

Interaktion und strukturelle Aspekte
humaner IgE-Antikörper
im Kontext der Allergie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sara V. Wolf

aus Hamburg

Hamburg 2015

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Oktober 2012 bis September 2015 in der Gruppe von Assoc. Prof. Edzard Spillner am Fachbereich Chemie, Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg sowie dem Department of Engineering der University of Aarhus in Dänemark durchgeführt.

Gutachter der Dissertation: Assoc. Prof. Dr. Edzard Spillner
Prof. Dr. Peter Heisig

Gutachter der Disputation: Assoc. Prof. Dr. Edzard Spillner
Prof. Dr. Wolfgang Maison
Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 17.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Allergie	1
1.1.1 Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I.....	2
1.1.2 Hymenopterengiftallergie - Diagnostik und Therapie.....	9
1.1.3 Kreuzreaktive Karbohydrat Determinanten (CCDs).....	13
1.2 Antikörper.....	16
1.2.1 Immunglobulin E und die Fcε-Rezeptoren.....	20
1.3 Aufgabenstellung.....	23
2. Material.....	24
2.1 Enzyme und Standards:	24
2.2 Antikörper und Lektine	24
2.3 Chemikalien und Bioreagenzien	25
2.4 Chromatographie-Säulen	25
2.5 Bakterienstämme	25
2.6 Zelllinien und Zellkultur.....	25
2.7 Vektoren.....	26
2.8 Oligonukleotide	26
2.9 Puffer und Lösungen	26
2.10 Medien	32
2.11 Käuflich erworbene Kits.....	33
2.12 Verbrauchsmaterialien.....	33
2.13 Geräte	33
3. Methoden.....	36
3.1 Molekularbiologische Methoden	36

3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	36
3.1.2 Agarosegelelektrophorese	37
3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	38
3.1.4 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsenzymen.....	38
3.1.5 Dephosphorylieren von DNA-Fragmenten.....	39
3.1.6 Extraktion von DNA-Lösungen	39
3.1.7 Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren.....	39
3.1.8 DNA-Ligation	40
3.1.9 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	40
3.1.10 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	41
3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA	41
3.1.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	42
3.1.13 Sequenzierung.....	42
3.1.14 Klonierung von rekombinanter Bacmid-DNA	42
3.1.15 Isolierung von Bacmid-DNA	43
3.2 Zellbiologische Methoden.....	43
3.2.1 Kultivieren und Passagieren von Sf9-Zellen.....	43
3.2.2 Kultivieren und Passagieren von RBL-SX38-Zellen	44
3.2.3 Kultivieren und Passagieren von HEK-293-Zellen.....	44
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	44
3.2.5 Kryokonservierung und Revitalisierung von Sf9-Zellen	45
3.2.6 Expression von Proteinen in Sf9-Zellen	45
3.2.7. stabile Expression in HEK-293-Zellen	47
3.3 Proteinbiochemische Methoden	47
3.3.1 Affinitätschromatografie mittels <i>kappaSelect</i> -Matrix.....	47
3.3.2 Immobilized Metallion Affinity Chromatography (IMAC).....	48
3.3.3 Kationenaustauschchromatographie	48

3.3.4 Gelfiltration	49
3.3.5 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	49
3.3.6 Elektrophoretischer Proteintransfer (Western-Blot)	49
3.4 Proteinchemische Methoden	50
3.4.1 Biosensormessungen	50
3.4.2 Massenspektrometrische Analyse von Glykopeptiden	52
3.5 Immunologische Methoden	53
3.5.1 Enzyme-linked immunosorbent-Assay (ELISA).....	53
3.5.2 Glykananalyse mittels Lektin-ELISA	54
3.5.3 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von Antikörpern.....	54
3.5.4 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (<i>immunprinting</i>)	55
3.5.5 EUROLIne Assay	55
3.5.6 ImmunoCAP	56
3.5.7 <i>enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding</i> (ELIFAB)	56
3.5.8 Degranulationsassay mit humanisierten RBL-SX38-Zellen	57
3.6 Biophysikalische Methoden	58
3.6.1 <i>Small angle X-ray scattering</i> (SAXS)	58
4. Ergebnisse.....	62
4.1 Reaktivitätsanalyse von Seren humaner Hymenoptereingiftallergiker mit Komponenten aus den Giften von <i>Vespula vulgaris</i> und <i>Polistes dominula</i>	62
4.1.1 Expression von rekombinanten Hymenoptereingiftallergenen.....	62
4.1.2 Reaktivitätsanalyse von Seren humaner Hymenoptereingiftallergiker mittels EUROLIne Assay.....	71
4.2 Expression und Charakterisierung von humanem IgE	79
4.2.1 Interaktionsanalysen mit Antigenen und Rezeptoren	85
4.2.2 Analyse der Glykosylierung.....	89
4.2.3 Bestimmung der Affinität mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ...	93
4.2.4 Degranulationsassay mit humanisierten RBL-SX38-Zellen	94

4.2.5 <i>enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding</i> (ELIFAB)	96
4.3 Strukturelle Analyse des CCD-spezifischen humanen IgE mittels <i>small angle X-ray scattering</i> (SAXS).....	98
4.3.1 Probenvorbereitung des humanen IgE für die SAXS-Messung	98
4.3.2 <i>ab initio</i> Verfahren zur Strukturaufklärung des humanen IgE	100
5. Diskussion	105
5.1 Reaktivitätsanalyse von Seren humaner Hymenoptereingiftallergiker mit Komponenten aus den Giften von <i>Vespula vulgaris</i> und <i>Polistes dominula</i>	105
5.2 Expression und funktionelle Charakterisierung von humanem IgE	111
5.3 Strukturelle Analysen des CCD-spezifischen humanen IgE mittels <i>small angle X ray scattering</i> (SAXS).....	121
5.4 Ausblick.....	124
6. Zusammenfassung	127
7. Abstract	129
8. Literatur	131
Anhang	145
Originaldaten des EUROLine Assays	145
Sequenzdaten	148
Vektorkarten.....	152
Oligonukleotide	153
Sicherheit und Entsorgung	154
Liste der verwendeten KMR-Stoffe.....	159
Curriculum vitae	161
Publikationen.....	163
Kongressbeiträge	163
Danksagung	165
Eidesstattliche Versicherung	167

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAL	<i>Aleuria aurantia</i> Lektin
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonsäure)
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADCP	Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>)
α -Gal	Galaktose- α -1,3-Galaktose-Epitop
AID	<i>activation induced cytidine deaminase</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
Api m	<i>Apis mellifera</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Basophilenaktivierungstest (<i>basophil activation test</i>)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
Bromphenolblau	3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
CCD	kreuzreaktive Karbohydrat Determinante (<i>cross-reactive carbohydrate determinant</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	Komplement-abhängige Zytolyse (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
CDR	<i>complementarity determining regions</i>
C _H	konstante Domäne der schweren Kette
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>

C _L	konstante Domäne der leichten Kette
CSR	Klassenwechselrekombination (<i>class switch recombination</i>)
cPCR	<i>colony</i> -PCR
CXCL1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-Ethyl-N'-(Dimethylaminopropyl)-Carboimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELIFAB	<i>enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol
FAB	<i>facilitated antigen binding</i>
Fab	antigenbindendes Fragment (<i>fragment antigen binding</i>)
Fc	kristallisierbares Fragment (<i>fragment crystallisable</i>)
FKS	Fötale Kälberserum
Foxp3	<i>forkhead box protein P3</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Fuc	Fukose (<i>fucose</i>)
G	Guanin
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GATA-3	GATA-Transkriptionsfaktor 3
Gen	Gentamycinsulfat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)

Glc	Glukose (<i>glucose</i>)
GlcA	Glucuronsäure (<i>glucuronic acid</i>)
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin (<i>N</i> -Acetylglucosamine)
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> Lektin
h	Stunde(n)
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HILIC	<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSA	Humanes Serum Albumin
HVA	Hymenopterengiftallergie (<i>hymenoptera venom allergy</i>)
Hyl	Hydroxylysin
Hyp	Hydroxyprolin
IdoA	Iduronsäure (<i>iduronic acid</i>)
IFN	Interferon
IFT	Indirekte Fourier Transformation
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC2	<i>type 2 innate lymphoid cells</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAK	Janus Tyrosinkinase
Kan	Kanamycinsulfat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
Man	Mannose
MBP	Maltose-bindendes Protein (<i>maltose binding protein</i>)

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute
MPBS	Milchpulver-PBS
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Neu5Gc	<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure-Epitop
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NK	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
PFAII	<i>prophenoloxidase activating factor II</i>
pI	isoelektrischer Punkt
pNAG	poly- β -1,6- <i>N</i> -Acetyl-D-Glukosamin
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenyl Phosphat
Pol d	<i>Polistes dominula</i>
R	Rezeptor
r	recombinant
RAST	<i>radioallergosorbent assay</i>
rb	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
RBL	Rattenbasophile Leukämiezellen (<i>rat basophilic leukemia</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROR γ t	<i>Retionic acid-related orphan receptor γt</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
SA	Sialinsäure (<i>sialinic acid</i>)
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i>
scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

Ser	Serin
SIT	Spezifische Immuntherapie
SOB	<i>Super Optimal broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Strep	Streptomycin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T-bet	<i>T box expressed in T cells</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TE	Testexpression
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclinhydrochlorid
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H	T-Helferzelle
Thr	Threonin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TYK	Tyrosinkinase
u	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
Ves v	<i>Vespula vulgaris</i>

VIT	<i>venom immune therapy</i>
w/v	Massenprozent (<i>weight per volume</i>)
xg	Vielfaches der Gravitation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
x-Phos	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatriumsalz
Xyl	Xylose
z.B.	zum Beispiel
zeo	Zeoci

1. Einleitung

1.1 Allergie

Der Begriff Allergie (altgriechisch aus ἄλλος „fremd“ und τὸ ἔργον „die Reaktion“) wurde 1906 von dem österreichischen Kinderarzt Clemens Freiherr von Pirquet geprägt, um zwischen einer gesunden und einer für den Körper schädlichen Immunreaktion zu unterscheiden [1]. Heute versteht man unter Allergien überschießende adaptive Immunantworten auf ansonsten harmlose nicht pathogene Umweltantigene [2]. Diese allergieauslösenden Antigene werden als Allergene bezeichnet und sind in der Regel Proteine, Glykoproteine oder Peptide, welche u.a. aus Gräser- und Baumpollen, Lebensmitteln, Tierepithelien oder Insektengiften stammen können, wobei auch einige Medikamente allergische Reaktionen auslösen können [3]. Etwa 25% der Bevölkerung der entwickelten Welt sind von allergischen Reaktionen, wie Anaphylaxie, Ekzemen, Asthma und Heuschnupfen, betroffen [2, 4]. Schätzungsweise leiden bis zu einer Milliarde Menschen weltweit an allergischen Erkrankungen, wobei die Prävalenz seit den 1960er Jahren kontinuierlich angestiegen ist [5]. Neben dem hohen Leidensdruck der Patienten stellen auch die steigenden Gesundheitskosten ein immenses volkswirtschaftliches Problem dar, weshalb der Bedarf an kurativen bzw. präventiven Behandlungsmöglichkeiten unverändert hoch ist [5, 6].

Zum besseren Verständnis der allergischen Reaktion schlugen Gell und Coombs 1963 eine Klassifizierung anhand der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen vor, welche bis heute weitestgehend akzeptiert und angewendet wird [7]. Hierbei werden vier Klassen von Hypersensitivitätsreaktionen unterschieden. Die Typ I Reaktion ist die klassische IgE vermittelte Sofort-Typ Form der Allergie, welche Heuschnupfen, allergisches Asthma und allergische Reaktionen auf Insektenstiche einschließt und in vielen Fällen mit dem Begriff Allergie gleichgesetzt wird [7, 8]. Sie ist charakterisiert durch die Freisetzung verschiedener vorgeformter Entzündungsmediatoren, wie Histamin, durch die Degranulation u.a. von Mastzellen, welche wiederum durch die Kreuzvernetzung des hochaffinen $Fc\epsilon$ Rezeptors I ($Fc\epsilon RI$) durch antigenspezifisches IgE ausgelöst wird [9].

Typ II Reaktionen werden durch zytotoxische Antikörper, hauptsächlich vom IgG oder IgM Isotyp, verursacht [7]. Eine Schädigung der Zellen wird zum einen durch den direkten Angriff von Makrophagen, Neutrophilen oder Eosinophilen auf Zielzellen, welche über den Fc-Rezeptor Antikörper gebunden haben, hervorgerufen. Zum anderen kann auch

antikörpervermittelt der klassische Weg des Komplementsystems aktiviert werden, was die Lyse der Zielzelle zur Folge hat [8].

Typ III Reaktionen sind durch Gewebeschäden gekennzeichnet, die durch die Bildung von Immunkomplexen bewirkt werden. Potentiell präzipitierende Antikörper (hauptsächlich IgM) reagieren mit ihrem Antigen und bilden so Mikropräzipitate in und um kleine Gefäße, wodurch sekundäre Gewebeschäden ausgelöst werden. Bei Antigenüberschuss werden lösliche Immunkomplexe gebildet, welche sich im Endothel von Blutgefäßen ablagern und durch Auslösung des Komplementsystems zu lokalen Entzündungen vor allem in den Lungen, Gelenken, Nieren und der Haut führen. Die Rekrutierung von Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophilen an den Ort der Entzündung trägt zur Verstärkung der Reaktion bei [8]. Da die Symptome typischerweise erst nach Tagen auftreten, ist die Typ III Allergie auch als verzögerte Reaktion bekannt.

Typ IV Allergien sind zellvermittelte ebenfalls verzögerte Reaktionen [7], die im Gegensatz zu den anderen Typen keine Antikörper involvieren. Diese Reaktion wird durch T-Lymphozyten ausgelöst, denen von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) das Allergen präsentiert wird. Typ IV Allergien manifestieren sich hauptsächlich in Reaktionen der Haut wie Kontakt- oder chronische Dermatitis und werden durch den häufigen Hautkontakt mit Kosmetika oder Chemikalien ausgelöst [8, 10].

1.1.1 Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I

Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ I sind gekennzeichnet durch die Beteiligung von allergenspezifischen Antikörpern vom Isotyp E und werden aufgrund ihrer relativen Häufigkeit und Relevanz häufig synonym für Allergien im Allgemeinen verstanden. Allergische Reaktionen treten gehäuft in atopischen Individuen auf, wobei auch nicht atopische Patienten Allergien entwickeln können. Der Begriff Atopie leitet sich aus dem griechischen Wort *ατοπία* für „Ortlosigkeit“ ab und beschreibt die zum Teil erbliche Tendenz von Individuen auf geringe Mengen harmloser Umweltantigene mit IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen zu reagieren [11]. Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Allergie: genetische Prädisposition, diverse Umweltfaktoren, Art, Konzentration und Expositionsweg des Allergens sowie das Vorhandensein von Adjuvantien, welche die Sensibilisierung verstärken können, wie z.B. bestimmte Liganden der Toll-like-Rezeptoren [12]. Allergische Reaktionen sind divers in Bezug auf die auslösenden Allergene sowie die Symptome, die sie hervorrufen. Es lässt sich daher nicht vorhersagen, welche Substanzen als Allergen fungieren können, bzw. ob ein Individuum eine Allergie entwickelt.

Die Immunreaktion des Wirts auf verschiedene Pathogene wird gewährleistet durch die Differenzierung von CD4⁺ (*cluster of differentiation*) T-Zellen in verschiedene Effektor-T-Zelllinien, welche sich in ihrer Funktion und den jeweiligen Zytokinprofilen unterscheiden [13].

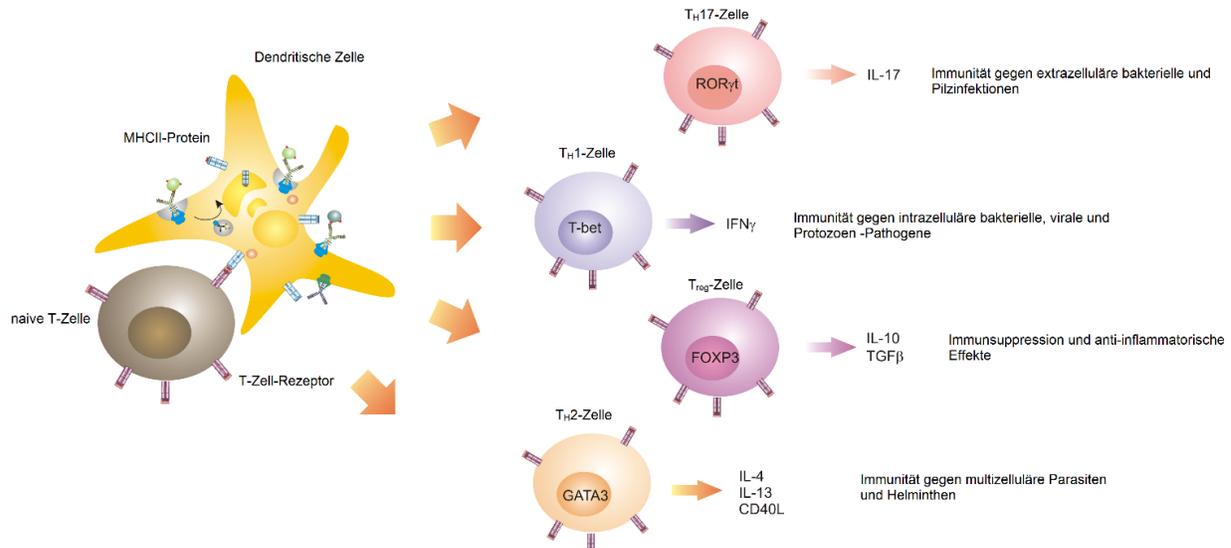


Abb. 1 T-Zell Differenzierung.

Schematische Darstellung der wichtigsten Möglichkeiten zur Differenzierung von naiven T-Helferzellen und die immunologischen Aufgaben der Zelltypen.

T_H1-Zellen (Typ 1 T-Helferzellen) werden durch den Transkriptionsfaktor T-bet (*T box expressed in T cells*) kontrolliert und schützen das humane System gegen Infektionen mit intrazellulären Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren oder Protozoen [14, 15]. T-bet induziert die Bildung von Interferon γ (IFN_γ) und unterdrückt gleichzeitig die Expression der Interleukine (IL) IL-4 und IL-5 [14]. T_H17-Zellen tragen ihren Namen aufgrund der Expression von IL-17 und werden durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t (*Retionic acid-related orphan receptor γ t*) charakterisiert. Sie vermitteln Immunität gegen extrazelluläre bakterielle und fungale Infektionen. Immunantworten gegen multizelluläre Parasiten wie Helminthen werden durch T_H2-Zellen vermittelt, welche hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 (GATA Transkriptionsfaktor 3) reguliert werden. Dies fördert wiederum die Expression von IL-4, IL-5 und IL-13 [13]. Ein weiterer CD4⁺ T-Zelltyp sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), welche eine wichtige Rolle bei der Selbsttoleranz und Immunhomöostase spielen. Unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead box protein P3*) werden die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β (*transforming growth factor β*) exprimiert und sekretiert [16, 17]. Diese in Abbildung 1 dargestellten Mechanismen bilden ein empfindliches Gleichgewicht und eine fehlerhafte Aktivierung eines dieser vier T-Zelltypen der adaptiven Immunantwort kann zu

Einleitung

verschiedenen Erkrankungen wie Autoimmunität im Fall von T_H1 - und T_H17 -Antworten und Allergien im Fall von T_H2 -Antworten führen [13, 18, 19].

