagctgccccgcgagaagtacctgacttgggcatcccgg 540
 R W L Q G S Q E L P R E K Y L T W A S R
 caggagcccagccagggcaccaccaccttcgctgtgaccagcatactgcgctggcagcc 600
 Q E P S Q G T T T F A V T S I L R V A A
 gaggactggaagaagggggacaccttctcctgcatggtgggcccacgaggccctgccgctg 660
 E D W K K G D T F S C M V G H E A L P L
 gccttcacacagaagaccatcgaccgcttggcgggtaaacccacccatgtcaatgtgtct 720
 A F T Q K T I D R L A G K P T H V N V S

gttgtcatggcggaggtggacggcacctgctaccatcaccacat 780
 V V M A E V D G T C Y H H H H

humanFc α_2 C_{H2+3}

aaggagtgggtcccatggcgcgccctgccgagttccccacctccccatgctgccacccc 60
 K E W S H G A P C R V P P P P P C C H P
 cgactgtcgctgcaccgaccggcctcgaggacctgctcttaggttcagaagcgaacctc 120
 R L S L H R P A L E D L L L G S E A N L
 acgtgcacactgaccggcctgagagatgcctctggtgccaccttcacctggacgccctca 180
 T C T L T G L R D A S G A T F T W T P S
 agtgggaagagcgtgttcaaggaccacctgagcgtgacctctgtggctgctacagcgtg 240
 S G K S A V Q G P P E R D L C G C Y S V
 tccagtgtcctgctggctgtgcccagccatggaacatggggagaccttcacctgcact 300
 S S V L P G C A Q P W N H G E T F T C T
 gctgcccaccccgagttgaagaccccactaacccccaacatcacaaaatccggaaacaca 360
 A A H P E L K T P L T A N I T K S G N T
 ttccggcccggaggtccacctgctgcccggccgctcggaggagctggccctgaacgagctg 420
 F R P E V H L L P P P S E E L A L N E L
 gtgacgtgacgtgacctggcacgtggcttcagcccccaaggatgtgctggttcgctggctg 480
 V T L T C L A R G F S P K D V L V R W L
 caggggtcacaggagctgccccgcgagaagtacctgacttgggcatcccggcaggagccc 540
 Q G S Q E L P R E K Y L T W A S R Q E P
 agccagggcaccaccaccttcgctgtgaccagcatactgcgcgtggcagccgaggactgg 600
 S Q G T T T F A V T S I L R V A A E D W
 aagaagggggacaccttctcctgcatggtgggcccacgaggccctgccgctggccttcaca 660
 K K G D T F S C M V G H E A L P L A F T
 cagaagaccatcgaccgcttggcgggtaaaccacccatgtcaatgtgtctgttgtcatg 720
 Q K T I D R L A G K P T H V N V S V V M
 gcggaggtggacggcacctcctgccatcaccacat 780
 A E V D G T C Y H H H H

A.3 Vergleich zwischen humanen Antikörpern und den CHIR-AB1-huFc-Konstrukten

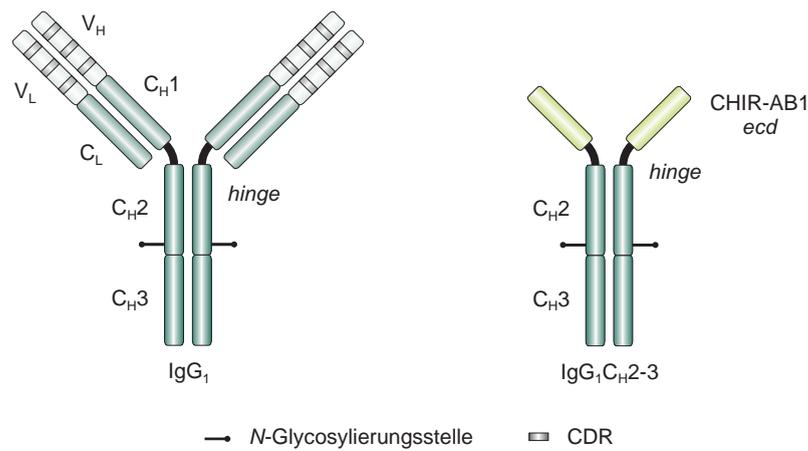


Abbildung A.1: Schematische Darstellung des humanen Antikörpers IgG₁ im Vergleich zu CHIR-AB1-huIgG₁C_H2-3. Dargestellt sind die schweren (H) und leichten (L) Domänen der konstanten (C) bzw. variablen (V) Ketten der Immunglobuline. Darüber hinaus sind die N-Glycosylierungsstellen sowie die hypervariablen Bereiche (CDR) gekennzeichnet.

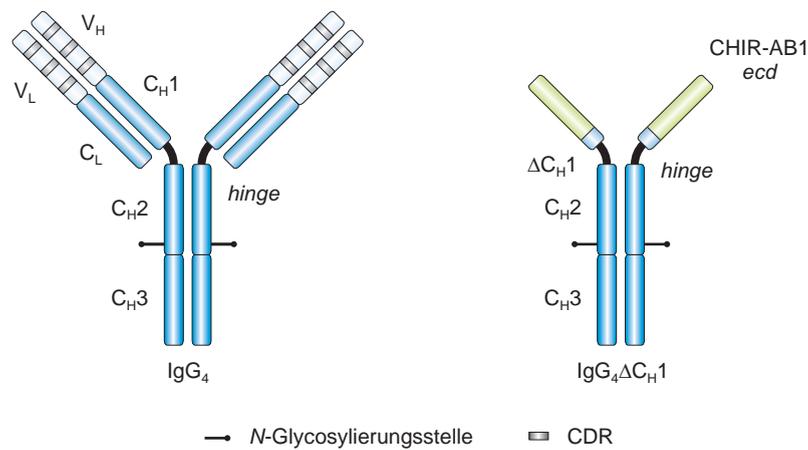


Abbildung A.2: Schematische Darstellung des humanen Antikörpers IgG₄ im Vergleich zu CHIR-AB1-huIgG₄ΔC_H1. Dargestellt sind die schweren (H) und leichten (L) Domänen der konstanten (C) bzw. variablen (V) Ketten der Immunglobuline. Darüber hinaus sind die N-Glycosylierungsstellen sowie die hypervariablen Bereiche (CDR) gekennzeichnet.

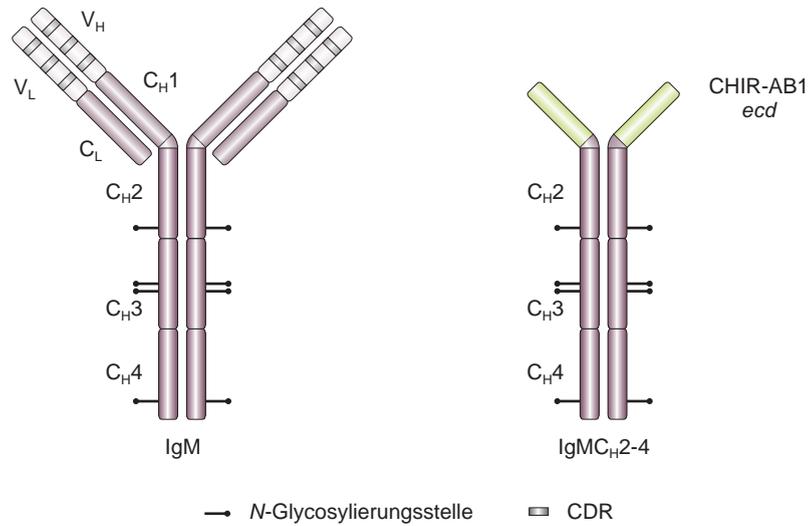


Abbildung A.3: Schematische Darstellung des humanen Antikörpers IgM im Vergleich zu CHIR-AB1-huIgMC_H2-4. Dargestellt sind die schweren (H) und leichten (L) Domänen der konstanten (C) bzw. variablen (V) Ketten der Immunglobuline. Darüber hinaus sind die N-Glycosylierungsstellen sowie die hypervariablen Bereiche (CDR) gekennzeichnet.