Die allergische Reaktion kann in zwei zeitlich getrennte Abschnitte unterteilt werden: zunächst erfolgt durch Kontakt mit dem Allergen die symptomfreie Sensibilisierungsphase. Bei erneutem Allergenkontakt kommt es in der Effektorphase zur Induktion der eigentlichen allergischen Reaktion und Symptomatik [2].

Die Typ I Hypersensitivitätsreaktion verläuft analog zu Immunreaktionen auf Infektionen mit extrazellulären Parasiten und wird durch ein T_H2 -mediierendes Zytokinmilieu gefördert [20]. Ausschlaggebend für eine Sensibilisierung ist also die Fähigkeit des Allergens eine T_H2 -basierte Immunantwort hervorzurufen, die vermittelt durch IL-4 und IL-13 zum Klassenwechsel von B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen führt [21]. Zunächst wird das Allergen am Eintrittsort in den Körper von APCs, hauptsächlich dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und prozessiert. Die aktivierten DCs migrieren anschließend in die regionalen Lymphknoten oder lokale Mukosa, wo sie Peptide des prozessierten Allergens über Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (*major histocompatibility complex*, MHCII) naiven T-Zellen präsentieren [22]. Die Differenzierung der naiven T-Zellen ist vor allem abhängig von dem vorherrschenden Zytokinmilieu. Der Ursprung des T_H2 -Milieus im Falle einer Allergie ist nicht vollständig geklärt, jedoch können Epithelzellen der Atemwege oder Haut durch Allergenkontakt, mechanischen Stress oder virale Infektionen dazu angeregt werden die Epithelzytokine IL-25, IL-33 und TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) zu sekretieren [19, 23]. TSLP stimuliert eine Reihe von Zelltypen, wie Monozyten, DCs, B- und T-Zellen [24]. TSLP-aktivierte DCs fördern bei T_H -Zellen die Expression von IL-4, IL-5, IL-13 und TNF α (Tumornekrosefaktor α), während gleichzeitig die Expression von IL-10 und Interferon γ runterreguliert wird [25]. Dies führt zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer T_H2 -Reaktion. IL-25 kann aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu IL-17 an den IL-17Rb (IL-17 Rezeptor b) auf naiven T-Zellen binden, was allerdings in der Expression eines komplett verschiedenen Zytokinmilieus resultiert. Während IL-17 die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1 β , IL-6, CXCL1 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) und TNF α fördert, induziert die Bindung von IL-25 nur in geringem Maße die Bildung von IL-6, sondern vielmehr die Expression von IL-4, IL-5 und IL-13. Dies begünstigt wiederum eine Differenzierung naiver T_H -Zellen zu T_H2 -Zellen [26]. IL-25 und IL-33 aktivieren außerdem undifferenzierte lymphoid-ähnliche Zellpopulationen, wie Nuozyten, natürliche Helferzellen und ILC2-Zellen (*type 2 innate lymphoid cells*) [27, 28]. Diese sekretieren große Mengen der proinflammatorischen Zytokine IL-5, IL-9 und IL-13, welche die Differenzierung, das Überleben

und die Proliferation von T_H2 -Zellen fördern [23, 28, 29]. IL-33 wird in Zelltypen des gesamten vaskulären Systems exprimiert, wie z.B. Epithelzellen, Fibroblasten, in lymphatischem Gewebe und sogar von Zellen des Gehirngewebes, wo es im Zellkern gespeichert vorliegt [30]. Durch eine Zellschädigung oder Allergenkontakt wird es sofort freigesetzt und im extrazellulären Raum von einer Reihe Enzyme prozessiert, welche von rekrutierten Neutrophilen sekretiert werden; dies bewirkt eine Verstärkung der Aktivität von IL-33 [31, 32]. IL-33 induziert die Expression von IL-5 und IL-13 in Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Mastzellen und basophilen Granulozyten [31, 32].

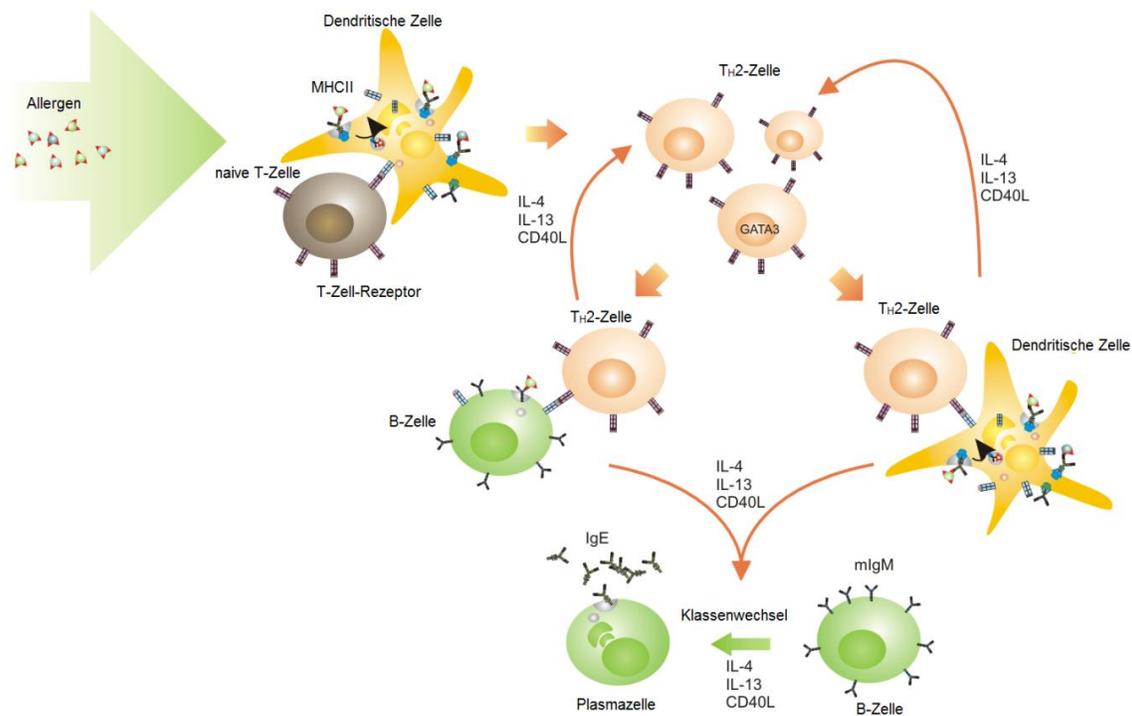


Abb. 2 Mechanismus von Sensibilisierung und B-Zell Klassenwechsel.

Schematische Darstellung des Mechanismus, der zur Sensibilisierung eines Individuums durch ein aufgenommenes Allergen und zum Klassenwechsel von B-Zellen zu IgE-sekretierenden Plasmazellen führt.

Neben dem Zytokinmilieu spielt auch die Signalstärke des T-Zell-Rezeptors (*T-cell receptor*, TCR) eine Rolle für die Differenzierung von naiven T-Zellen. Durch simultane Bindung der Co-Rezeptoren kann der TCR Peptide, welche durch MHC-Moleküle von APCs präsentiert werden, hochspezifisch erkennen. Als Co-Rezeptoren fungieren CD8 für cytotoxische T-Zellen, welcher MHCI-Peptid-Komplexe bindet und CD4 für T_H -Zellen, welcher ausschließlich MHCII/Peptid-Komplexe erkennt. Die Bindung eines spezifischen MHC/Peptid-Komplexes bewirkt eine Signaltransduktion in die Zelle und somit deren Aktivierung. Generell begünstigen schwache Signale die Differenzierung zu T_H2 -Zellen, während starke Signale eher die

Einleitung

Differenzierung zu T_H1 -Zellen fördern [33]. Schwach stimulierte $CD4^+$ T-Zellen induzieren rasch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 in einer IL-4/STAT6 (*signal transducer and activator of transcription*) unabhängigen Weise und produzieren IL-2, welches wiederum STAT5 aktiviert [34, 35]. Gemeinsam induzieren GATA-3 und STAT5 die Expression von „frühem IL-4“, welches bereits in den ersten 24 Stunden nach Aktivierung produziert wird. Dieses frühe IL-4 bindet an den IL-4-Rezeptor (IL-4R) schwach stimulierter T_H -Zellen und reguliert so die Expression von GATA-3, was in einer positiven Rückkopplung auch die GATA-3/STAT5-abhängige IL-4 Expression weiter vorantreibt und so zur vollständigen T_H2 -Differenzierung führt [34, 35].

Die ausdifferenzierten aktivierten T_H2 -Zellen sekretieren u.a. IL-4, IL-13, IL-5 und IL-9. Für den Klassenwechsel der B-Zelle zur IgE-sekretierenden Plasmazelle sind besonders die Zytokine IL-4 und IL-13 von Bedeutung, da sie sehr wirksam die $C\epsilon$ -Transkription in B-Zellen induzieren [36, 37]. Durch Bindung von IL-4 an den IL-4R werden JAK1 (Janus Tyrosinkinase 1), JAK3, IRS1 (Insulin Rezeptor Substrat 1) und TYK1 (Tyrosinkinase 1) aktiviert; durch die Bindung von IL-13 an den IL-13R wiederum werden JAK1 und TYK2 aktiviert. Die aktivierten JAKs phosphorylieren Tyrosinreste der intrazellulären Domänen des IL-4R, welche als STAT6 Bindungsstelle fungieren. Nachdem STAT6 ebenfalls phosphoryliert wurde, dimerisiert es und wandert in den Zellkern, wo es die Transkription des $C\epsilon$ -Promotors aktiviert [36].

Neben den Zytokinen spielen auch Oberflächenrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Regulation des B-Zell-Klassenwechsels. Bei aktivierten T_H2 -Zellen wird der Oberflächenrezeptor CD40L (CD40-Ligand), welcher mit CD40 auf B-Zellen interagiert, hochreguliert [38, 39]. Die Interaktion von CD40L und CD40 hat die Hochregulation der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 der B-Zelle zur Folge, was wiederum zu einer erhöhten CD40L-Expression in T-Zellen führt und so eine effizientere B-Zell-Stimulation bewirkt. Außerdem trägt die CD40-vermittelte B-Zell-Stimulation zur Verstärkung der IL-4R-Signal-induzierten Transkription der $C\epsilon$ -Keimbahngene bei [36, 40]. Nachdem zusätzlich AID (*activation induced cytidine deaminase*) spezifisch die Hydrolyse von Cytidin- zu Uridinresten katalysiert hat, kommt es durch die darauf folgenden Reparaturmechanismen der Zelle zu einer Umlagerung des $C\epsilon$ -Genlokus, so dass die B-Zelle folglich Antikörper vom IgE-Isotyp sekretiert [38].

Die Klassenwechselrekombination (*class-switch recombination*, CSR) verläuft für alle Isotypen, deren DNA stromaufwärts des $C\mu$ -Lokus kodiert werden, analog und ist irreversibel. Der generelle Aufbau des $C\epsilon$ -Lokus ist homolog zu dem anderer C_H -Gene. Diese enthalten alle, bis auf $C\delta$, in der 5' intronischen Sequenz eine Switch Region (S) - $S\epsilon$ im Falle von IgE.

Diese unterliegt der Rekombination und bildet mit der $S\mu$ -Region während des CSR die Hybrid-DNA. $S\epsilon$ wird stromabwärts der $V_H(D)J_H$ -Region und stromaufwärts von $C\epsilon$ ausgeschnitten und die darauf folgende Verknüpfung der $V_H(D)J_H$ - und $C\epsilon$ -Sequenzen ergibt das funktionelle IgE-Gen [36].

Die Sensibilisierungsphase, welche zum B-Zell-Klassenwechsel führt, verläuft in der Regel symptomfrei. Erst bei erneutem Allergenkontakt treten die typischen Symptome einer allergischen Reaktion, wie Ekzeme, Heuschnupfen, Magen-Darm-Beschwerden, Asthma und lebensbedrohliche anaphylaktische Reaktionen auf. In sensibilisierten Individuen liegen allergenspezifische IgE-Antikörper über den hochaffinen $Fc\epsilon RI$ gebunden auf Mastzellen und Basophilen vor. Mastzellen kommen in allen durchbluteten Geweben von Vertebraten vor, allerdings stark konzentriert an den Körperoberflächen, wie der Haut oder den Schleimhäuten der Atemwege und des Darms, wo es besonders häufig zu Kontakt mit Umweltsubstanzen kommt [9]. Basophile ähneln den Mastzellen und stellen die kleinste Granulozyten-Population dar, spielen allerdings eine bedeutende Rolle in einer Reihe von Erkrankungen wie auch der allergischen Inflammation [41-43]. Die wichtigsten inflammatorischen Mediatoren der Basophilen sind Histamin und Leukotrien 4, wobei sich die Basophilen gegenüber Mastzellen besonders durch die Sekretion von Zytokinen im Besonderen von IL-4 und IL-13 auszeichnen [41]. Dadurch verstärkt die Aktivierung von Basophilen die Ausprägung eines T_H2 -Milieus. Bei Allergenkontakt kommt es zur Kreuzvernetzung der rezeptorgebundenen IgE-Antikörper, was die Aktivierung der Basophilen und Mastzellen zur Folge hat, welche daraufhin diverse Entzündungsmediatoren sekretieren, die Gewebeschäden und damit die allergischen Symptome auslösen (vgl. Abb. 3) [44]. Außerdem steigert die IgE-vermittelte Kreuzvernetzung die Expression des $Fc\epsilon RI$, was eine zusätzliche Verstärkung des Mechanismus zur Folge hat [34, 45]. Die Mastzellmediatoren umfassen vorgeformte und neu synthetisierte Mediatoren, Zytokine und Chemokine sowie Wachstumsfaktoren, wobei es sich hierbei nicht um exklusive Gruppen handelt, sondern lediglich die Einteilung erleichtern soll. Vorgeformte Mediatoren beinhalten u.a. das kleine biogene Amin Histamin, Serinproteasen, Carboxypeptidase A und Proteoglycane, welche in cytoplasmatischen Granula gespeichert vorliegen und bei Mastzellaktivierung mit der Zellmembran verschmelzen, sodass ihr Inhalt sofort ausgeschüttet werden kann. Die Freisetzung der vorgeformten Mediatoren, Lipidmediatoren und Plättchenaktivierendem Faktor führen zur sogenannten Sofort-Typ Reaktion, welche Sekunden bis Minuten nach Aufnahme des Allergens einsetzt [9, 44]. Die Symptome unterscheiden sich je nach Lokation der Reaktion und beinhalten Vasodilatation als Auswirkung der Mediatoren auf lokale Nerven, was zu Hautrötungen führt, Kontraktionen der

Einleitung

glatten Muskulatur der Bronchien, was Atembeschwerden zur Folge hat und erhöhte Mukusbildung [9, 40]. Stimulation von Nozisenoren führt darüber hinaus häufig zu Niesen, Husten und Jucken. Die Auslösung einer nicht örtlich begrenzten Aktivierung von Mastzellen und Basophilen führt zur rapiden systemischen Freisetzung von Mediatoren und somit zum anaphylaktischen Schock [44].

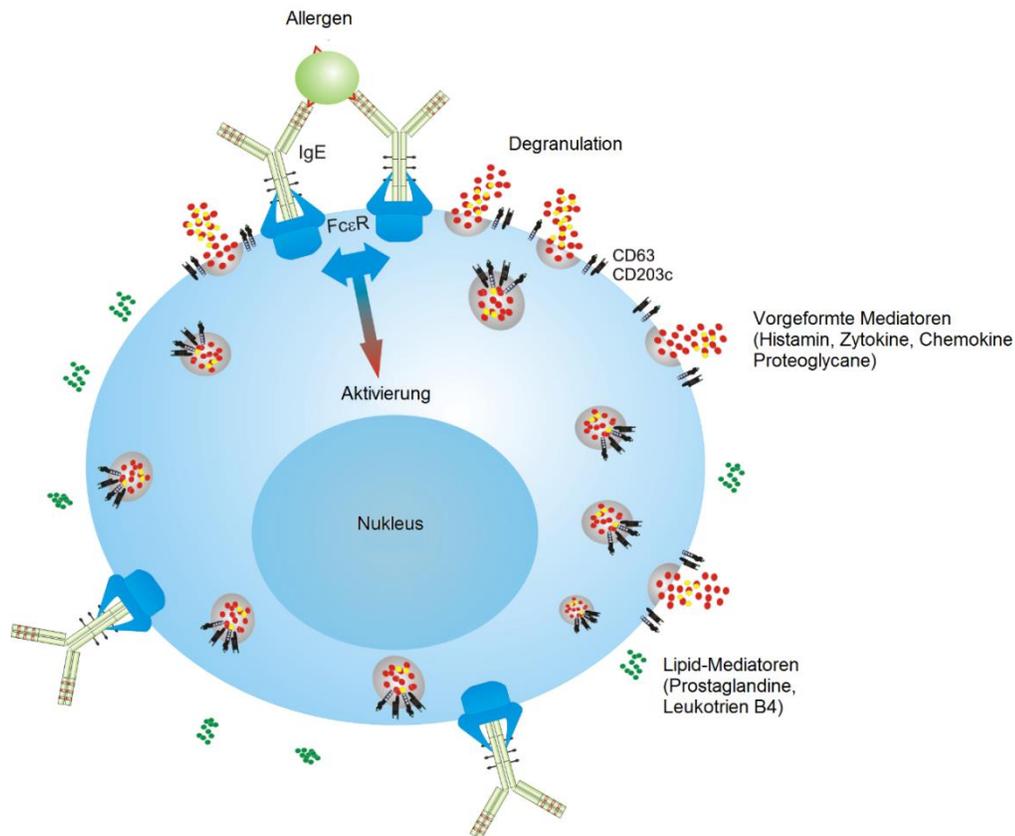


Abb. 3 Mastzellaktivierung.

Schematische Darstellung der Kreuzvernetzung des FcεRI auf Mastzellen durch ein Allergen und die folgende Mastzellaktivierung, die zur Freisetzung der biologisch aktiven Mediatoren führt. Diese Mediatoren lösen die Symptome aus, welche Sofort-Typ-Reaktionen charakterisieren.

Etwa 12 bis 48 Stunden nach Allergenkontakt kann es zur Spät-Typ-Reaktion kommen, die durch die Freisetzung von neusynthetisierten Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren durch Mastzellen eingeleitet wird. Einige dieser Mediatoren rekrutieren weitere Immunzellen, wie Eosinophile, Basophile und Monozyten oder aktivierten T-Zellen, DCs, und B-Zellen, was eine umfangreiche Immunreaktion und somit ausgeprägte Gewebeschäden zur Folge hat [2, 46]. Außerdem werden neben Zellen des Immunsystems auch vaskuläre Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten oder Zellen der glatten Muskulatur direkt durch einige Mastzellmediatoren, wie Tryptasen, beeinflusst [47, 48]. Es wird angenommen, dass die Spät-

Typ-Reaktion zum einen Teil durch langfristige Auswirkungen der Mastzellmediatorfreisetzung während der Sofort-Typ-Reaktion und zum anderen Teil durch allergenstimulierte T-Zellen koordiniert wird. T-Zellen, welche spezifisch für Peptide des Allergens sind und an die Stelle des Allergenkontakts rekrutiert werden, sekretieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-25 und IL-17 und fördern damit die Entzündungsreaktion [49].