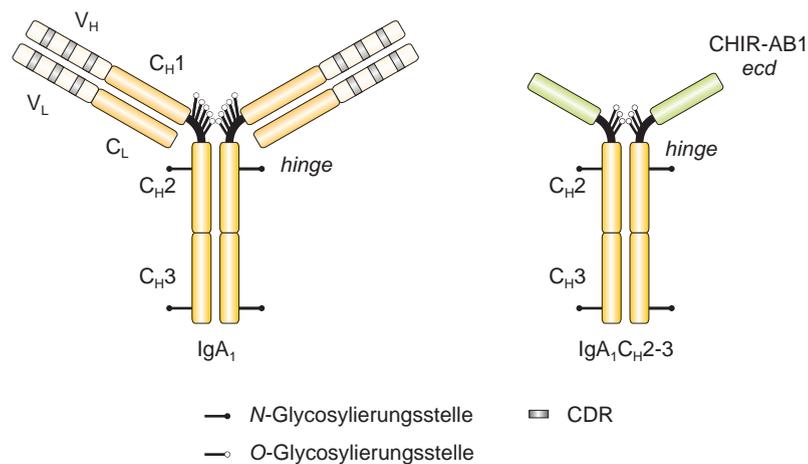


Abbildung A.4: Schematische Darstellung des humanen Antikörpers IgA₁ im Vergleich zu CHIR-AB1-huIgA₁C_H2-3. Dargestellt sind die schweren (H) und leichten (L) Domänen der konstanten (C) bzw. variablen (V) Ketten der Immunglobuline. Darüber hinaus sind die N- und O-Glycosylierungsstellen sowie die hypervariablen Bereiche (CDR) gekennzeichnet.

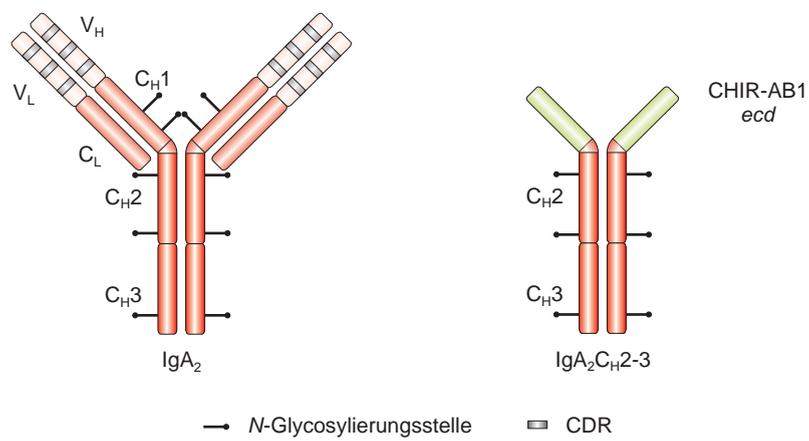


Abbildung A.5: Schematische Darstellung des humanen Antikörpers IgA₂ im Vergleich zu CHIR-AB1-huIgA₂C_H2-3. Dargestellt sind die schweren (H) und leichten (L) Domänen der konstanten (C) bzw. variablen (V) Ketten der Immunglobuline. Darüber hinaus sind die N-Glycosylierungsstellen sowie die hypervariablen Bereiche (CDR) gekennzeichnet.

A.4 Vektorkarten

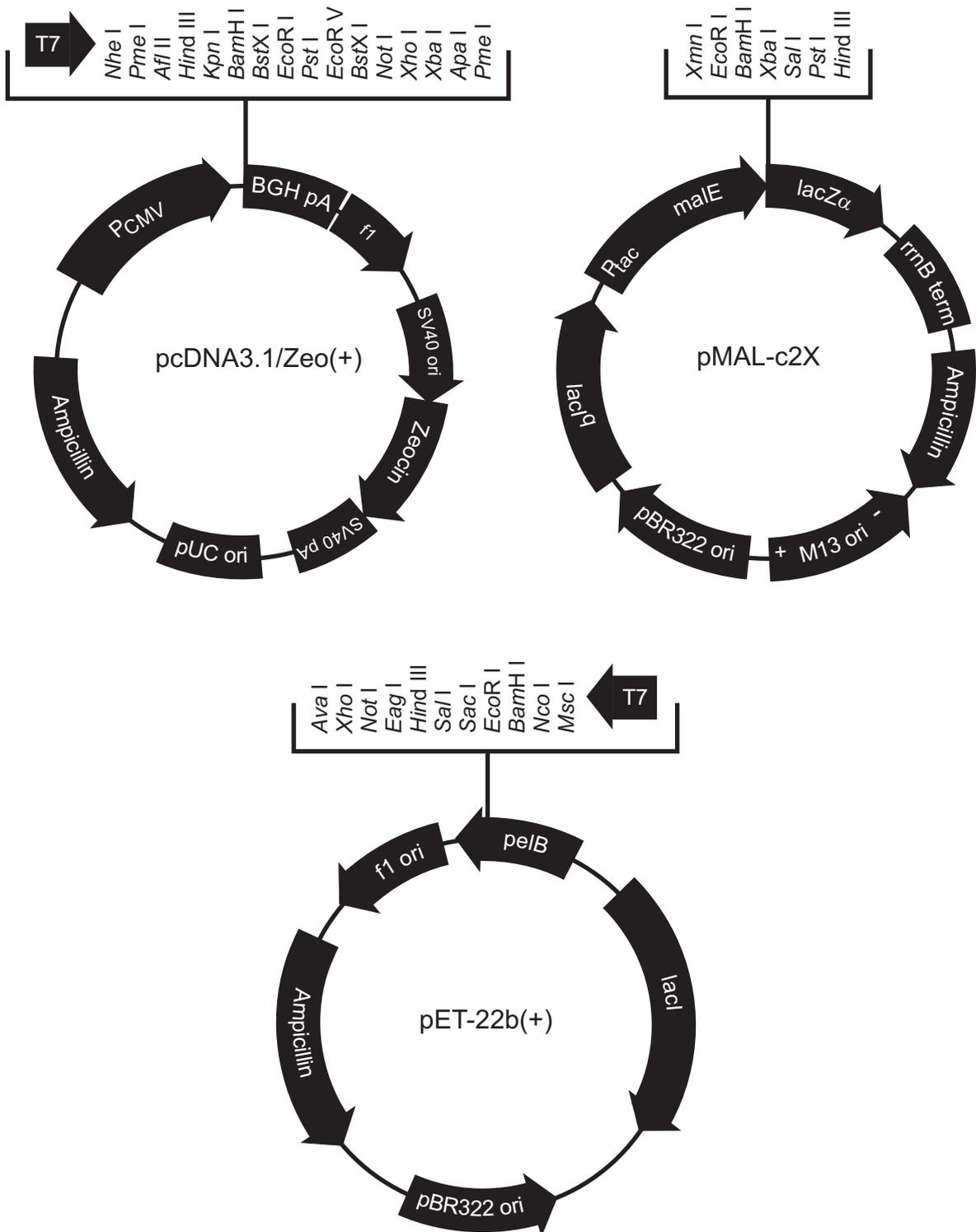


Abbildung A.6: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erhältlichen Vektoren

A.5 Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren

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

Tabelle A.1: Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren

A.6 Entsorgung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden den jeweiligen H- und P-Sätzen entsprechend gehandhabt und gemäß Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) entsorgt.

Ethidiumbromid-haltige Abfälle wurden in gesonderten Behältern gesammelt und der Entsorgung zugeführt.

Der Umgang mit humanen Zellen wurde ausschließlich auf Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 nach §7 GenTG beschränkt. In S1-Laboratorien angefallene Abfälle insbesondere durch gentechnisch veränderte Organismen kontaminierte Abfälle wurden vor der Entsorgung vorzugsweise in einem Autoklaven durch Einleiten gespannten Wasserdampfes sterilisiert (120 °C, 5 bar, 20 min).