1.1.2 Hymenopterengiftallergie - Diagnostik und Therapie

Die Hymenopterengiftallergie (*hymenoptera venom allergy*, HVA) ist definiert als eine systemische allergische oder anaphylaktische Reaktion auf das Gift der Insektenordnung Hymenoptera. Sie tritt in Nordeuropa meist nach Stichen von gemeinen Wespen (*Vespula vulgaris*) und Honigbienen (*Apis mellifera*) auf; seltener sind Hornissen (*Vespa crabro*) oder Hummeln (Gattung *Bombus*) der Auslöser [50]. In Südeuropa treten zudem häufig Allergien gegen das Gift der Feldwespe (*Polistes dominula*) auf, während in den USA auch Allergien auf das Gift anderer *Polistes* Spezies sowie Ameisen (Gattung *Solenopsis*) vermehrt auftreten.

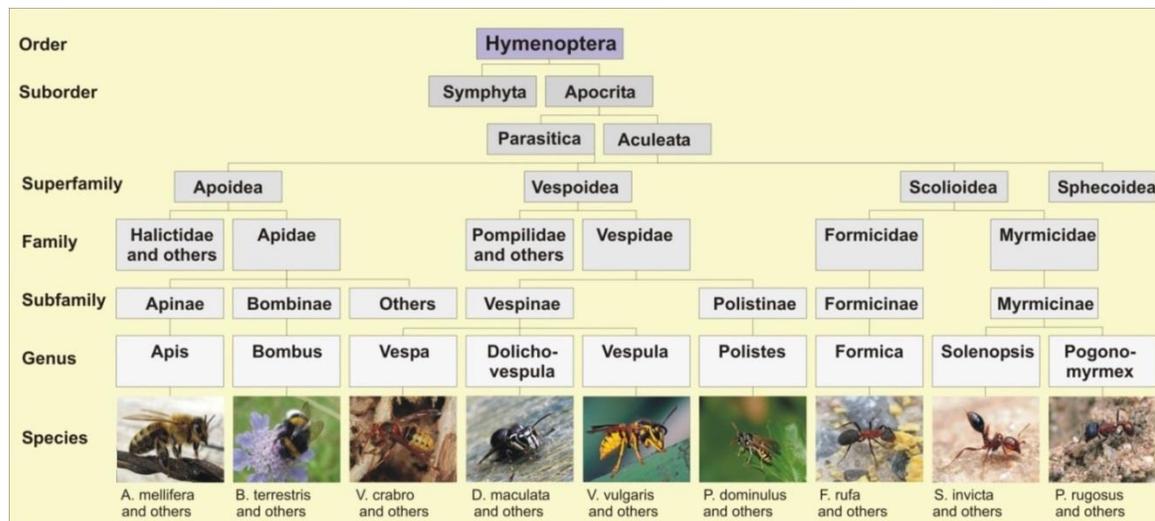


Abb. 4 Taxonomie der Ordnung der Hymenopteren.

Die wichtigsten Allergie-verursachenden Spezies der Hymenopteren entstammen der Unterordnung *Aculeata*. In Europa sind vor allem die Honigbiene *Apis mellifera*, die Wespe (*Vespula vulgaris*) und die Feldwespe (*Polistes dominula*) von Bedeutung.

Die Prävalenz von Sensibilisierungen gegen Hymenopterengifte beträgt etwa 25% in der gesamten Bevölkerung, wobei die meisten dieser Individuen entweder gar keine oder nur milde bis moderate Symptome aufzeigen, wie Hautreaktionen (Rötungen, Urtikaria, Angioödem) oder milde pulmonale, kardiovaskuläre und/oder gastrointestinale Symptome [51, 52]. Allerdings zeigen auch 0.4-3% der Bevölkerung systemische Reaktionen, welche in

Einleitung

einem anaphylaktischen Schock mit Atemnot, Bewusstseinsverlust und letztlich einem Herzstillstand resultieren können [53].

Anaphylaxie involviert die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen und wird in den meisten Fällen IgE-mediiert durch Insektengifte, Lebensmittel, Latex oder verschiedene Medikamente wie β -Laktam Antibiotika ausgelöst [54]. Neben dem IgE-vermittelten Aktivierungsweg sind außerdem weitere Mechanismen bekannt. In diesen führen die Komplement-Anaphylatoxin-Aktivierung (C5a, C3a), Neuropeptid Freisetzung (*substance P*), zytotoxische Mechanismen, IgG- und IgM-Immunkomplexe oder T-Zellen zu einer ausreichenden Aktivierung von Mastzellen und Basophilen, um eine anaphylaktische Reaktion auszulösen. Außerdem kann eine Anaphylaxie auch nicht-immunologisch, z.B. durch die direkte Mastzellaktivierung durch Insektengiftbestandteile, ausgelöst werden [54]. Dies ist in Einklang mit dem Befund, dass spezifische IgE-Titer nicht immer mit dem Ausmaß der allergischen Reaktion korrelieren. So zeigen einige Individuen mit messbarem spezifischen IgE gegen Insektengift oder bestimmte Lebensmittel keine klinisch relevante Reaktion darauf [52], wogegen einzelne Fälle von anaphylaktischen Reaktionen bekannt sind, obwohl keine Allergen-spezifischen IgE nachgewiesen werden konnten [55].

Die Diagnose einer HVA wird routinemäßig anhand der klinischen Historie und Ermittlung der IgE-vermittelten Sensibilisierung über Hauttests (*skin prick* oder intradermal) und/oder *in vitro* Messung von giftspezifischen IgE erstellt [50]. Zusätzlich können zelluläre Tests, wie der Basophilen Aktivierungstest (BAT) oder ein Histaminfreisetzungstest (*histamine release test*) Aufschluss über das sensibilisierende Gift geben, wenn die o.g. Routine-Untersuchungen kein eindeutiges Ergebnis liefern [50, 56, 57]. Nach erfolgreicher Diagnose ist die bis heute einzige kurative Behandlung einer HVA die VIT (*venom immunotherapy*), wobei im Abstand von Tagen oder Wochen steigende Dosen des jeweiligen Giftes subkutan, in der Regel über einen Zeitraum von zwei bis zu mehr als fünf Jahren verabreicht werden [58]. Der Erfolg dieser Therapie in Bezug auf eine vollständige zukünftige Protektion vor anaphylaktischen Reaktionen auf Stiche der betreffenden Insektenart beträgt 80-84% für Honigbienen und 90-95% für Wespen [59]. Sowohl in der Diagnostik als auch für die Therapie der HVA werden in der Regel Extrakte des Gesamtgiftes benutzt. Hymenopterengifte bestehen jedoch aus einer komplexen Mischung von niedermolekularen Substanzen, (Glyko-)Proteinen und Peptiden mit häufig enzymatischen Eigenschaften [60]. Die zyto- und neurotoxischen Eigenschaften des Giftes werden hauptsächlich durch Peptidasen und Phospholipasen vermittelt, während Hyaluronidasen und biogene Amine für die Ausbreitung des Giftes an der Einstichstelle verantwortlich sind. Tabelle 1 zeigt die bislang bekannten Allergene aus dem Gift von

Honigbiene, Wespe und Feldwespe. Hieraus geht hervor, dass das Gift der Biene deutlich komplexer zusammengesetzt ist als die Gifte der Vespidae.

Tab. 1 Liste der bis dato bekannten Allergene ausgewählter Hymenopterengifte.

Allergen	Bezeichnung / Funktion	Molgewicht [kDa]	Anzahl der möglichen N-Glykosylierungsstellen
<i>Apis mellifera</i>			
Api m 1	Phospholipase A2	17	1
Api m 2	Hyaluronidase	45	2
Api m 3	Saure Phosphatase	49	2-3
Api m 4	Melittin	3	-
Api m 5	Dipeptidylpeptidase IV	100	5-6
Api m 6	Protease Inhibitor	8	-
Api m 7	CUB Protease	39	2-4
Api m 8	Carboxyesterase	70	4
Api m 9	Carboxypeptidase	60	4-5
Api m 10	Icarapin	55	3
Api m 11	Major Royal Jelly Protein 8/9	45	2
Api m 12	Vitellogenin	200	2
<i>Vespula vulgaris</i>			
Ves v 1	Phospholipase A1	35	-
Ves v 2	Hyaluronidase	45	2-3
Ves v 3	Dipeptidylpeptidase IV	100	3-6
Ves v 5	Antigen 5	25	-
Ves v 6	Vitellogenin	200	1
<i>Polistes dominula</i>			
Pol d 1	Phospholipase A1	35	-
Pol d 4	Serinprotease	31	3-6
Pol d 5	Antigen 5	25	-

Die Majorallergene aus dem Bienengift umfassen die Phospholipase A2 (Api m 1), die Hyaluronidase (Api m 2), die saure Phosphatase (Api m 3), die Dipeptidylpeptidase IV (Api m 5) und Icarapin (Api m 10) [61]. Im Wespengift sind die Phospholipase A1 (Ves v 1), die Hyaluronidase (Ves v 2) und das Antigen 5 (Ves v 5) die entscheidenden Majorallergene [60]. Das Gift von *Polistes dominula* ist bislang weniger gut untersucht als das von Biene und Wespe, jedoch werden analog zum Wespengift die Phospholipase A1 (Pol d 1) und das Antigen 5 (Pol d 5) als Majorallergene betrachtet [62].

Die HVA-Diagnostik wird in vielen Fällen durch das Auftreten von mehrfach positiven Testergebnissen erschwert. Dies macht es vor einer möglichen Therapie notwendig, zwischen einer genuinen Sensibilisierung gegen mehrere Gifte und einem durch Kreuzreaktivität

Einleitung

hervorgerufenen falsch-positiven Ergebnis zu unterscheiden. Eine VIT mit Giften, gegen die keine Sensibilisierung vorliegt, verursacht nicht nur unnötige Kosten sondern kann auch zu einer *de novo* Sensibilisierung des Patienten führen [56]. Die Kreuzreaktivität hat ihren Ursprung in spezifischen IgE-Antikörpern, die Epitope erkennen, welche auf Allergenen in verschiedenen Giften vorliegen. Dies können Proteinepitope auf homologen Allergenen wie den Hyaluronidasen Api m 2 und Ves v 2 oder den Antigenen 5 Ves v 5 und Pol d 5 sein. In den meisten Fällen werden diese jedoch durch kreuzreaktive Karbohydrat Epitope (*cross-reactive carbohydrate determinants*, CCD), die auf Glykoproteinen des Bienen- und Wespengifts nicht jedoch im Gift von *Polistes* Spezies gefunden werden können, hervorgerufen [63]. Diese klinisch irrelevante Kreuzreaktivität wurde bislang hauptsächlich im Zusammenhang mit der Differenzierung zwischen Wespen- und Bienengiftallergie adressiert. Bei etwa der Hälfte der Bienen- und Wespenallergiker kommt es zu doppelt positiven Testergebnissen [64] und die Forschung auf dem Gebiet der komponentenaufgelösten Diagnostik ist in den letzten Jahren weit vorangeschritten. Werden anstelle der Giftextrakte rekombinante CCD-freie Allergene für die *in-vitro* Diagnostik eingesetzt, kann anhand der Reaktivitäten mit den Einzelkomponenten meistens zuverlässig entschieden werden, welches die allergieauslösende Spezies ist [61, 62, 65]. Hierfür werden speziesspezifische Markerallergene eingesetzt, welche keine kreuzreaktiven Homologe in dem Gift der jeweils anderen Spezies haben und so die eine genaue Identifizierung des allergieauslösenden Insekts zulassen. Durch Einsatz der kommerziell erhältlichen rekombinanten Allergene rVes v 5 und rApi m 1 können bereits etwa 90% der Wespengiftallergiker [66, 67] bzw. 72-79% der Bienengiftallergiker [61, 66, 68] diagnostiziert werden. In den Fällen, in denen keine Sensibilisierung gegen diese Allergene vorliegt, wird ein größeres Set von rekombinanten Allergenen benötigt, welches die Diagnose möglichst aller Hymenoptereingiftallergiker ermöglicht. Für die Wespe können durch Nutzung von rVes v 1 und rVes v 5 bereits 92-96% der Wespenallergiker diagnostiziert werden [69], für ein entsprechendes Ergebnis von 94% ist in der Bienenallergiediagnostik der Einsatz eines deutlich größeren Sets notwendig, welches rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, Api m 4, rApi m 5 und rApi m 10 einschließt [61, 70]. Ein analoges System zur Unterscheidung zwischen Wespen- und Feldwespengiftallergie gibt es bislang aufgrund des schlechteren Kenntnisstands bezüglich des Feldwespengifts noch nicht, obwohl *Polistes dominula* im mediterranen Raum häufige Auslöser für Allergien ist und als invasive Spezies zunehmend auch das nördlichere Europa und die USA besiedelt [71]. Die hohe Sequenzhomologie der Antigene 5 und der Phospholipasen A1 zu denen der *Vespula* Spezies macht eine einfache Zuordnung der allergieauslösenden Spezies unmöglich und eine

sorgfältige Auswertung von diagnostische Tests notwendig [62]. Die Homologie der entsprechenden Allergene in den unterschiedlichen europäischen (wie *Polistes dominula*, *Polistes gallicus*) und nordamerikanischen Feldwespenspezies (wie *Polistes annularis*, *Polistes exclamans*) ist nicht besonders hoch und ihre unterschiedliche geographische Verteilung lässt eine zuverlässige Abgrenzung zu den europäischen Spezies zu [62, 71].

1.1.3 Kreuzreaktive Karbohydrat Determinanten (CCDs)

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine der häufigsten und die komplexeste posttranslationale Modifikation und kann über den gesamten phylogenetischen Stammbaum von Archaeen über Bakterien bis hin zu Eukaryoten gefunden werden [72]. Eine Vielzahl von Oligosaccharid-Bausteinen und Verknüpfungen sind bekannt und die Glykosylierungsmuster von Proteinen sind so divers wie die Funktionen, die sie beeinflussen. Die Proteinglykosylierung spielt eine entscheidende strukturelle Rolle und beeinflusst die molekulare Interaktion in einer Vielzahl von Prozessen [73]. Man unterscheidet je nachdem, ob das Glykan über eine *O*- oder *N*-glykosidische Verbindung mit der Aminosäure verknüpft ist zwischen *O*- und *N*-Glykanen. *N*-Glykane werden kovalent über das Stickstoffatom der freien Säureamidgruppe der Seitenkette von Asparagin (Asn) verknüpft, während *O*-Glykane über das Sauerstoffatom der Seitenkettenhydroxylgruppen von Serin (Ser), Threonin (Thr), Hydroxylprolin (Hyp) oder Hydroxyllysin (Hyl) gebunden werden können [74]. Außerdem kann die C2-Position von Tryptophan (Trp) über eine C-C-Verknüpfung mit einer α -Mannose verknüpft werden (C-Mannosylierung) [75].

Im Gegensatz zu allen anderen Glykosylierungen werden die eukaryotischen Asn-verknüpften *N*-Glykane im endoplasmatischen Retikulum als 14 Monosaccharidbausteine umfassendes Grundgerüst *en bloc* auf das Protein übertragen, wobei anschließend durch eine Reihe von Enzymen im Golgi-Apparat schrittweise Modifikationen des Zuckergerüsts ausgeführt werden [72]. Das Sequenzmotiv möglicher *N*-Glykosylierungsstellen ist die Aminosäureabfolge Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Allein für die Gruppe der Säugetiere wird die Diversität der möglichen Glykosylierungen auf mehr als 7000 Strukturen geschätzt, die sich aus den zehn Monosaccharidbausteinen Fukose (Fuc), Galaktose (Gal), Glukose (Glc), *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc), *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc), Glucuronsäure (GlcA), Iduronsäure (IdoA), Mannose (Man), Sialinsäure (SA) und Xylose (Xyl), zusammensetzen [74]. Die hohe Diversität ergibt sich durch Unterschiede in der Monosaccharidkomposition (jedes der oben genannten Monosaccharide kann zusätzlich als α - oder β -Anomer vorliegen), der Verknüpfung und der Verzweigung des Glykans, sowie aus

Einleitung

zusätzlichen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) [76]. Art und Grad der Proteinglykosylierung unterscheiden sich je nach Protein, Spezies, Zelltyp und auch zwischen einzelnen Individuen derselben Art. Aufgrund dieser Heterogenität verwundert es nicht, dass neben anderen Glykan-bindenden Proteinen wie Lektinen, auch eine Vielzahl von Karbohydrat-spezifischen Antikörpern existiert. Die Allo-Antikörper gegen die ABO-Blutgruppenantigene sind ein prominentes Beispiel, welches bereits 1900 entdeckt und 1930 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurde [77].

Im Zusammenhang der Allergie beeinflussen Glykane die Erkennung und Aufnahme von Allergenen, die Diagnostik und können auch direkte klinische Effekte haben, welche durch Glykan-spezifische Antikörper vermittelt werden [78-80]. Da zwar die ersten Schritte der *N*-Glykanbiosynthese bei allen Eukaryoten gleich sind, jedoch die Modifikationen des *core*-Glykans Spezies-spezifisch variieren, können so für den Menschen hochimmunogene Strukturen gebildet werden. So wurde bereits 1981 von Aalberse *et al.* gezeigt, dass die IgE-Antikörper aus verschiedenen Seren von Patienten mit Allergien gegen pflanzliche Lebensmittelallergene im RAST (*radioallergosorbent assay*) häufig kreuzreaktiv gegen verschiedene andere pflanzliche Lebensmittel, Pollen und auch Hymenopterengifte waren. Da die Behandlung der Allergene mit Periodat die IgE-Reaktivität negativ beeinflusste, wurde angenommen, dass diese Antikörper kreuzreaktive Karbohydrate (CCDs) erkennen, welche allerdings keine klinische Relevanz aufwiesen [81].

Später zeigte sich, dass diese CCDs durch die α -1,3-*core*-Fukosylierung des innersten GlcNAc, welche in Pflanzen und Insekten vorkommt, sowie die β -1,2-Xylosylierung der ersten Mannoseeinheit, welche zusätzlich in Pflanzen gefunden wird, konstituiert werden [82, 83]. Beide Modifikationen können auch bei Glykoproteinen aus Helminthen gefunden werden [82]. Abbildung 5 zeigt eine Reihe immunogener Glykane verschiedener Quellen. Die Glykosylierung von Pflanzenproteinen ist relativ heterogen, jedoch werden die oben genannten Modifikationen in fast allen Spermatophyten, Farnen und Schachtelhalmgewächsen gefunden [83]. Das MMXF³-Glykan, welches sich auf der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) findet, wird auch in vielen Glykoproteinen aus Nahrungsmittelallergenen und Pollen gefunden, sodass HRP in der Forschung häufig als CCD-Marker zur Messung von spezifischen IgE-Antikörpern verwendet wird. MuxF³, welches auf der Ananas-Protease Bromelain als einziges Glykan vorliegt, unterscheidet sich davon nur durch das Fehlen eines terminalen Mannosylrestes. Die geringere Verzweigung beeinflusst die Bindungseigenschaften von anti-CCD-Antikörpern

allerdings zum Teil erheblich und auch dieses Glykan wird als zusätzlicher CCD-Marker eingesetzt [84].

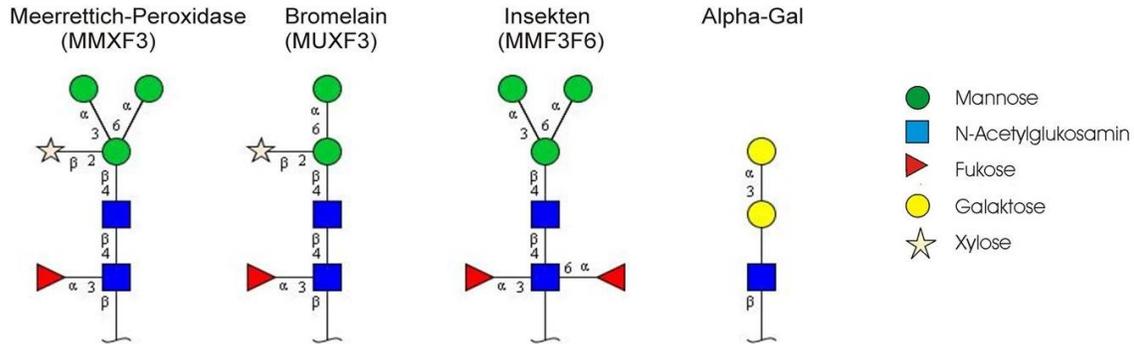


Abb. 5 Schematische Darstellung relevanter immunogener kreuzreaktiver Karbohydrat-Determinanten (CCDs).

Gezeigt sind typische *core*-Glykosylierungen aus Pflanzenproteinen, wie Meerrettich-Peroxidase oder Bromelain (α -1,3-Fukosylierung und β -1,2-Xylosylierung), Insekten (α -1,3-Fukosylierung) und nicht humanen Mammalia (α -Gal-Epitop). Alle diese Strukturen bilden eigenständige antigene Determinanten aus, die unabhängig von ihrem Trägerprotein sind und daher starke Kreuzreaktivitäten von spezifischen Antikörpern nach sich ziehen, weshalb sie als kreuzreaktive Karbohydrat-Determinanten (CCDs) bezeichnet werden.

Etwa bei 15-30% aller Allergiker können im Serum CCD-spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden. Die Häufigkeit des Auftretens solcher Antikörper, welche bei mehrfach sensibilisierten Individuen noch weitaus höher liegt [85], steht ihrer scheinbaren klinischen Irrelevanz gegenüber, da in der Regel keine allergischen Symptome damit einhergehen [83, 86]. So konnten Mari *et al.* in einer großen Kohorte zeigen, dass Patienten mit nachgewiesenen CCD-spezifischem IgE im Skin Prick Test mit Bromelain negativ reagieren [85]. Diese Ergebnisse werden von vielen weiteren Studien unterstützt. Die Ursache für diese scheinbare Diskrepanz bleibt noch offen, die anfängliche These, dass CCD-spezifische Antikörper durch niedrige Affinitäten gekennzeichnet sind, gilt jedoch als widerlegt. Vielmehr besteht derzeit die Theorie, dass der umfangreiche Kontakt mit Pflanzenglykanen z.B. über die Nahrung zur Bildung von blockierenden IgG-Antikörpern führt und somit einen der Immuntherapie ähnlichen Effekt hat [83]. Die Bedeutung dieser Modifikationen für die Allergie als solche und auch ihrer Therapie ist nach wie vor offen, die Beeinflussung der *in vitro* Diagnostik ist jedoch eindeutig [78]. Tatsächlich sind Karbohydrat-Determinanten die häufigsten IgE-Epitope und verantwortlich für bis zu 50% der doppelt positiven Testergebnisse bei Bienen- und Wespenallergie [87]. Diese Problematik kann durch den Einsatz von rekombinanten CCD-freien Allergenen in der *in vitro* Diagnostik umgangen werden [50]. Für das Galaktose- α -1,3-Galaktose-Epitop (α -Gal), welches in Mammalia, jedoch nicht in den meisten Primaten und dem Menschen gebildet wird, konnte entgegen den Ergebnissen zu

Pflanzen- und Insekten-CCDs eine andere Beobachtung hinsichtlich der klinischen Relevanz gemacht werden. Bei Verabreichung des in Hybridomazellen und somit mit murinem Glykosylierungsmuster produzierten Antikörpers Cetuximab, welcher spezifisch für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) ist und bei der Behandlung von metastasierendem kolorektalem Krebs eingesetzt wird, wurden hier anaphylaktoide Effekte beobachtet, die interessanterweise denen gleichen, die bei Allergien gegen rotes Fleisch und mit einer zeitlichen Verzögerung auftreten [79, 88]. Diese Reaktion wird ausgelöst durch bereits vorhandene IgE-Antikörper gegen α -Gal in der Fab-Region von Cetuximab [79]. Unlängst konnten geographisch begrenzte Zusammenhänge mit Bissen der Zecke *Amblyomma americanum* erbracht werden, die in einem Anstieg der α -Gal-spezifischen IgE-Level resultieren [89]. So wurden in dem Verbreitungsgebiet dieser Zecke im Südosten der USA 22% der Patienten mit Hypersensitivitätsreaktionen gegen Cetuximab diagnostiziert, während im Rest der USA nur etwa 3% der Bevölkerung allergisch sind [90]. Weiterhin wurden IgE-Reaktivitäten unterschiedlicher Allergene α -Gal-Epitopen zugeordnet [90, 91].

1.2 Antikörper

Antikörper sind Glykoproteine der Immunoglobulinfamilie und spielen in der adaptiven Immunantwort der Vertebraten eine entscheidende Rolle, indem sie die Spezifität für die Vielzahl der Substanzen (Antigene), mit denen das Immunsystem konfrontiert werden kann, vermitteln. Antikörper werden von zu Plasmazellen ausdifferenzierten B-Lymphozyten sezerniert [92] und sind als Heterotetramere aus zwei identischen schweren Ketten sowie zwei identischen leichten Ketten aufgebaut, welche über Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind, sodass sich die typische Y-förmige Struktur ergibt [93]. Die leichte Kette besteht aus zwei Immunoglobulindomänen mit einer Länge von jeweils etwa 110 Aminosäuren (einer C-terminalen konstanten Domäne (C_L) und einer N-terminalen variablen Domäne (V_L)) und hat ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa. Im Menschen kann sie entweder vom λ - oder κ -Typ sein, wobei bislang keine funktionellen Unterschiede bekannt sind. Die schwere Kette definiert den Isotyp des Antikörpers und besteht aus drei (IgA, IgD, IgG) bzw. vier (IgE, IgM) konstanten Domänen (C_H1 , C_H2 , C_H3 und ggf. C_H4), an die sich N-terminal ebenfalls eine variable Region (V_H) anschließt. Im Menschen wie in den meisten Säugetieren unterscheidet man zwischen fünf Isotypen: IgA, IgD, IgG, IgE und IgM, wobei IgA und IgG noch in weitere Subklassen unterteilt werden können (vgl. Tabelle 2).

Tab. 2 Liste der humanen Antikörperisotypen und ihrer Eigenschaften.

Schematische Darstellung	Isotyp	MW	Serumspiegel [mg/mL]	Funktion
	IgA ₁ [*]	160 kDa	3.0	Fungiert als erste „Verteidigungslinie“ in lymphatischen Geweben, Schleimhäuten und Körpersekreten, formt häufig Dimere
	IgA ₂	160 kDa	0.5	Funktion vergleichbar mit der von IgA1, entscheidende Rolle in der Erkennung von Polysacchariden und Lipopolysacchariden
	IgD	184 kDa	0.03	Wird gemeinsam mit IgM in der frühen Immunreaktion sekretiert oder als BCR gebunden, die Funktion ist weitestgehend unbekannt
	IgG ₁ [*]	146 kDa	9	anti-virale Immunreaktion ADCC, ADCP, CDC
	IgG ₂	146 kDa	3	Bindung von Kohlenhydrat-Antigenen (repetitive bakterielle Oberflächenmuster)
	IgG ₃	165 kDa	1	effektivster Aktivator des Komplementsystems
	IgG ₄	146 kDa	0.5	wird bei langanhaltendem oder wiederholtem Antigenkontakt gebildet
	IgE	188 kDa	5 · 10 ⁻⁵	Abwehr mehrzelliger Parasiten, entscheidende Rolle in der Allergie, liegt fast ausschließlich rezeptorgebunden auf Mastzellen und Basophilen vor
	IgM	970 kDa (Pentamer)	1.5	der erste Antikörper der bei Antigenkontakt gebildet wird, wird als Pentamer sekretiert oder monomer als BCR, effektive klassische Komplementaktivierung

Dargestellt sind IgA₁ bzw. IgG₁, stellvertretend für alle Subklassen des Isotyps

Einleitung

Der mengenmäßig dominante Antikörperisotyp im Serum eines gesunden Erwachsenen ist IgG, welcher verantwortlich für Erkennung, Opsonisierung, Neutralisierung und Eliminierung von pathogenen Antigenen ist. Durch die Interaktion mit zellgebundenen Fc γ -Rezeptoren und/oder dem Komplementsystem vermitteln IgG-Antikörper überwiegend pro- jedoch durch Modifikation der Glykosylierung im Fc-Teil auch anti-inflammatorische Effekte [94, 95]. Die vier IgG-Subklassen teilen eine Sequenzhomologie von 95% und vermitteln dennoch individuelle Funktionen aufgrund ihrer Affinitäten zu den exklusiv auf Immunzellen exprimierten Fc γ -Rezeptoren [95]. Hierbei liegen die größten strukturellen Unterschiede hauptsächlich in den verschiedenen *hinge*-Regionen, welche die schweren Ketten über Disulfidbrücken verbinden und sich durch besondere Flexibilität auszeichnen [96].

IgG₁ macht den größten Teil der Serumantikörper aus und ist primärer Vermittler der Fc γ -Rezeptor-mediierten Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), der Antikörper-abhängigen zellulären Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) und der Komplement-abhängigen Zytolyse (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) [96].

Während IgG₁ und IgG₃ in der Lage sind alle Fc γ -Rezeptoren zu binden, bindet IgG₂ nur den Fc γ RIIa auf Neutrophilen und mit etwas geringerer Affinität Fc γ RIIIa auf natürlichen Killerzellen (NK), Monozyten und Makrophagen. Vor allem T-Zell unabhängige Antigene, wie Polysaccharide und Lipopolysaccharide, führen zur Bildung von IgG₂ [97].

IgG₃ sticht deutlich aus allen anderen Isotypen heraus, da es eine außergewöhnlich hohe Affinität zu der Komplementkomponente C1q und den Fc γ -Rezeptoren hat und dadurch der effektivste Komplementaktivator und Effektorfunktionsvermittler ist, was vermutlich durch die geringe Serumhalbwertszeit ausgeglichen wird [95].

Die chronische Antigenexposition, wie bei der allergischen Desensibilisierung während einer spezifischen Immuntherapie (SIT), führt zur Bildung von Antigen-spezifischen IgG₄-Antikörpern [97].

IgM ist der erste Antikörper, der während Ontogenese und auch der Immunantwort produziert wird [98]. Die übrigen Isotypen (außer IgD) werden erst nach dem Klassenwechsel von B-Zellen durch DNA-Rekombination gebildet. IgM kann zellgebunden als Monomer vorliegen oder in sekretierter Form, wobei IgM im Serum Pentamere bildet, was die Avidität erhöht und die Bildung von Immunkomplexen fördert [99].

IgD wird durch alternatives Spleißen der mRNA erhalten, welche auch den IgM codiert und tritt ebenso wie IgM früh im Laufe der Immunantwort größtenteils als BCR gemeinsam mit IgM

und nur in geringem Maße als sekretierter Antikörper auf. Inwiefern IgD IgM funktionell ergänzt, ist bislang unbekannt [100].

Im Menschen werden, anders als in den meisten Säugetieren, zwei Subklassen des IgA-Isotyps gefunden, welche sich funktionell stark ähneln, und nicht in der Lage zur klassischen Komplementaktivierung sind. IgA₁, welcher in der *hinge*-Region hochgradig O-glykosyliert ist, überwiegt mengenmäßig in den meisten Geweben. IgA, vor allem IgA₂, liegt nur in geringer Serumkonzentration und meist als Dimer vor, ist allerdings der dominante Isotyp in den Mukus-assoziierten Geweben und Körpersekreten, wie Speichel, Muttermilch und im Urogenitaltrakt, wodurch ihm eine entscheidende Rolle als erste Linie der Immunabwehr zukommt [101].

IgE, der zuletzt entdeckte Isotyp, liegt fast ausschließlich rezeptorgebunden auf Mastzellen und Basophilen vor und ist der Isotyp mit der bei weitem geringsten Serumkonzentration. IgE vermittelt Immunantworten gegen mehrzellige Parasiten wie Helminthen, ist aber auch der entscheidende Antikörper in Typ 1 Hypersensitivitätsreaktionen [102].

Während die konstanten Domänen die Bindung an Fc-Rezeptoren gewährleisten und dadurch die jeweiligen Effektorfunktionen vermitteln, wird die Antigenpezifität eines Antikörpers durch dessen variable Domänen bestimmt, in denen sich drei hypervariable Regionen, die CDRs (*complementarity determining regions*) befinden, die zwischen vier relativ konservierten Gerüst-Regionen, den FRs (*framework region*) liegen, wobei die größte Variabilität und Bedeutung für die Antigenbindung von der CDR3 der V_H ausgeht [103, 104]. Im gefalteten Protein bilden die variablen Regionen Loopstrukturen aus, so dass jeweils die drei CDRs der V_H und V_L nebeneinander liegen und eine Antigenbindungsstelle, das Paratop, ausbilden können [96]. Die Variabilität der Antikörper (10^9 bis 10^{11}) steht scheinbar im Gegensatz zu der begrenzten Anzahl der kodierenden Gene [105]. Allerdings ist die genetische Organisation der Immunoglobulingene äußerst komplex, da sich die Genloci der variablen Regionen jeweils aus mehreren Gensegmenten zusammensetzen. Die Gene der V_L bestehen aus jeweils einem V-Gensegment (*variable*) und einem J-Gensegment (*joining*), die ein Exon bilden. Das für die C_L kodierende Exon liegt separat. Die V_H wird aus drei Gensegmenten, V, D (*diversity*) und J, zusammengefügt. Die C_{Hs} werden von mehreren Exons kodiert. Die hohe Diversität der Antikörper ergibt sich nun dadurch, dass eine begrenzte Anzahl vererbbarer Gensequenzen für die variablen Domänen erst im Laufe der B-Zell-Reifung durch somatische Rekombination zu den entsprechenden Genloci zusammengesetzt werden [106]

1.2.1 Immunglobulin E und die Fcε-Rezeptoren

Als letzter Antikörperisotyp wurde 1968 IgE entdeckt [107], was sich vor allem durch seine extrem geringe Serumkonzentration erklären lässt, die für einen gesunden Erwachsenen im Vergleich zu IgG etwa tausendfach geringer ist. Erhöhte IgE-Titer können dabei bereits Aufschluss über den Gesundheitsstatus eines Individuums geben [40]. IgE Antikörper sind nicht über die Plazenta übertragbar und können das Komplementsystem nicht aktivieren. Die Halbwertszeit von IgE im Serum ist mit nur 2 Tagen äußerst gering, jedoch liegt der größte Teil der IgE-Antikörper rezeptorgebunden auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen vor, wo sie über lange Zeit stabil bleiben [108]. Die Aufgabe des IgE im gesunden Immunsystem liegt in der Abwehr von Endoparasiten [102] und Toxinen [109].

IgE unterscheidet sich strukturell von IgG hauptsächlich durch die fehlende *hinge*-Region und die zusätzliche Immunoglobulin-domänen im Fc-Teil, wobei sich die Cε3- und Cε4-Domäne in der Quartärstruktur der Cγ2- und Cγ3-Domäne ähneln, welche eine Sequenzhomologie von 32% aufweisen [110]. Die Cε2-Domäne entspricht aufgrund ihrer relativen Flexibilität im Wesentlichen der *hinge*-Region des IgG und macht den größten strukturellen Unterschied zum IgG aus [111]. Auch wenn die zusätzliche Domäne einen längeren Fc-Teil suggeriert, wird allgemein von einer kompakten Struktur des IgE-Fc ausgegangen, in der sich die Cε2-Domänen hinter die Cε3- und Cε4-Domänen falten [112]. Jedoch deuten strukturelle Analysen darauf hin, dass sich die Struktur des IgE in Lösung und des rezeptorgebundenen Antikörpers stark unterscheiden [108, 110, 113]. So zeigten Wurzburg *et al.* 2000 in röntgenkristallographischen Untersuchungen des Cε3/Cε4-Fc in Lösung die bereits früher beobachtete kompakte (*bent*) Konformation, während der FcεRI-gebundene IgE eine gestreckte (*open*) Konformation einnimmt [110]. Diese konformationelle Flexibilität des Fc-Teils wird als essentiell für die Rezeptorbindung angesehen [108, 111].

Es sind zwei grundlegende IgE-Rezeptoren bekannt, der hochaffine FcεRI, welcher IgE mit einer Affinität im Bereich von $K_a \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}$ bindet und somit die höchste Affinität aller Immunglobulinrezeptoren aufweist [114, 115] und der niederaffine FcεRII oder CD23. Der humane FcεRI ist ein tetramerer oder seltener trimere Komplex mit der Zusammensetzung αβγ2 bzw. αγ2, wobei die stark glykosylierte α-Kette zu der Immunoglobulin-Superfamilie gehört und extrazellulär die IgE-Bindungsstellen enthält [116], welche mit zwei Bindungsstellen der N-terminalen Region der Cε3 interagiert [117]. Die Asymmetrie dieser Bindung führt zu einer 1:1 Stöchiometrie zwischen FcεRIα und IgE-Fc, was gewährleistet, dass der Rezeptor nur bei Bindung eines multivalenten Antigens durch IgE kreuzvernetzt werden kann [113, 114].

Die β - und γ -Einheiten beinhalten jeweils sogenannte ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), wobei es sich um zytoplasmatische Strukturen aus 18 Aminosäuren handelt, welche für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Die Kreuzvernetzung und somit Aggregation des Fc ϵ RI auf Mastzellen und Basophilen durch Antigenbindung über IgE führt zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITAMs und mediiert so die Aktivierung der Zelle und die Ausschüttung von vorgebildeten Mediatoren sowie die Synthese und Sekretion von Zytokinen [40, 118]. Außerdem wird der Fc ϵ RI in geringerem Maße auch auf Langerhans-Zellen, DCs, aktivierten Monozyten, Thrombozyten und Eosinophilen gefunden [116]. Durch steigende IgE-Serumkonzentrationen wird die Fc ϵ RI-Belegung auf Mastzellen und Basophilen hochreguliert, indem der Rezeptor vom Abbau durch Rezeptor-Recycling geschützt wird [119, 120]. Außerdem trägt die Bindung von IgE durch den Fc ϵ RI zum Überleben der Zelle bei [121].

Der niederaffine Fc ϵ RII ist das C-Typ Lektin (Kalzium-abhängiges Lektin, *calcium-dependent lectin*) CD23 und wird ebenfalls auf einer Vielzahl von Zelltypen, wie B-Zellen, Eosinophilen, Thrombozyten, NK-Zellen, T-Zellen, follikulären DCs und Langerhans-Zellen, gefunden [117].