A.7 Gefahrstoffe und Sicherheitsdaten gemäß GHS

Name	Signalwort	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Bes. Merkmale
Acrylamid	Gefahr	GHS06, GHS07, GHS08	H301, H312, H332, H315, H319, H317, H340, H350, H361f, H372	P280, P201, P305+P351+P338	Carc. Cat. 1B Mut. Cat. 1B Repr. Cat. 2
4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald®)	Achtung	GHS07	H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338	-
Ammoniumperoxodisulfat	Gefahr	GHS03, GHS07, GHS08	H272, H302, H315, H319, H334, H317, H335	P280, P305+P351+P338, P342+P311, P304+P341, P302+P352	-
Ampicillin	Gefahr	GHS08	H334, H317	P280	-
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), Dinatriumsalz	Achtung	GHS07	H315, H319, H335	P305+P351+P338	-
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	***				
Calciumchlorid-Dihydrat	Achtung	GHS07	H319	P101, P102, P103, P280, P264, P305+P351+P338, P337+P313	-
Chloroform	Achtung	GHS07, GHS08	H302, H315, H351, H373	P314, P302+P352	Carc. Cat. 2

** nicht vollständig geprüfter Stoff; *** keine Einstufung gemäß CLP-Verordnung

Tabelle A.2: Sicherheitsinformationen und Gefahrenmerkmale der verwendeten Chemikalien und Gemische nach GHS (Fortsetz. nächste Seite)

Name	Signalwort	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Bes. Merkmale
Coomassie® Brilliant Blau R-250	***				
1,10-Decanamin	Gefahr	GHS05	H314	P280, P305+P351+P338, P310	-
Dichlormethan	Gefahr	GHS07, GHS08	H351	P281, P308+P313	Carc. Cat. 2
N,N-Dimethylformamid	Gefahr	GHS02, GHS07, GHS08	H226, H313, H332, H319, H360d	P101, P102, P103, P201, P305+P351+P338, P308+P313, P302+P352	Repr. Cat. 1B
Dimethylsulfoxid (DMSO)	***				
Dithiothreitol (DTT)	Achtung	GHS07	H302, H315, H319	P101, P102, P103, P305+P351+P338, P302+P350	-
EDTA, Dinatriumsalz	***				
Ethanol	Gefahr	GHS02	H225	P210	-
Ethidiumbromid	Gefahr	GHS06, GHS08	H302, H330, H341	P281, P305+P351+P338, P309, P310, P302+P352	Mut. Cat. 2
Ethylenglycol	Achtung	GHS07	H302	P264, P301+P312, P330	-

** nicht vollständig geprüfter Stoff; *** keine Einstufung gemäß CLP-Verordnung

Tabelle A.2: Sicherheitsinformationen und Gefahrenmerkmale der verwendeten Chemikalien und Gemische nach GHS (Fortis. nächste Seite)

Name	Signalwort	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Bes. Merkmale
Glutardialdehyd, 25 %	Gefahr	GHS05, GHS06, GHS08, GHS09	H301, H331, H314, H334, H317, H400	P273, P305+P351+P338, P403+P233	-
Glycerol, 87 %	***				
Glycin	***				
Imidazol	Gefahr	GHS05, GHS07, GHS08	H302, H314, H361	P101, P102, P103, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P321, P301+P312	Repr. Cat. 2
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	***				
Methanol	Gefahr	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301, H311, H331, H370	P101, P102, P103, P280, P301+P310, P303+P361+P353, P361, P405, P501	-
3-Morpholinopropansulfondäure (MOPS)	***				
Natriumacetat-Trihydrat	***				
Natriumcitrat	***				

** nicht vollständig geprüfter Stoff; *** keine Einstufung gemäß CLP-Verordnung

Tabelle A.2: Sicherheitsinformationen und Gefahrenmerkmale der verwendeten Chemikalien und Gemische nach GHS (Fortis. nächste Seite)