Der Fc ϵ RII liegt in der membrangebunden Form als Trimer vor und die drei extrazellulären Lektin-Domänen werden von der Membran durch einen Tripel- α -helikalen *coiled coil* Stamm getrennt. Dieser Stamm ist gegenüber proteolytischem Abbau durch endogene Proteasen, hauptsächlich der Metalloproteinase ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase 10*), anfällig, was zu verschiedenen löslichen CD23 Molekülen (sCD23) führt [122, 123]. Die löslichen CD23 Fragmente haben, je nach Größe und Anzahl der Untereinheiten, unterschiedliche Funktionen; so stimuliert trimeres sCD23 die IgE-Synthese, wohingegen monomeres sCD23 diese inhibiert [124]. Der kurze N-terminale intrazelluläre Teil von CD23 liegt in zwei Spleiß-Varianten vor (CD23a und CD23b), welche sich lediglich in den letzten 7 bzw. 6 Aminosäuren unterscheiden. Die beiden Isoformen werden auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert: CD23a wird vor Allem auf antigenaktivierten B-Zellen vor deren Differenzierung zu Plasmazellen gefunden, wohingegen die CD23b-Expression durch IL-4 auf einer Vielzahl von inflammatorischen Zellen, B-Zellen und Epithelzellen induziert wird [102].

Obwohl es sich bei dem niederaffinen Rezeptor um ein Lektin handelt und die Kalzium-Interaktion die Affinität stark positiv beeinflusst [125], involviert die IgE-Bindung keine Kohlenhydratreste [126]. Eine der Lektindomänen des CD23-Trimers bindet in einer 2:1 Stöchiometrie jeweils an einer der schweren Ketten des IgE-Fc-Dimers, im Bereich des Übergangs zwischen C ϵ 3 und C ϵ 4, wobei der IgE-Fc Teil eine sehr kompakte (*bent*) Konformation einnimmt, im Gegensatz zu der Bindung durch den hochaffinen Fc-Rezeptor und auch zu der *bent* Konformation in Lösung [127, 128]. Die Konsequenz aus diesen

Einleitung

unterschiedlichen IgE-Konformationen macht eine gleichzeitige Bindung durch den hoch- und den niederaffinen Fc-Rezeptor unmöglich, auch wenn sich die Bindungsstellen kaum überlappen [127].

Die Bezeichnung als niederaffiner Rezeptor ist insofern irreführend, als dass zwar die Affinität jeder IgE-Bindungsdomäne relativ gering ist ($K_a \approx 10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}$) die Avidität der kombinierten drei Domänen nähert sich allerdings dem hochaffinen Rezeptor ($K_a \approx 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$) [102, 129]. Im Gegensatz zum hochaffinen FcεRI bindet CD23 fast ausschließlich multivalente IgE-Antigenkomplexe und nicht IgE allein, kann aber auf diese Art eine ähnlich effiziente Zellaktivierung auslösen [118]. CD23 vermittelt die IgE-abhängige Antigenpräsentation durch humane B-Zellen [130] und der IgE-CD23-Interaktion wird eine Bedeutung für eine Reihe weiterer IgE-abhängiger Prozesse zugesprochen, wie der Immunabwehr von Parasiten, der Induktion der IgE-Produktion und der Aufrechterhaltung sowie Modulation der IgE-Reaktion [117]. Außerdem sind IgE-unabhängige Funktionen bekannt, wie die Stimulation der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen über die Wechselwirkung mit den Komplementrezeptoren CD18/11b und /11c [131].

IgE ist der am stärksten glykosylierte aller humanen Antikörperisotypen mit 7 möglichen N-Glykosylierungsstellen in jeder schweren Kette, wobei die Glykosylierung etwa 12-14% des Molgewichts von IgE ausmacht [132, 133]. Es ist allgemein anerkannt, dass Art und Ausmaß der Glykosylierung von Antikörpern häufig entscheidend für ihre Struktur und Funktion sind [132]. Neben der Löslichkeit und Stabilität [134], dem Transport, Sekretion und *Clearance* [135], wird auch die spezifische Rezeptorbindung und somit die Vermittlung der jeweiligen Effektorfunktionen von der Glykosylierung beeinflusst [136, 137]. Plomp *et al.* haben 2014 die typische N-Glykosylierung von humanem IgE massenspektrometrisch (MS) aufgeklärt [133]. Aus dieser Analyse wird deutlich, dass sechs der sieben möglichen N-Glykosylierungsstellen in der schweren Kette tatsächlich glykosyliert sind. Außerdem ist das Glykan an der Position Asn275 überwiegend von oligomannosidischer Struktur, während alle anderen Positionen mit Komplextyp-Glykanen besetzt sind. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung eben dieser hochgradig konservierten Position Asn275 in der Cε3 essentiell für die Bindung des FcεRI auf Mastzellen ist [137]. Die selektive Entfernung des oligomannosidischen Glykans scheint eine Änderung der Konformation des IgE zu bewirken, welche die Interaktion mit dem hochaffinen Rezeptor verhindert.

1.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten im Kontext allergischer Erkrankungen, insbesondere der Insektengiftallergie, die Interaktion von spezifischen humanen Antikörpern mit ihren Antigenen untersucht und charakterisiert werden. Im Fokus stehen hier im Wesentlichen Antikörper des IgE-Isotyps, welche rekombinant produziert und anschließend funktionell sowie strukturell charakterisiert werden sollten. Besonders die strukturelle Analyse von humanem IgE war bislang durch dessen geringe rekombinante Verfügbarkeit begrenzt, sodass neue Erkenntnisse über die Struktur von humanem IgE erhalten werden sollen. Aus diesem Grunde sollten neue rekombinante Ansätze und insbesondere das Baculovirusexpressionssystem zur Darstellung von IgE verfolgt werden.

Darüber hinaus sollten rekombinante Ansätze zur differentiellen *in vitro* Diagnostik der Insektengift-Allergie verfolgt werden. Eine der Herausforderungen für die moderne Diagnostik besteht hier in der Differenzierung nahe verwandter Spezies, insbesondere der Wespen *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris*. Hierfür sollten ausgewählte Allergene aus den Giften von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* genutzt werden, Bisherige Studien legen nahe, dass aufgrund ausgeprägter Kreuzreaktivitäten der Einzelkomponenten ein erweiterter Allergen-Satz verwendet werden muss, um zuverlässig zwischen Wespen- und Feldwespengiftallergie unterscheiden zu können [62]. Ein rekombinanter Zugang soll hier einen Vergleich der IgE-Reaktivitäten ermöglichen und damit eine Beurteilung erlauben, inwiefern die *in vitro* Diagnostik durch den Einsatz der rekombinanten Feldwespenallergene verbessert werden kann.

2. Material

2.1 Enzyme und Standards:

Die folgenden Enzyme und Standards wurden bezogen von:

Thermo Fischer Scientific
(Waltham, MA USA):

Restriktionsenzyme
*DreamTaq*TM DNA Polymerase
Phusion High Fidelity DNA Polymerase
*FastAP*TM *Thermosensitive Alkaline Phosphatase*
T4-DNA-Ligase
Page Ruler Plus prestained Protein Ladder
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder

2.2 Antikörper und Lektine

Als Lektine, primäre Antikörper, Direktkonjugate oder sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antibodies-online (Aachen):

Anti-V5-Antikörper, polyklonal, Ziege

Sigma (Taufkirchen):

Anti-*rabbit* IgG-Antikörper AP-Konjugat,

polyklonal, Ziege

Anti-human κ -*light chain*-Antikörper AP-Konjugat,

polyklonal, Ziege

Anti-human IgG-Antikörper AP-Konjugat,

polyklonal, Ziege

ExtrAvidin AP-Konjugat

Acris (Herford):

Anti-Lysozym, polyklonal, Kaninchen

Biozol (Eching):

Anti-human IgE-Antikörper AP-Konjugat,

polyklonal, Ziege

Rockland (Limerick, PA, USA):

Anti-IgY-Antikörper AP-Konjugat, polyklonal,

Ziege

Vectorlabs (Burlingame, CA, USA):	AAL biotinyliert GNA biotinyliert
Calbiochem (Schwalbach):	humaner Myeloma-IgE

2.3 Chemikalien und Bioreagenzien

Standard-Chemikalien, Salze, etc. wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad Laboratories (München), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), peqLab (Erlangen), AppliChem (Darmstadt), Calbiochem (Schwalbach) oder Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande). Spezielle Reagenzien sind jeweils gesondert aufgeführt.

2.4 Chromatographie-Säulen

GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK):	HiTrap <i>KappaSelect</i> (1 mL-Säule) His Trap excel (1mL-Säule) MonoS (1 mL-Säule) Superdex200 HR (24 mL-Säule)
--	--

2.5 Bakterienstämme

Für Klonierungen und Standardanwendungen molekularbiologischer Arbeiten wurden folgende *E.coli*-Stämme eingesetzt: XL10-Gold, XL1-Blue und DH10bac.

2.6 Zelllinien und Zellkultur

Zur rekombinanten Expression wurden die humane Zelllinie HEK293 sowie die Insektenzelllinie *Sf9* (Invitrogen *life technologies*, Karlsruhe, Germany) verwendet. Für den Degranulationsassay wurden RBL-2H3-SX38-Zellen verwendet.

Medien und deren Zusatzstoffe sowie Gewebekulturgefäße wurden bezogen von:

Biochrom AG (Berlin):	Fötale Kälberserum (FKS)
-----------------------	--------------------------

GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK):	<i>HyClone™ SFX-Insect™ Media</i>
--	-----------------------------------

Material

Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA): DMEM, RPMI, Trypsin-EDTA, Zeocin, Penicillin G, Streptomycin, Gentamicin

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht): Gewebekulturflaschen und –schalen

PAA *the cell culture company* (Cölbe): Pluronic F86

2.7 Vektoren

Die Hymenopteregiftallergene wurden in den Vektor pACgp67B (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) kloniert. Die humanen IgE-Antikörper wurden in den Vektor pFastBac Dual (Fischer Scientific, Waltham, MA USA) kloniert.

2.8 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von den Firmen *metabion* Gesellschaft für angewandte Biotechnologie GmbH (Planegg-Martinsried) oder Sigma (Taufkirchen) synthetisiert. Die Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt.

2.9 Puffer und Lösungen

Die benutzten Puffer und Lösungen sowie ihre Zusammensetzungen sind nachfolgend aufgelistet. Alle Pufferlösungen wurden vor Gebrauch, soweit möglich, autoklaviert. Alle Puffer und Lösungen, die für die Chromatographie eingesetzt wurden, wurden vor Gebrauch mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert.

Agarosegel-Auftragspuffer (6x):	0.09% (w/v)	Bromphenolblau
	0.09% (w/v)	Xylen Cyanol FF
	60% (w/v)	Glycerol
	60 mM	EDTA
Ampicillin-Stocklösung:	100 mg/mL	Ampicillin in 70% EtOH

		steril filtriert Lagerung bei -20 °C
APS-Stocklösung:	10% (w/v)	Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O Lagerung bei +4 °C
Carbonatpuffer (0.1 M):	0.5 M 0.5 M	Natriumcarbonat Natriumhydrogencarbonat in ddH ₂ O
Citratpuffer (HRP Detektion):	50 mM	Zitronensäure pH 4.0
Citratpuffer (Degranulationsassay):	53 mM 47 mM	Zitronensäure tri-Natriumcitrat · H ₂ O pH 4.5
Coomassie-Färbelösung:	0.1% (w/v) R-250 1% (v/v) 40% (v/v)	Coomassie Brilliant Blau Eisessig Methanol in ddH ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung:	20% (v/v) 80% (v/v)	Eisessig Wasser
Detektionslösung (AP):	0.1 M 10 mM 0.1 M	Tris-HCl, pH 9.5 MgCl ₂ NaCl
Detektionslösung (HRP im ELISA):	3.3 mg	ABTS

Material

	15 mL	Citratpuffer, pH 4.0
	30 µL	H ₂ O ₂ (30%)
EDC-Lösung:	400 mM	EDC in ddH ₂ O, Lagerung in 180 µL Aliquots bei -20 °C
Gelfiltrations-Laufpuffer:	10 mM	HEPES
	150 mM	NaCl pH 7.5
Kanamycin-Stocklösung:	20 mg/mL	Kanamycin in ddH ₂ O steril filtriert Lagerung bei -20 °C
Kationenaustausch-Elutionspuffer:	20 mM	Natriumacetat
	500 mM	NaCl pH 5.0
Kationenaustausch-Laufpuffer:	20 mM	Natriumacetat pH 5.0
MALDI-Matrixpuffer: hydroxyzimtsäure	0.4%	α-Cyano-4- (rekristallisiert)
	70%	Acetonitril
	0.1%	Trifluoressigsäure
NaAc-Lösung:	3 M	Natriumacetat, pH 5,2
NaAc-Lösung (SPR):	10 mM	Natriumacetat, pH 4.5
NBT-Stocklösung:	1% (w/v)	NBT in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 Lagerung bei -20 °C

NHS-Lösung:	100 mM	NHS In ddH ₂ O, Lagerung in 180 µL Aliquots bei -20 °C
PAGE-Probenpuffer (4x):	250 mM 40% (v/v) 8% (w/v) 0.004% (w/v)	Tris-HCl, pH 6.8 Glycerol SDS Bromphenolblau
reduzierend:	100 mM	DTT zusätzlich
PAGE-Sammelgel-Puffer (4x):	0.5 M 0.4% (w/v)	Tris-HCl, pH 6.8 SDS Lagerung bei +4 °C
PAGE-Tankpuffer (5x):	0.125 M 0.96 M 0.5% (w/v)	Tris-HCl, pH 8.3 Glycin SDS
PAGE-Trenngel-Puffer (4x):	1.5 M 0.4% (w/v)	Tris-HCl, pH 8.8 SDS Lagerung bei +4 °C
PBS :	100 mM 90 mM 10 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ wasserfrei NaH ₂ PO ₄ -Monohydrat pH 7.4 oder 8.0
Phenol / Chloroform:	50% (v/v) 50% (v/v)	Phenol (Tris-gesättigt) Chloroform
pNAG-Stocklösung:	8 mM	pNAG in Citratpuffer pH 4.5
Quantifizierungs-Blockierlösung:	50 mM	Tris

Material

	140 mM	NaCl
	1% (w/v)	BSA
		pH 8.0
Quantifizierungs-Verdünnungslösung:	50 mM	Tris
	140 mM	NaCl
	1% (w/v)	BSA
	0.05% (v/v)	Tween 20
		pH 8.0
Quantifizierungs-Waschlösung:	50 mM	Tris
	140 mM	NaCl
	0.05% (v/v)	Tween 20
		pH 8.0
Regenerationspuffer (SPR, basisch):	1 M	Tris, pH 11
Regenerationspuffer (SPR, sauer):	0.1 M	Essigsäure, pH 1
SDS-Stocklösung:	10% (w/v)	Natriumdodecylsulfat in ddH ₂ O
SDS-PAGE Anodenpuffer:	40 mM	Tris
		pH 8.9
SDS-PAGE Kathodenpuffer:	100 mM	Tris
	100 mM	Tricin
		pH 8.6
TAE-Puffer (50x):	2 M	Tris-Acetat
	50 mM	EDTA
		pH 8.5 mit Essigsäure einstellen

TE-Puffer:	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 8.0 EDTA
TMB-Substratlösung: 5.0	20 mL 200 µL 6 µL	Phosphat-Citratpuffer, pH TMB Lösung H ₂ O ₂ (30%)
TPBS:	0.1% (v/v)	Tween 20 in PBS
TPBS (ELIFAB):	0.04% (v/v)	Tween 20 in PBS
TPBS (SPR):	0.01% (v/v)	Tween 20 in 50 mM PBS
Transferpuffer:	25 mM 19.2 mM	Tris Glycin auf 800 mL mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8.3 einstellen
	20% (v/v)	Isopropanol
Tris-Puffer:	1 M	Tris-HCl, pH 7,5 bzw. 9,0
Tyrode's incomplete:	7.6 g/L 0.4 g/L 2.4 g/L 0.2 g/L 0.2 g/L	NaCl KCl HEPES CaCl ₂ · 2 H ₂ O MgCl ₂ · 6 H ₂ O pH 7.4
Tyrode's incomplete:	zusätzlich: 1 g/L 1 g/L	Glukose BSA

Material

x-Gal-Stocklösung:	20 mg/L	x-Gal in DMF
X-Phos-Stocklösung:	0.5% (w/v) Bromchlorindolylphosphat	5- Dinatriumsalz in ddH ₂ O Lagerung bei -20 °C

2.10 Medien

Alle Medien (außer den Kryomedien) wurden vor Gebrauch autoklaviert, wobei eventuelle Zugabe von Antibiotika oder anderen Zusätzen nach Abkühlen auf 60 °C erfolgte.

Kryomedium für HEK293:	90% (v/v) 10% (v/v)	FKS DMSO (für die Zellkultur)
Kryomedium für Insektenzellen:	45% (v/v) 45% (v/v) 10% (v/v)	SFX Insektenzellmedium konditioniertes SFX Insektenzellmedium DMSO
LB-Medium:	10 g/L 10 g/L 5 g/L	Trypton NaCl Hefeextrakt
LB-Agar:	10 g/L 10 g/L 5 g/L 5 g/L	Trypton NaCl Hefeextrakt Agar
SOB-Medium:	20 g/L 0.5 g/L 5 g/L 2.5 mM	Trypton NaCl Hefeextrakt KCl

	ad 950 mL	ddH ₂ O
		pH 7.5 einstellen
	ad 1000 mL	ddH ₂ O
	10 mL	1 M MgCl ₂ (steril filtriert)
SOC-Medium:	1 L	SOB-Medium
	7.2 mL	50% Glukose (steril filtriert)
		Lagerung in 2 mL Aliquots bei -20 °C
2YT-Medium:	16 g/L	Trypton
	5 g/L	NaCl
	10 g/L	Hefeextrakt

2.11 Käuflich erworbene Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden bezogen von:

Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA USA): *GeneJET™* Plasmid Miniprep Kit

GeneJET™ Gel Extraction Kit

Bethyl (Montgomery, USA): Human IgE ELISA *QuantitationSet*

2.12 Verbrauchsmaterialien

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

2.13 Geräte

Es wurden die nachstehenden Geräte eingesetzt:

Eppendorf AG (Hamburg): BioPhotometer

Material

	Thermomixer C MiniSpin™ Tischzentrifuge Centrifuge 5417 C Centrifuge 5417 R Mastercycler gradient
peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen):	Primus 25 <i>advanced</i> ™ Thermocycler Horizontal-Gelelektrophoresesystem Mikrozentrifuge PerfectSpin24 NanoDrop ND-1000
Thermo Fischer Scientific (Waltham MA, USA):	Holten Laminair Laminarströmungsbank 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer Megafuge 40R
SCIE-PLAS (Cambridge, UK):	V20 Semi-Dry Blotter
Bio-Rad Laboratories GmbH (München):	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell Gel Doc XR System Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell S1000™ Thermal Cycler
New Brunswick Scientific GmbH (Nürtingen):	innova™ 44 incubator shaker Innova™44, refrigerated incubator shaker
TECAN Deutschland GmbH (Crailsheim):	Infinite M200Pro Multi-Detektions-Reader
Hofer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA): Vertical	SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Electrophoresis Unit
Amersham Biosciences Europe GmbH	

(Freiburg): 3500XL	Electrophoresis power supply EPS
IKA Labortechnik (Staufen):	MS1 Minishaker KS 200 basic Shaker
VWR (Darmstadt):	Power Source 250 V + 300 V INCU-Line IL 53 MicroStar 17R Tischzentrifuge SympHony SB70P Digital, pH-Meter
Carl Zeiss Microscopy GmbH (Göttingen):	Primovert Mikroskop
Bibby Scientific (Staffordshire, UK):	Stuart™ Hotplate Stirrer CB 162 Stuart™ Roller Mixer SRT6
Integra Bioscience AG (Zizers, Schweiz):	CELLROLL Rollereinheit VACUSAFE VACUBOY
Memmert GmbH (Schwabach):	Wasserbad WNB 7 CO ₂ Brutschrank INCO 153med
GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK):	Pharmacia LKB GPS 200/400 Power Supply ÄKTA™ Start Xampler Ultrafiltration Cartridge MWCO 10000
Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt):	Pipetus™ Standard Pipettierhilfe
Sartorius (Göttingen):	arium pro water purification system
Bruker AXS (Karsruhe):	NanoSTAR SAXS-Kamera

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Sambrook und Russel durchgeführt [138]. Verwendete Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert bzw. mit Ethanol sterilisiert. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde hochreines Wasser verwendet. Die Durchführung dieser Arbeit fand in einem Sicherheitsstufe 1-Labor gemäß des GenTG statt.

3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Methode zur *in vitro* Amplifikation kleinster Mengen DNA [139]. Dabei werden Oligonukleotide bekannter Sequenz eingesetzt, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Eines dieser Oligonukleotide bindet an den *Sense*-, das andere an den *Antisense*-Strang. Durch Oligonukleotide, die zusätzlich zu der flankierenden Sequenz noch weitere Nukleotide tragen, ist es möglich, zum Beispiel künstliche Restriktionsschnittstellen einzuführen. Die PCR ist eine zyklische Abfolge von drei sich wiederholenden Reaktionsschritten. Zunächst wird der eingesetzte DNA-Doppelstrang bei 94 °C denaturiert. Im nächsten Schritt (*Annealing*) wird die Temperatur erniedrigt, und die spezifischen Oligonukleotide binden entsprechend ihrer Sequenz an die komplementäre Sequenz auf dem DNA-Strang. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C erhöht und es erfolgt die Elongationsphase, in der eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Komplementärstränge synthetisiert. Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments. Die Länge der Elongationsphase richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Man rechnet üblicherweise je nach eingesetzter Polymerase mit einer Zeit von 30 bis 60 Sekunden pro Kilobase zu amplifizierender DNA. Für PCR-Reaktionen wurde folgender Standardansatz verwendet und nach dem Standard-PCR-Protokoll durchgeführt.

Tab. 3 Standard PCR-Ansatz

Zugabe von	Menge/Konzentration
DNA-Matrize	x µL (Endkonz. 0.1-1 ng)
<i>sense</i> Oligonukleotid	x µL (Endkonz. 200-800 nM)
<i>antisense</i> Oligonukleotid	x µL (Endkonz. 200-800 nM)
dNTPs (12.5 mM)	2 µL

Zugabe von	Menge/Konzentration
10x Polymerase Puffer + MgCl ₂	5 µL
Polymerase	1 U
	ad 50 µL ddH ₂ O

Tab. 4 Standard PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [min]	Zyklenzahl
Primärdenaturierung	94	2	1
Denaturierung	94	0.5	
<i>Annealing</i>	48-68*	0.5-1	30-35
Elongation	72	0.5-1/1000 bp	
finale Elongation	72	5	1

*Die *Annealing*-Temperatur wurde je nach verwendeten Oligonukleotiden variiert und 5 °C unterhalb des T_M-Wertes der Oligonukleotide gewählt.

Zur Hybridisierung von DNA-Strängen mit komplementären Enden wurde nach deren Amplifikation eine Hybridisierungs-PCR durchgeführt. Dabei werden zunächst 7 PCR-Zyklen ohne Oligonukleotide durchgeführt, in denen die überlappenden Fragmente hybridisieren und anschließend weitere 25 Zyklen nach Oligonukleotid-Zugabe zur Amplifikation des Gesamtkonstrukts.

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNA- bzw. RNA-Molekülen. Sie findet sowohl im analytischen, als auch im präparativen Bereich ihre Anwendung. Nach Auftragen der Nukleinsäureprobe auf das Agarosegel wird ein elektrisches Feld angelegt, durch dessen Poren die negativ geladenen DNA- bzw. RNA-Moleküle wandern. Da das Verhältnis von Anzahl an Nukleotiden zur Ladungszahl eins beträgt und größeren Molekülen aufgrund der Gelstruktur einem größeren Widerstand ausgesetzt sind, ist die Beweglichkeit der Fragmente nur von ihrer Größe abhängig. So laufen kleine Fragmente schneller als große und trennen sich in Banden gleich großer Moleküle auf. Üblicherweise wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 0.5 g Agarose in 50 mL 0.5x TAE Puffer gegeben und aufgekocht. Dann wurden 5 µL GelRed™-Lösung (Biotium, Hayward, CA, USA) zugegeben und in eine Gießkammer überführt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine mit 0.5x TAE Puffer gefüllte Laufkammer gegeben und die zu untersuchenden Proben mit der

Methoden

entsprechenden Menge 6x Gel-Beladungspuffer versetzt. Nach dem Auftragen der Proben wurde für 15 bis 60 min eine Spannung von 140 V angelegt. Auf einem UV-Transilluminator konnte die Interkalation des GelReds in die DNA mittels eines Video-Image-Systems festgehalten und mit Hilfe eines mitlaufenden DNA-Größenstandards analysiert werden.

3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *GeneJET™ Gel Extraction Kits* (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA). Das Prinzip dieses Kits beruht auf dem Lösen der Agarose und der selektiven quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren an eine Siliciumdioxid-Matrix in Gegenwart hoher Salz-Konzentrationen. Eluiert wird die DNA mit einer Lösung geringer Salzkonzentration, wie Tris-Puffer oder ddH₂O. Die identifizierten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit der gleichen Volumenmenge Bindepuffer versetzt und für 10 min unter Schütteln bei 55 °C inkubiert bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde die DNA-/Agaroselösung in Aliquots von max. 750 µL auf eine *GeneJET™*-Zentrifugensäule gegeben und 1 min bei 12000 xg zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es folgte ein Waschschriff mit 700 µL Waschpuffer. Als nächstes wurde die Säule durch Zentrifugation bei 12000 xg für 1 min getrocknet. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte durch eine geeignete Menge ddH₂O oder Elutionspuffer und Zentrifugation für 1 min bei 12000 xg. Die eluierte DNA konnte direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.1.4 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsenzymen

Die Restriktion von DNA mit *FastDigest™* sowie konventionellen Enzymen wurde zur Klonierung der Konstrukte sowie zur Überprüfung von Minipräparationen nach der Ligation eingesetzt. Die Enzymeinheit u ist definiert als die Enzym-Menge, die erforderlich ist, um 1 µg Standard-DNA in 5 min zu schneiden. Die zu schneidende DNA-Probe (0.1-5 µg) wurde mit der entsprechenden Menge des Restriktionsenzym in *FastDigest™* Puffer bei der Temperatur, welche vom Hersteller als Optimum für das jeweilige Enzym angegeben wurde, für 5-300 min hydrolysiert. Wurde ein DNA-Fragment mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, welche dasselbe Temperaturoptimum aufweisen, so wurden beide Enzyme in adäquaten Mengen hinzugegeben und inkubiert. Vektoren wurden im nachfolgenden Schritt mit der *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert. Nach Restriktion und gegebenenfalls Dephosphorylierung wurden die

geschnittenen DNA-Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert.

3.1.5 Dephosphorylieren von DNA-Fragmenten

Durch die *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* wird die finale Phosphatgruppe eines DNA-Strangs abgespalten. Es wurde 1 µL des Enzyms direkt zum Restriktionsverdau gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert.

3.1.6 Extraktion von DNA-Lösungen

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-haltigen Lösungen wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde dazu mit 0.5 Volumenanteilen Tris-gesättigtem Phenol und 0.5 Volumenanteilen Chloroform versetzt und gevortext. Zur Phasentrennung wurde 2 min lang bei 12000 xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die DNA und wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Wurden noch Restmengen von Phenol in der Probe festgestellt, konnte in analoger Verfahrensweise ein Extraktionsschritt mit Chloroform angefügt werden. Die überführte wässrige Phase wurde anschließend einer Alkoholpräzipitation unterworfen.

3.1.7 Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren

Für die Alkoholpräzipitation zur Reinigung und Konzentrierung von DNA wurden zu einem Volumenteil DNA-Lösung drei Volumenanteile eiskaltes 96%-iges Ethanol und 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetatlösung, pH 5.2 gegeben. Der Alkohol bewirkt eine Dehydratisierung der DNA-Moleküle, welche sich dadurch zusammenlagern. Durch die Zugabe monovalenter Kationen mit leicht saurem pH-Wert als Ladungskompensatoren kann die Löslichkeit der DNA selektiv beeinflusst und so die Effizienz der Fällung erhöht werden. Nach Vortexen wurde die Lösung 20 min bei 4 °C und 20400 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µL 70%-igem eiskaltem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4 °C und 20400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in der gewünschten Menge ddH₂O aufgenommen.

3.1.8 DNA-Ligation

Bei der Ligation werden kohäsive (*sticky*) oder stumpfe (*blunt*) DNA-Enden, die durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, durch einen enzymatischen Vorgang unter Verwendung der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Dabei kommt es zur kovalenten Verknüpfung der 5'-Enden des einen Fragments mit den 3'-Hydroxyl-Enden des zweiten unter Ausbildung einer Phosphorsäurediesterbindung. Auf diese Weise werden DNA-Fragmente in die entsprechend geschnittenen Vektoren eingefügt. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wird dieser dephosphoryliert eingesetzt. Da die Ligase aus energetischen Gründen einen Phosphatrest benötigt, werden im Gegensatz zu den Vektoren die DNA-Fragmente nicht dephosphoryliert eingesetzt. Die T4-DNA-Ligase ist zusätzlich auf die Anwesenheit von ATP im Puffer als Energiequelle angewiesen. Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µL durchgeführt. Vektor und DNA-Fragment sollten idealerweise in einem Verhältnis von 1:5 vorliegen. Dem Ligationsansatz wurden weiterhin 2 µL 10x Ligationspuffer und 1 µL T4-DNA-Ligase zugefügt und mit ddH₂O auf 20 µL aufgefüllt. Die Ligation erfolgte entweder für 3 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei RT.

3.1.9 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen nach Inoue *et al.* [140] wurde zunächst eine Vorkultur des Bakterienstammes in LB-Medium über Nacht inkubiert. Am Abend des Folgetages wurden in drei 1-Liter Kolben jeweils 200 mL SOB-Medium mit 1 mL, 2 mL bzw. 5 mL der Vorkultur angeimpft und bei 18 °C und 220 rpm inkubiert. Sobald eine Kultur eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht hatte wurde diese in 4 50 mL Falcon-Tubes überführt und 10 Minuten auf Eiswasser gekühlt. Die übrigen Kulturen wurden verworfen. Anschließend wurde die Kultur bei 2000 xg und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch Schwenken in 80 mL eiskaltem Inoue Transformationspuffer resuspendiert und die Kultur erneut bei 2000 xg und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 mL Inoue Transformationspuffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und mit 750 µL DMSO versetzt. Die Zellen wurden zügig zu 100 µL in 1.5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz wurde durch Transformation der Zellen mit 10 pg pUC-19 Kontrollvektor ermittelt.

3.1.10 Chemische Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde entsprechend der Hitzeschockmethode durchgeführt. Zellen, die aufgrund der Herstellung unter Verwendung entsprechender Puffer mit Hilfe bivalenter Kationen eine erhöhte Fähigkeit besitzen fremde DNA durch einen Hitzeschock aufzunehmen, wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Üblicherweise wurden 10 µL des Ligationsansatzes bzw. 0.5 – 1 µL präparierter DNA-Lösung eingesetzt. Zur Durchführung des Hitzeschocks wurden die Reaktionsgefäße dann direkt für 90 s in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt und anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 mL 2YT-Medium wurde die Bakteriensuspension zur Resistenzausbildung für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Abschließend wurden 200 µL des Ansatzes direkt auf LB-Agar-Platten, die mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

E. coli-Klone sind für einen Monat auf Agarplatten haltbar, wenn diese mit Parafilm verschlossen und invertiert bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur Langzeitlagerung wurde 0.7 mL *E. coli*-Kultur in einem 1.5 mL Mikroreaktionsgefäß mit 300 µL 86%-igem Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das *GeneJET™ Miniprep Kit II* (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Dieses beruht auf der Methode der alkalischen Lyse, wobei die Reinigung der Plasmid-DNA nicht durch Alkoholpräzipitation erfolgt, sondern mit Hilfe von Zentrifugationssäulen, die eine DNA-bindende Matrix enthalten. Nach Adsorption der DNA folgen mehrere Waschschrte sowie anschließende Elution mit sterilem ddH₂O, wobei die DNA von der Matrix durch Zentrifugation eluiert wird.

Zur Anzucht wurden 3-15 mL LB-Medium, versetzt mit geeigneten Antibiotika, mit einer Kolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstamms angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. 2 mL der Bakterienkultur wurden in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (12000 xg, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 250 µL eiskalter RNase-supplimentierter Resuspensionslösung resuspendiert. Anschließend wurden 250 µL Lysis-Lösung hinzugegeben und gevortext. Die Neutralisation des Lysats erfolgte durch Zugabe von 350 µL der Neutralisierungs-Lösung. Das Gefäß wurde gevortext bis ein weißes Präzipitat ausfiel und anschließend für 5 min bei 12000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zentrifugationssäule gegeben und für

1 min bei 12000 xg zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Danach wurde analog zweimal mit 500 µL Waschpuffer gewaschen und durch Zentrifugation bei 12000 xg für 1 min die Säule getrocknet. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte durch die Zugabe einer geeigneten Menge ddH₂O oder Elutionspuffer, Inkubation für 2 min und abschließende Zentrifugation für 2 min bei 12000 xg. Die Plasmid-DNA konnte direkt weiterverwendet bzw. bei -20 °C gelagert werden.

3.1.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA wurde photometrisch unter Nutzung des NanoDrop (peqLab Biotechnologie GmbH) vorgenommen und erfolgte unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Extinktionen bei 280 nm und 260 nm.

3.1.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Vektor-DNA wurde durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) mittels *cycle sequencing technology (dideoxy chain termination sequencing)* durchgeführt.

3.1.14 Klonierung von rekombinanter Bacmid-DNA

Der Sequenzbereiche des zu klonierenden Antikörper-Gens wurde unter Nutzung der oben beschriebenen Techniken in das Donorplasmid pFastBac Dual (Thermo Fischer Scientific) kloniert. Dieses besitzt einen Polyhedrinpromotor für die Expression der schweren Kette, einen p10-Promotor für die Expression der leichten Kette sowie einen Ampicillin-Selektionsmarker. Des Weiteren trägt das Plasmid für die spätere TN7-Transposition in die Bacmid-DNA von *E. coli* DH10 Bac vor und nach der *multiple cloning site* eine Transpositionsregion (TN7R und TN7L). Die Antikörper wurden mit einem C-terminalen fünfach-His-Tag jeweils am Ende der schweren Kette kloniert. Nach der Ligation wurden die Konstrukte zur Transformation des *E. coli*-Stamms XL1 blue verwendet, auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und der Transformations- bzw. Ligationserfolg durch eine PCR mit Vektor- und Gen-spezifischen Oligonukleotiden überprüft. Positive Klone wurden im Folgenden Schritt in *E. coli* DH10Bac retransformiert und auf mit Kanamycin- (50 µg/mL), Gentamycin- (7 µg/mL), Tetracyclin- (10 µg/mL), X-Gal- (100 µg/mL) und IPTG-versetzten (40 µg/mL) LB-Agar-Platten ausgestrichen. DH10Bac enthalten das Bacmid bMon14272, in welches über eine TN7-Transposon das in pFastBac Dual klonierte Konstrukt spezifisch über *attTN7*-Stellen transponiert wird. Eine Blau-Weiß-Selektion nach 72 h ermöglichte die

Identifizierung von positiven Transformanten. Zur Überprüfung der korrekten Insertion des klonierten Konstrukts in die Bacmid-DNA wurden von weißen Klonen mit geeigneten Oligonukleotiden *colony* PCRs durchgeführt. Anhand der Größe der erhaltenen PCR-Produkte wurde überprüft, ob es sich um rekombinante Bacmid-DNA handelte, welche den codierenden Sequenzbereich des klonierten Konstrukts enthielt.

3.1.15 Isolierung von Bacmid-DNA

Für die Isolierung von Bacmid-DNA wurde zuerst eine 3 mL Kultur mit 50 µg/mL Kanamycin eines entsprechenden *E. coli*-Klons angelegt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen der Über-Nacht-Kultur wurden durch Zentrifugation bei 4 °C, 4000 xg für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µL Resuspensionslösung des *GeneJET™ Miniprep Kit II* resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µL Lysispuffer wurde die Probe mehrfach invertiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 350 µL Neutralisationspuffer hinzugegeben, abermals invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 13300 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 750 µL Isopropanol versetzt und abermals 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 13300 rpm für 25 min bei RT zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µL 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 13300 xg für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wurden in 50 µL ddH₂O resuspendiert und schließlich die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank (Holten) absolviert.

3.2.1 Kultivieren und Passagieren von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden in einem Inkubator bei 27 °C und 95% Luftfeuchtigkeit in dem Kulturmedium *HyClone™ SFX-Insect™ Media* (GE Healthcare), welches mit 10 µg/mL Gentamycin supplementiert wurde, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in geeigneten Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter.

Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Entfernen des ursprünglichen Kulturmediums und anschließender Zugabe einer adäquaten Menge frischen Kulturmediums durch Abklopfen der

Methoden

Zellen. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und ein geeignetes Volumen in eine neue Kulturflasche mit Kulturmedium überführt. Das Kultivieren in Suspensions-Schüttelkultur erfolgte in dem selben Kulturmedium, welches zusätzlich mit 10 mL/L Pluronic F86 supplementiert wurde in Rollerflaschen aus Polystyrol mit Filterschraubverschluss (Greiner Bio-One) in Volumina von maximal 500 mL.

3.2.2 Kultivieren und Passagieren von RBL-SX38-Zellen

RBL-SX38-Zellen wurden in MEM-Medium, welches 15% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 µg/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin enthielt. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm² Gewebekulturflaschen in einem CO₂-Inkubator unter 5% CO₂-Begasung bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS pH 7.4 mit einer Lösung aus 2 mL Trypsin/EDTA durch 5 bis 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren nach Entfernen des überstehenden Kulturmediums. Anschließend wurden 10 mL frisches Kulturmedium zugegeben.

3.2.3 Kultivieren und Passagieren von HEK-293-Zellen

Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator unter 5% CO₂-Begasung bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit in mit 10% FKS, 100 µg/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin supplementiertem DMEM kultiviert. Für die Kultivierung der transfizierten HEK-Zellen wurde dem Medium zusätzlich als Selektionsmarker Zeocin in einer finalen Konzentration von 10 µg/mL zugefügt. Die Kultivierung erfolgte in einem Volumen von 10 mL 75 cm² Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter (Sarstedt).