Name	Signalwort	GHS-Symbol	HI-Sätze	P-Sätze	Bes. Merkmale
Natriumcyanoborhydrid	Gefahr	GHS02, GHS05, GHS06, GHS09	EUH032, H300, H310, H314, H330, H410	P260, P262, P264, P273, P280, P284	-
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	***				
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Achtung	GHS02, GHS07	H228, H302, H312, H315, H319, H335	P210, P241, P305+P351+P338, P321	-
Natriumhydrogencarbonat	***				
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	***				
Natriumhydroxid	Gefahr	GHS05	H290, H314	P280, P305+P351+P338, P301+P330+P331	-
Natrium- <i>meta</i> -periodat	Gefahr	GHS03	H301, H315, H319, H335	P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352	-
Nickelsulfat	Gefahr	GHS07, GHS08, GHS09	H302, H315, H317, H332, H334, H341, H350i, H360d, H372, H410	P201, P261, P273, P280, P308+P313, P501	Carc. Cat. 1A Mut. Cat. 1B Repr. Cat. 2
Ni-NTA Agarose**	Gefahr	GHS02, GHS07, GHS08	H226, H302, H317, H334, H351	P101, P102, P233, P261, P302+P352, P304+P341	Carc. Cat. 2
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	***				

** nicht vollständig geprüfter Stoff; *** keine Einstufung gemäß CLP-Verordnung

Tabelle A.2: Sicherheitsinformationen und Gefahrenmerkmale der verwendeten Chemikalien und Gemische nach GHS (Forts. nächste Seite)

Name	Signalwort	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Bes. Merkmale
<i>para</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	***				
Phenol	Gefahr	GHS05, GHS06, GHS08	H302, H311, H331, H314, H341, H373	P280, P260, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P361, P405	Mut. Cat. 2
Polyvinylalkohol 31 000-50 000 (PVA)	***				
2-Propanol	Gefahr	GHS02, GHS07	H225, H319, H336	P210, P233, P305+P351+P338	-
Salzsäure, 37 %	Gefahr	GHS05, GHS07	H290, H314, H335	P280, P305+P351+P338, P301+P330+P331	-
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Gefahr	GHS02, GHS05, GHS07	H225, H302, H332, H314	P210, P280, P233, P305+P351+P338, P301+P330+P331	-
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)	Gefahr	GHS05, GHS07	H302, H314, H317	P280, P305+P351+P338, P310	-
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid	***				
<i>N</i> -Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin (TRIS)	***				
Wasserstoffperoxid, 30 %	Gefahr	GHS05, GHS07	H302, H332, H318	P280, P305+P351+P338, P313	-

** nicht vollständig geprüfter Stoff; *** keine Einstufung gemäß CLP-Verordnung

Tabelle A.2: Sicherheitsinformationen und Gefahrenmerkmale der verwendeten Chemikalien und Gemische nach GHS (Fortis. nächste Seite)

Name	Signalwort	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Bes. Merkmale
Xylen Cyanol FF	Achtung	GHS07	H319, H335	P261, P280, P304+P340, P305+P351+P338, P337+P313	-
Zeocin® (Phleomycin D)	Achtung	GHS07, GHS08, GHS09	H302, H341	P264, P301+P312	Mut. Cat. 2

** nicht vollständig geprüfter Stoff; *** keine Einstufung gemäß CLP-Verordnung

Tabelle A.2: Sicherheitsinformationen und Gefahrenmerkmale der verwendeten Chemikalien und Gemische nach GHS

Danksagung

- Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeiten zur Anfertigung dieser Arbeit in seinem Arbeitskreis.
- Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.
- Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Edzard Spillner, der durch seine unermüdliche Bereitschaft zu Hilfestellungen und Diskussionen maßgebliche Unterstützung geleistet hat.
- Allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppen Bredehorst und Spillner danke ich für die angenehme Atmosphäre und die entgegengebrachte Hilfestellung.
- Andrea und Julia danke ich für die Durchsicht der Arbeit.
- Danke Klaus Wiehler von der Firma SierraSensors für die praktische Einführung und Hilfe bei den SPR-Messungen.
- Meiner lieben Frau Nicole danke ich für die Liebe und die Unterstützung während dieser nicht immer leichten Zeit des Promotionsstudiums.
- Meinen Eltern, meiner Schwester Claudia und meiner Oma danke ich ebenfalls für die Unterstützung und die Motivation.