Das Passagieren der Zellen erfolgte mit einer Lösung aus 2 mL Trypsin/EDTA durch 5 bis 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren nach Entfernen des überstehenden Kulturmediums. Die Zellsuspension wurde entfernt und die verbliebenen Zellen wurden sofort mit frischem Medium versetzt.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden von den suspendierten Zellen Aliquots von 10 µL entnommen und mit einer äquivalenten Menge Trypanblau und 20 µL ddH₂O vermischt. Zellen mit intakter Cytoplasmamembran nehmen den Farbstoff nicht auf, weil er die Membran nicht passieren kann. Tote und geschädigte Zellen sind hingegen durch einen blau gefärbten

Nukleus und Cytoplasma zu erkennen. Der Farbstoff erlaubt somit Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen. Die Bestimmung der nicht gefärbten Zellen erfolgte durch Auszählen von 16 Kleinquadraten in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich nach anschließender Multiplikation mit dem Faktor $4 \cdot 10^4$.

3.2.5 Kryokonservierung und Revitalisierung von Sf9-Zellen

Die Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl 5 Minuten bei 150 xg zentrifugiert und in 1 mL Kryomedium pro $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert. 1 mL Aliquots wurden mit 1 °C pro Minute auf -80°C gekühlt und bei -80 °C gelagert.

Zum Revitalisieren wurde ein Zellaliquot aufgetaut und in einer 75 cm² Gewebekulturflasche in 10 mL SFX-Insektenzellmedium aufgenommen. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen frisches ersetzt.

3.2.6 Expression von Proteinen in Sf9-Zellen

Die Expression von Hymenopterengiftallergenen sowie von Antikörpern in Insektenzellen erfolgte unter Nutzung des *Titerless-infection protocols* für die Baculovirus-medierte Infektion.

3.2.6.1 Transfektion von Sf9-Zellen

Antikörper wurden unter Nutzung des Bac to Bac Systems mit einem C-terminalen 10-fachen His-Tag exprimiert. Hierfür wurden in einer 25 cm² Gewebekulturflasche $1.5 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen ausgesät und für 30-60 Minuten adhären lassen. In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 6 µL Cellfectin™ II mit 100 µL SFX-Insektenzellmedium ohne Antibiotika durch Vortexen gemischt. In einem weiteren Mikroreaktionsgefäß wurden 5 µg Bacmid-DNA in demselben Volumen Medium gelöst und anschließend die Cellfectin™ II Lösung zugegeben und durch mehrmaliges Schwenken vermischt. Das Gemisch wurde 30-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit weiteren 800 µL Medium aufgefüllt. Das überstehende Medium wurde von den ausgesäten Sf9-Zellen abgenommen und das Transfektionsgemisch wurde vorsichtig zugegeben. Anschließend wurde für 4 Stunden bei 27 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert bevor durch Zugaben von Gentamycin-supplementiertem SFX-Insektenzellmedium auf 5 mL aufgefüllt wurde und für weitere 72 Stunden bei 27 °C inkubiert wurde. Der Überstand, welcher die rekombinanten Baculoviren (P1-Virusstock) enthielt, wurde abgenommen, 5 Minuten bei 500 xg zentrifugiert und unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Die Allergengene wurden in den Vektor pACgp67 B kloniert und enthielten N-terminal ein 10-fach His-Tag und darauf folgend das V5-Epitop zur einfachen Detektion. Dieser Vektor wurde gemeinsam mit linearisierter BaculoGold™-DNA kotransfiziert, wobei die Rekombination zwischen Transfer-Vektor und Virus-DNA in der Zelle stattfindet. Die Transfektion, wurde analog zu der oben beschriebenen mit 10 µL Cellfectin™ II durchgeführt. Anstelle der Bacmid-DNA wurden hier 1 µg Vektor-DNA zusammen mit 0.25 µg linearisierte Baculo-DNA eingesetzt. Alle folgenden Schritte wurden für beide Systeme analog durchgeführt.

3.2.6.2 Virusamplifikation und Herstellen von Baculovirus-infizierten Sf9-Zell-Kryostocks

In einer 175 cm² Gewebekulturflasche wurden $2.5 \cdot 10^7$ Sf9-Zellen ausgesät und für 30-60 Minuten adhären lassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 25 mL frisches SFX-Insektenzellmedium ersetzt. Die Zellen wurden mit 100-500 µL des P1-Virusstocks versetzt und 72 Stunden bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Klopfen abgelöst, die vitalen Zellen gezählt und die Zellsuspension dann für 5 Minuten bei 150 xg zentrifugiert. Der Überstand der Virusamplifikation wurde abgenommen und als High-Titer-Stock (P2-Virusstock) für eine mögliche weitere Amplifikationsrunde unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden in einer entsprechenden Menge Insektenzell-Kryomedium resuspendiert und jeweils 1 mL große Aliquots mit $1 \cdot 10^7$ Zellen eingefroren und bei -80 °C gelagert. Für eine Testexpression im kleinen Maßstab wurden außerdem jeweils 2 Aliquots mit 100 µL Volumen hergestellt.

3.2.6.3 Testexpression

In einer Six-well-Gewebekulturschale wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen in 2 mL SFX-Insektenzellmedium pro well ausgesät und für 30-60 Minuten adhären lassen. Ein 100 µL Aliquot des P2-Kryostocks wurde aufgetaut und in 5 mL SFX-Insektenzellmedium suspendiert. In die wells wurden 1, 10, 25, 50, 75 bzw. 100 µL dieser Zellsuspension gegeben und für 72 bis 96 Stunden bei 27 °C inkubiert. Der Überstand der Testexpression wurde anschließend auf Proteinexpression überprüft und die optimale Verdünnung der Kryostocks für eine Expression im großen Maßstab berechnet.

3.2.6.4 Expression von Proteinen im großen Maßstab

Die Expression von Proteinen im großen Maßstab wurde in Suspensionskultur unter Schütteln durchgeführt. Dafür wurden Sf9-Zellen auf eine Dichte von $1.5 \cdot 10^6$ verdünnt und in Volumina

von bis zu 500 mL in Gewebekulturflaschen überführt. Anschließend wurde ein Kryostock der Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen in 50 mL SFX-Medium suspendiert und zu einer entsprechenden Menge Sf9-Zell-Suspensionskultur gegeben und für 72 bis 96 Stunden bei 27 °C und 100 rpm inkubiert. Der Überstand wurde anschließend bei 4000 xg bei 4 °C zentrifugiert und das Protein daraus isoliert.

3.2.7. stabile Expression in HEK-293-Zellen

Für die Expression eines humanen IgE-Antikörpers in HEK-293 Zellen wurde eine bereits stabil transfizierte Zelllinie verwendet. Die adhärenenten HEK-293-Zellen aus einer 175 cm² Gewebekulturflasche wurde durch EDTA/Trypsin abgelöst und zu 500 mL DMEM mit 10% FKS, 100 µg/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin und 9 mL Pluronic F86 gegeben und in einer Rollerflasche (Greiner) auf einer Rollereinheit 14 Tage in einem CO₂-Inkubator unter 5% CO₂-Begasung bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

Die proteinbiochemischen Standardtechniken wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt.

3.3.1 Affinitätschromatografie mittels *kappaSelect*-Matrix

Die *kappaSelect*-Matrix (GE Healthcare) ist eine Affinitätsmatrix, welche auf einer stark verzweigten Agarose basiert und als Liganden kovalent verknüpfte *single domain* Antikörperfragmente mit Spezifität für humane leichte Ketten vom kappa-Typ trägt. Daher eignet sie sich für die Reinigung aller humaner Antikörper mit diesem Kettentyp. Für die Reinigung der rekombinanten IgE Antikörper über eine *kappaSelect*-Säule unter Nutzung des FPLC Systems ÄKTA-Start™ (GE Healthcare) wurde zunächst der Zellkulturüberstand mit 1 M Natronlauge auf pH 7.4 eingestellt, für 45 Minuten bei 4000 xg und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert. Nach Äquilibrierung einer 1 mL HiTrap *KappaSelect*-Säule durch 10 mL PBS, pH 7.4 mit einer Flussrate von 0.5 mL/min wurde der Kulturüberstand ebenfalls mit einer Flussrate von 0.5 mL/min über die Säule geleitet. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 10-50 mL PBS gewaschen, um nicht selektiv bindendes Protein zu entfernen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von je 1 mL mit

0.1 M Glycinpuffer pH 3 als Eluent mit einem Gradienten bis 100%. Die Elutionsfraktionen wurden sofort durch Zugabe von 1 M Tris-Puffer pH 7.5 neutralisiert.

3.3.2 Immobilized Metallion Affinity Chromatography (IMAC)

Zur Reinigung von Proteinen in Kulturüberständen wurde eine IMAC unter Nutzung des FPLC Systems ÄKTA-Start™ (GE Healthcare) durchgeführt. Dazu wurden die gesammelten Kulturüberstände zunächst mit 1 M Natronlauge auf pH 8 eingestellt, zum Entfernen zellulärer Bestandteile 45 Minuten bei 4000 xg und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert. Nach Äquilibration einer Ni-Sepharose His Trap excel 1mL-Säule durch 10 mL PBS, pH 8 mit einer Flussrate von 1 mL/min wurde der Kulturüberstand ebenfalls mit einer Flussrate von 1 mL/min über die Säule geleitet. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 10-50 mL PBS und anschließend mit 2.5 und ggf 7.5% 300 mM Imidazol gewaschen, um nicht selektiv bindendes Protein zu entfernen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von je 1.5 mL mit einem Gradienten bis 300 mM Imidazol in PBS. Gegebenenfalls wurde der Kulturüberstand vor der IMAC einer Tangentialflussfiltration unterzogen, um das Volumen zu verkleinern und den Puffer auszutauschen. Dafür wurde der Überstand mit Hilfe einer Cross Flow einer Tangentialflussfiltration unterzogen und so auf ein Volumen von etwa 250 mL eingeeengt und mit demselben Volumen PBS aufgefüllt. Dies wurde dreimal wiederholt, bevor auf das finale Volumen von 200 bis 500 mL eingeeengt wurde.

3.3.3 Kationenaustauschchromatographie

Für die SAXS-Messungen wurde der rekombinante IgE nach der IMAC zusätzlich durch Kationenaustauschchromatographie und darauf folgende Gelfiltration gereinigt.

Die Ionenaustauschchromatographie erlaubt die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Ladung. Für die Kationenaustauschchromatographie wird eine Matrix mit negativer Ladung verwendet, welche kationische Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen bindet. Hierfür muss der pH-Wert für die Reinigung so gewählt werden, dass er deutlich unter dem pI des Zielproteins liegt, um dessen ausreichende Protonierung zu gewährleisten. Die Elution erfolgt mit hohen Salzkonzentrationen, da so die Interaktion zwischen Matrix und Protein verhindert wird.

Eine 1 mL MonoS-Säule (GE Healthcare) wurde mit 10 mL Laufpuffer (20 mM Natriumacetat, pH 5.0) äquilibriert, bevor die in Laufpuffer 1:5 verdünnten Fraktionen des Antikörpers aus der IMAC mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule geladen wurden. Die Elution erfolgte mit

einem Gradienten von 5-60% Elutionspuffer (500 mM Natriumchlorid, 20 mM Natriumacetat, pH 5.0) in 0.5 mL Fraktionen.

3.3.4 Gelfiltration

Die Gelfiltration erlaubt die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Molekülgröße und wurde daher als abschließender Schritt in der Reinigung vor der SAXS-Messung durchgeführt, um aggregierte IgE-Moleküle abzutrennen.

Hierfür wurden die entsprechenden Fraktionen aus der Kationenaustauschchromatographie vereinigt und mit einer 10000 MWCO VivaSpin Einheit (GE Healthcare) auf ein Volumen von 0.5 mL eingengt. Eine 24 mL Superdex200-Säule (GE Healthcare) wurde mit 25 mL Laufpuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5) äquibriert, bevor die Probe aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte durch 25 mL Laufpuffer bei einer Flussrate von 0.5 mL/min.

3.3.5 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 ermöglicht es, Proteine nach der Auftrennung direkt im Gel anzufärben. Gleichzeitig werden die Proteine im Gel fixiert und denaturiert. Es wird eine Nachweisempfindlichkeit von 0.1-1 µg pro Bande erreicht. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30 bis 60 Minuten in eine Schale mit Coomassie-Färbelösung überführt. Zur Entfärbung der Gele erfolgte eine ca. zweistündige Inkubation in einer Entfärbelösung, wobei die Entfärbelösung mehrfach ersetzt wurde.

3.3.6 Elektrophoretischer Proteintransfer (Western-Blot)

Mittels Western-Blot lassen sich Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf einer polymeren proteinbindenden Membran immobilisieren und stehen somit weiteren Anwendungen wie z.B. Sequenzierung oder *Immunprinting* zur Verfügung.

Es wurde nach dem Prinzip des Semi-Dry Blottens gearbeitet. Das zu blottende Gel wurde zusammen mit einer in Transferpuffer äquilibrierten Nitrocellulose-Membran einer konstanten Stromstärke ausgesetzt ($\text{Gesamtstromstärke [I]} = \text{Gelfläche [cm}^2\text{]} \cdot \text{Anzahl der Gele} \cdot 0.8 \text{ mA}$). Auf der unteren Elektrode der Blot-Einheit wurde zuerst ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier, dann die Membran, das SDS-Gel und schließlich eine weitere Lage Filterpapier luftblasenfrei gestapelt. Durch Auflegen der zweiten Elektrode und des Abschlussdeckels wurde die Apparatur geschlossen und eine entsprechende Stromstärke von 80 mA/Blot für 90 bis 120 Minuten angelegt.

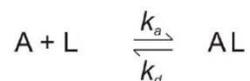
3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Biosensormessungen

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) wird in der Immunologie angewendet, um Bindungsmodi und -kinetik im Besonderen die Affinität von Antikörpern und Antigenen zu bestimmen. Es handelt sich hierbei um eine Biosensortechnik, bei der Biomoleküle wie Proteine auf einer Goldoberfläche einer Miniaturflusszelle eines Sensorchips immobilisiert werden, um die Interaktion mit einem zweiten Molekül in der mobilen Phase über den Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz in Echtzeit zu beobachten. Die Kopplung von Proteinen an den Sensorchip geschieht meist über eine Schicht von Carboxymethyldextran, deren Carboxylgruppen durch EDC/NHS (N-Ethyl-N'-Dimethyl-aminopropyl)-Carboimid / N-Hydroxysuccinimid) aktiviert wurden und dann mit den freien Aminogruppen der Lysinreste eines Proteins kovalent über eine Amidbindung verknüpft werden. Die auf der festen Phase immobilisierten Moleküle werden hierbei als Ligand bezeichnet. Durch den quantenmechanischen Effekt der Evaneszenz dringen Lichtwellen, welche in einem bestimmten Winkel - dem SPR-Winkel - auf die Oberfläche treffen, in die Goldschicht ein und regen dort Elektronen zur Oszillation an, sodass das einfallende Licht komplett absorbiert wird. Dieser Vorgang wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet. Die Intensität des reflektierten Lichts ist dabei negativ abhängig von der Oberflächenplasmonenresonanz. Die Bindung von Molekülen auf der Goldoberfläche verändert deren Brechungsindex und beeinflusst daher auch den SPR-Winkel linear zur gebundenen Masse. Die Bindung von 1 ng Protein auf einer Fläche von 1 mm² hat eine Änderung des SPR-Winkels um etwa 0.1 ° zur Folge, was in dieser Methode als 1000 RU (*response units*) angegeben wird. Der Interaktionspartner für den Liganden wird als mobile Phase durch die Flusszelle über die Oberfläche geleitet und als Analyt bezeichnet. Die Änderung des SPR-Winkels während der Assoziations- und Dissoziationsprozesse wird dabei zeitabhängig gemessen, sodass eine Analyse der Bindungskinetik zwischen Analyt und Ligand möglich ist. Die Darstellung erfolgt als Sensogramm, in dem die Masse des gebundenen Analyten als RU gegen die Zeit aufgetragen ist.

3.4.1.1 Kinetische Grundlagen des Bindungsmodells

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



Erhöht sich die Konzentration des Analyten [A], nimmt auch die Konzentration des Komplexes [AL] zu; da die Konzentration des Liganden [L] jedoch begrenzt ist, wird nach einer gewissen Menge [A] keine weitere Konzentrationssteigerung des Komplexes erreicht. Dieser Zustand wird als Sättigung bezeichnet und beschreibt ein dynamisches Gleichgewicht, in dem Assoziation und Dissoziation des Analyten gleich groß sind. Im Sensogramm ist dieses Gleichgewicht gekennzeichnet durch das Erreichen eines Plateaus aller Kurven. Das Verhältnis zwischen der Konzentration des Komplexes [AL] und der des freien Analyten [A] kann in diesem Fall durch eine Langmuirsche Adsorptionsisotherme beschrieben werden. Für die Bindungskurve werden die RU-Werte gegen [A] aufgetragen und es kann eine Kurvenanpassung nach $RU = RU_{\max} [A] / (K_D + [A])$ erfolgen und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D (häufig als Affinität angegeben) berechnet werden. Diese Berechnung des K_D erfordert jedoch das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes oder *steady state* und bezieht kinetische Parameter nicht mit ein.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Affinität kann durch Verfolgung der Bindungskinetik und der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation (K_a und K_d bzw. K_{on} und K_{off}). Der Quotient K_a / K_d liefert ebenfalls die Bindungskonstante K_D . In dem Sensogramm können die zeitabhängigen Parameter für Assoziation und Dissoziation enthalten. Für eine kinetische Analyse werden Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten durchgeführt und eine Kurvenanpassung an die Adsorptionsisotherme nach Langmuir vorgenommen, sodass die Werte für K_a und K_d erhalten werden und so K_D berechnet werden kann. Außerdem kann eine Charakterisierung von Assoziations- und Dissoziationsverhalten vorgenommen werden.

In dieser Arbeit wurde für die Auswertung der erhaltenen Daten näherungsweise von dem oben beschriebenen 1:1 Bindungsmodell ausgegangen.

3.4.1.2 Immobilisierung der Liganden

Für die Bindungsanalysen wurde auf jeweils einer Messflusszelle die verschiedenen Glykoproteine immobilisiert, sowie als Negativkontrolle zur Detektion von unspezifischer Bindung auf einer Referenzflusszelle Humanes Serum Albumin (HSA).

Die SPR-Messungen wurden auf einem *Biacore* T200-Biosensor durchgeführt, wobei die Immobilisierung der Liganden mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ erfolgte. Als Laufpuffer diente PBS. Alle Lösungen wurden unmittelbar vor der Verwendung durch einen Filter mit der

Porengröße 0.2 μm filtriert. Die Carboxylgruppen der Oberfläche eines CM5-Chips (GE Healthcare) wurden durch Injektion von EDC/NHS 480 s aktiviert. Hierfür wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Aliquots 0.4 M EDC und 0.1 M NHS aufgetaut und unmittelbar vor der Injektion vermischt. Anschließend wurde das zu immobilisierende Protein in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 4.5) auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verdünnt. Die Lösungen wurden für 50 bis 120 s über den Chip geleitet und der Vorgang gegebenenfalls wiederholt, um eine höhere Belegung des Chips zu erreichen. Es wurden HSA, MuxF³-HSA und HRP kovalent mit insgesamt 994, 1022 bzw. 506 RU verknüpft. Um noch freie aktivierte Carboxylgruppen zu blockieren, wurde durch Injektion von Ethanolamin für 420 s ein *Capping* durchgeführt.

3.4.1.3 Bindungsanalysen mit rekombinantem humanem IgE-Antikörper

Zur Ermittlung des optimalen Konzentrationsbereichs des Antikörpers wurden zunächst initiale Bindungsanalysen ausgeführt, wobei die Bindungskurve idealerweise 100 RU nicht überschreiten, jedoch auch nicht zu flach verlaufen sollte. Der Antikörper wurde hierfür in PBS verdünnt und die Lösungen für jeweils 120 s injiziert. Anschließend wurden die Regenerationsbedingungen evaluiert, um einen geeigneten Regenerationspuffer zu ermitteln. Dieser sollte die sofortige und komplette Dissoziation des Analyten bewirken ohne den Liganden zu beeinträchtigen, um die Reproduzierbarkeit der Bindungskurve zu gewährleisten. Der humane IgE-Antikörper wurde in PBS in Konzentrationen zwischen 0.4525 und 277.8 nM eingesetzt und jeweils mit einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Die Assoziationsphase wurde für 840 s aufgezeichnet, die Dissoziation für 600 s. Die Sensoroberfläche wurde nach jedem Zyklus durch Injektion von 1 M Tris-Puffer pH 11 und folgender Injektion von 0.1 M Essigsäure pH 1 regeneriert. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D wurde unter Verwendung der *Biacore* T200 Auswertungssoftware durchgeführt.

3.4.2 Massenspektrometrische Analyse von Glykopeptiden

Für die massenspektrometrische Analyse wurde der rekombinante IgE-Antikörper reduziert und über 1-D SDS-PAGE (10% Tris-Glycin) aufgetrennt und die der schweren Kette entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in 20% Essigsäure gelagert. Die schwere Kette wurde anschließend mit Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K nach Anweisung des Herstellers proteolytisch gespalten und die Proben getrocknet. In einem Teil der Proben wurden die Glykopeptide mittels HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*) angereichert wie zuvor beschrieben [141]. Für die übrigen Proben wurden

die Glykopeptide auf eine selber gepackte Säule mit POROS 20 R2 Matrix gegeben und mit 10 μL 1% Trifluoressigsäure gewaschen. Die über HILIC angereicherten Glykopeptide wurden mit 0.8 μL 2% Ameisensäure auf ein MALDI *sample target* eluiert, welches bereits mit Matrix-Puffer beladen war (1 μL 0.4% rekristallisierte α -Cyano-4-hydroxymizsäure in 70% Acetonitril und 0.1% Trifluoressigsäure). Die über R2 angereicherten Peptide wurden direkt mit Matrix-Puffer auf die MALDI *sample targets* eluiert.

Die Peptidmassenspektren wurden mittels MALDI-MS an einem 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyser (Thermo Fischer Scientific) im positiven Ionen Reflektor Modus mit verschiedenen Laserintensitäten aufgenommen, um optimale Spektren für jede Probe zu erhalten. Die Spektren wurden anschließend manuell ausgewertet.

Die Praktische Durchführung der Massenspektrometrie wurde von Andrea Lorentzen am Department of Biochemistry and Molecular Biology der University of Southern Denmark in Odense übernommen.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Enzyme-linked immunosorbent-Assay (ELISA)

Zur Analyse der Reaktivitäten der exprimierten Proteine wurden je 20-50 μL einer Antigenlösung (50-100 ng/ μL) in Vertiefungen einer 384-well ELISA-Mikrotiterplatte (Greiner) über Nacht bei 4 °C oder für mindestens 2 Stunden bei RT an die Plattenoberfläche gebunden. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend freie Bindungsstellen der Polystyroloberfläche für 45 Minuten bei RT mit 110 μL 4% Milchpulver-PBS (MPBS) blockiert. Es wurde dreimal mit TPBS und anschließend dreimal mit PBS gewaschen und je 100 μL der Primärantikörper-Lösung in die Vertiefungen gegeben und bei RT unter leichtem Schütteln für 2 Stunden bei RT inkubiert. Handelte es sich bei der Primärantikörperlösung um Kulturüberstände, wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde je dreimal mit TPBS und PBS gewaschen und falls nötig im nächsten Schritt 100 μL des Alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelten Sekundärantikörpers in adäquater Verdünnung in 2% MPBS für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem je dreimaligem Waschen mit TPBS und PBS wurde der ELISA mit 50 μL der AP-Detektionslösung, welche aus 5 mg/mL pNPP in AP-Detektionspuffer pH 9.0 bestand, entwickelt. Die Farbentwicklung wurde im Abstand von 5-15 Minuten photometrisch bei 405 nm bestimmt.

3.5.2 Glykananalyse mittels Lektin-ELISA

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, die spezifisch Karbohydratstrukturen erkennen. In dieser Arbeit wurden sie daher im ELISA eingesetzt, um das Glykosylierungsmuster des rekombinant exprimierten IgE-Antikörper zu analysieren.

Für die Glykananalyse mittels Lektinen im ELISA wurden je 50 µL der zu analysierenden Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/mL in PBS sowie das nicht glykosylierte Kontrollprotein MBP (*maltose binding protein*) bei 4 °C über Nacht an die Oberfläche einer 384-well ELISA-Mikrotiterplatte (Greiner) gebunden. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit jeweils 120 µL *Carbo-Free Blocking Solution* (Vectorlabs) für 30 Minuten blockiert. Die biotinylierten Lektine AAL (*Aleuria aurantia* Lektin) und GNA (*Galanthus nivalis* Lektin) wurden in einer Konzentration von 10 µg/mL in PBS eingesetzt und ExtrAvidin-AP wurde den Lektinlösungen in einer 1:20000 Verdünnung zugesetzt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µL der Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach jeweils viermaligem Waschen mit TPBS und PBS wurden je 50 µL der AP-Detektionslösung (5 mg/mL pNPP in AP-Detektionspuffer pH 9.0) zugegeben. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 405 nm.

3.5.3 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von Antikörpern

Konzentrationen von IgE-Antikörpern in Zellkulturüberständen und Reinigungsfractionen wurden mit dem ELISA *QuantitationSet* (Bethyl) ermittelt. Hierbei werden Antikörper durch einen Sandwich-ELISA detektiert und können so unabhängig von Antigen und Affinität quantifiziert werden. Zusätzlich zu den Proben, wird eine Standardreihe eines IgE bekannter Konzentration vermessen. Die Extinktion wird dann gegen die Konzentration aufgetragen und durch Kurvenanpassung eine Standardkurve erhalten, unter Verwendung derer die Konzentration der vermessenen Antikörper-Lösungen bestimmt werden.

100 µL des Fänger anti-IgE-Antikörpers wurde in 50 mM Carbonatpuffer pH 9.6 in einer 1:100 Verdünnung in die Vertiefungen einer 384-well-ELISA-Mikrotiterplatte gegeben und eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und fünfmal mit der Quantifizierungs-Waschlösung gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit je 100 µL Quantifizierungs-Blockierungspuffer für 30 Minuten bei RT belegt. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurden jeweils 50 µL von 7 seriellen 1:2 Verdünnungen des IgE-Standards und der zu vermessenden Proben in die Vertiefungen gegeben und erneut für eine Stunde bei RT inkubiert. Der IgE-Standard wurde dabei in Konzentrationen zwischen 15.6 und 1000 ng/mL eingesetzt und die Proben so verdünnt, dass

die angenommenen Konzentrationen sich ebenfalls in diesem Bereich befanden. Anschließend wurde wieder fünfmal gewaschen und jeweils 50 µL des HRP-gekoppelten Detektionsantikörpers in einer 1:75000 Verdünnung in die Vertiefungen gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte nach fünfmaligem Waschen mit je 50 µL der HRP-Detektionslösung in Intervallen von 5 Minuten photometrisch bei 405 nm. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Die Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Origin durchgeführt, indem zunächst die Standardkurve durch Vier-Parameter-Kurvenanpassung erstellt wurde. Die Berechnung der Probenkonzentration erfolgte mathematisch unter Verwendung von jeweils vier Verdünnungen des vermessenen Antikörpers, welche sich im linearen Bereich der Standardkurve befanden.

3.5.4 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (*immunprinting*)

Nach erfolgtem elektrophoretischem Transfer wurde die Membran für mindestens 30 Minuten in 4% MPBS bei RT inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach wurde sie in eine 2%-ige MPBS-Lösung, die den Primärantikörper in geeigneter Konzentration enthielt überführt und für mindestens 120 Minuten bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde nachfolgend dreimal unter Schwenken für je 3 Minuten mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einer geeigneten Verdünnung eines Sekundärantikörper-AP-Konjugats in 2% MPBS für 60 Minuten bei RT unter Schwenken inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde auf die Membran eine Färbelösung aus 10 mL AP-Detektionspuffer, 125 µL NBT-Stocklösung und 125 µL x-Phos (0,5%) gegeben. Die Färbung wurde unter Lichtausschluss durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit Wasser gewaschen an der Luft getrocknet.

3.5.5 EUROLIne Assay

Der EUROLIne Assay (Euroimmun, Lübeck) wurde nach Angaben des Herstellers von Dr. Henning Seismann von der Firma Euroimmun durchgeführt. Für die hier gezeigten Analysen wurde ein Prototyp Teststreifen des EUROLIne Assays verwendet, welcher neben einem Indikator und einem CCD-Marker mit Giftextrakten von *Polistes dominula* (i77) und *Vespula vulgaris* (i3) sowie den Allergenen Pol d 1, Pol d 4, Pol d 5, Ves v 1 und Ves v 5 beschichtet war. Pol d 4 sowie beide Antigene 5 wurden wie oben beschrieben in Sf9-Zellen exprimiert, wobei die Phospholipasen A1 nach firmeninternem Protokoll im Hause Euroimmun in *E. coli*

Methoden

exprimiert und anschließend nach Lösen und Rückfalten aus *Inclusion bodies* gereinigt wurden.

Vor Inkubation mit den humanen Seren wurden die Teststreifen 5 Minuten unter Schwenken in 1 mL Universalpuffer equilibriert. Die Probeninkubation erfolgte in einem Volumen von 400 μ L für 60 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 mL Universalpuffer für 5 Minuten unter Schwenken wurde 1 mL eines anti-human IgE AP-Antikörperkonjugats für 60 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde 1 mL einer AP-Substratlösung für 10 Minuten inkubiert und anschließend die Reaktion durch Entfernen der Substratlösung und dreimaliges Waschen mit je 1 mL destilliertem Wasser abgebrochen. Der Teststreifen wurde an der Luft getrocknet und anschließend die Bandenintensität mit der EUROLineScan Software ausgewertet.

Für die Ermittlung der relativen Antikörperaffinitäten für Pol d 5 und Ves v 5 wurden die Teststreifen nach Inkubation mit den Seren mit einem chaotropen Reagenz behandelt, um Antikörper niedriger Affinität zu entfernen. Anschließend wurden die Bandenintensitäten von behandelten und unbehandelten Teststreifen verglichen.

3.5.6 ImmunoCAP

Die ImmunoCAP Messungen wurden nach Anweisungen des Herstellers an einem Phadia 250 Gerät (Thermo Fischer Scientific, USA) in der Gruppe von Prof. Thilo Jakob am Universitätsklinikum Freiburg durchgeführt.

3.5.7 *enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding* (ELIFAB)

Der *enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding* assay (ELIFAB) ist eine ELISA-basierte Methode, mit der inhibitorische Effekte spezifische IgG₄-Titer in Patientenseren nach einer spezifischen Immuntherapie (SIT) ermittelt werden können. Im Laufe einer SIT steigen allergenspezifische IgG₄-Titer in der Regel an und kompetieren mit spezifischen IgE um die Antigenbindung, sodass die allergische Reaktion abgeschwächt oder verhindert werden kann. Daher kann mit diesem Assay der Erfolg einer SIT beurteilt werden. Bei dem ELIFAB handelt es sich um eine Modifikation des zellulären FAB-Assays (*facilitated antigen binding*) [142].

Für den ELIFAB-Assay wird zunächst monomeres sCD23 auf eine ELISA-Mikrotiterplatte gebunden. Ein Indikatorserum, welches von einem atopischen Patienten mit hohem spezifischen IgE-Titer stammt, wird mit dem Testserum eines Patienten nach SIT und dem Antigen vorinkubiert. Gleichzeitig wird das Indikatorserum mit dem Allergen alleine

vorinkubiert, was als Messstandard dient. Diese Proben werden dann in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben, wobei IgE-Allergen-Komplexe an CD23 binden, nicht jedoch monomeres IgE. Die IgG₄-Antikörper aus dem Testserum inhibieren die Komplexbildung, sodass das gemessene Signal dadurch umgekehrt proportional zu den IgG₄-Titern des SIT-Patienten verringert wird.

In dieser Arbeit wurde anstelle des humanen Indikatorserums Sf9-Zell-exprimierter rekombinanter humaner IgE verwendet. Das Protokoll wurde entsprechend dem von Shamji *et al.* veröffentlichten angepasst [142].

Hierfür wurden 20 µL rIgE (10-100 µg/mL) für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ mit 5 µL HRP (1-35.7 µg/mL) in 20 µL RPMI-Medium vorinkubiert, um die IgE-Antigen-Komplexe zu bilden. Um die Inhibition des *facilitated antigen binding* zu ermitteln wurden 20 µL der Probe entweder mit 20 µL Indikatorserum oder 20 µL Mediumkontrolle gemischt. Eine 96-well-ELISA-Mikrotiterplatte (R&D Systems) wurde mit 50 µL einer sCD23-Lösung (12.5 µg/mL) in PBS belegt, indem über Nacht bei RT inkubiert wurde. Die freien Proteinbindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation bei 37 °C mit 200 µL 1% BSA in PBS nach zweimaligem Waschen mit TPBS belegt. Anschließend wurde dreimal gewaschen und die vorinkubierten Proben in die Vertiefungen der ELISA-Mikrotiterplatte transferiert. Die Mikrotiterplatte wurde viermal gewaschen bevor 100 µL eines Biotin-gekoppelten anti-human-IgE in einer 1:1000 Verdünnung in 1% BSA/PBS in die Vertiefungen gegeben wurde und eine Stunde bei RT und unter Schütteln inkubiert wurde. Die Mikrotiterplatte wurde erneut fünfmal gewaschen und 100 µL einer 1:1000 Verdünnung von Streptavidin Peroxidase in 1% BSA/PBS für 30 Minuten bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach sechsmaligem Waschen mit 100 µL der TMB-Substratlösung, welche in die Vertiefungen gegeben wurde, 10 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert wurde und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 50 µL 1.8 M Schwefelsäure abgebrochen wurde. Die Detektion erfolgte bei 405 nm. Die Inhibition des *facilitated antigen binding* wurde berechnet indem die Extinktion der Probenmessung ohne Testserum als 100% angenommen wird.

Die praktische Durchführung des ELIFAB-Assays wurde von Dr. Christian Möbs und PD Dr. med. Wolfgang Pfützner im Institut für Klinische und Experimentelle Allergologie der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

3.5.8 Degranulationsassay mit humanisierten RBL-SX38-Zellen

Für die Degranulationsanalysen wurden die RBL-SX38-Zellen einer 75 cm² Gewebekulturflasche nach zwei Waschschritten mit PBS pH 7.4 trypsiniert und in 10 mL

Methoden

Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 100 xg zentrifugiert und in 5 mL Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Zellzahl von $5 \cdot 10^5/\text{mL}$ eingestellt und je 200 μL der Zellsuspension in eine Vertiefung einer sterilen 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wurde über Nacht in einem CO_2 -Inkubator unter 5% CO_2 -Begasung bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurde das überstehende Kulturmedium abgenommen. Die eingesetzten IgE-Antikörper wurden in Tyrode's complete-Puffer auf die jeweilige Konzentration verdünnt und 100 μL davon zu den Zellen gegeben und erneut für 60 Minuten wie zuvor inkubiert. Anschließend wurden die Antikörperlösungen abgenommen und viermal mit je 200 μL Tyrode's incomplete-Puffer vorsichtig gewaschen. Je 100 μL des Quervernetzungsagens in Tyrode's complete-Puffer wurden zugegeben und erneut für 60 Minuten wie beschrieben inkubiert. In die Vertiefungen einer nicht sterilen 96-well Mikrotiterplatte wurden jeweils 12.5 μL 8 mM pNAG-Substratlösung vorgelegt und jeweils 30 μL des Überstandes aus der ersten Mikrotiterplatte zugegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert (Überstand 1). Der restliche Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden erneut viermalig gewaschen und anschließend zur kompletten Lyse mit je 100 μL Tyrode's complete-Puffer mit 0.1% Triton X versetzt und ebenfalls 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden auch von diesem Überstand je 30 μL zu 12.5 μL pNAG-Substratlösung gegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert (Überstand 2). Die Umsetzung des Substrats durch die von den Zellen freigesetzte β -Hexosaminidase wurde jeweils nach 60 Minuten durch Zugabe von 50 μL Carbonatpuffer abgebrochen. Die Detektion des chromogenen Produkts erfolgte photometrisch bei 405 nm. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Die Auswertung erfolgte, indem die Extinktionswerte jeder Messung von Überstand 1 und 2 addiert und als 100% definiert wurden. Die Degranulation wurde dabei als der prozentuale Teil errechnet, der allein durch die Quervernetzung induziert wurde (Überstand 1).

3.6 Biophysikalische Methoden

3.6.1 *Small angle X-ray scattering* (SAXS)

Small angle X-ray scattering (SAXS) ist eine Methode der Strukturbiologie, die es erlaubt biologische Makromoleküle in Lösung strukturell zu charakterisieren. Im Gegensatz zu kristallographischen Ansätzen werden die Moleküle unter nahezu physiologischen Bedingungen vermessen und strukturelle Einschränkungen durch das Kristallgitter werden

vermieden. Jedoch lassen SAXS-Analysen aufgrund der zufälligen Orientierung der Moleküle in Lösung, anders als kristallographische oder NMR-basierte Methoden, keine atomare Auflösung zu. Mit Hilfe von *ab initio* Methoden können jedoch präzise Informationen über Form und Größe von Molekülen in Lösung erhalten werden.

Das Grundprinzip der Methode ist die Messung der gestreuten Röntgenstrahlung, die auf die in Lösung befindlichen Moleküle trifft. Hierbei gilt für die Messung monodisperser Partikel

$$I(s) = nP(s)S(s)$$

Wobei n die numerische Dichte der Partikel, $P(s)$ der Formfaktor, welcher abhängig von Größe und Form der streuenden Partikel ist, und $S(s)$ der Strukturfaktor ist, welche Effekte beschreibt, welche sich aus Interferenz der Streuung interagierender Partikeln ergeben. In verdünnten Lösungen kann $S(s)$ vernachlässigt werden. In der Regel kann bei Konzentrationen <5 mg/mL von verdünnten Lösungen ausgegangen werden, jedoch ist dies abhängig von Größe, Ladung und Ionenstärke des streuenden Moleküls. Daher sollte immer eine Serie von Konzentrationen (c , $c/2$ und $c/4$) gemessen werden, um Konzentrationseffekte ausschließen zu können.

3.6.1.1 Aufnahme der SAXS-Daten

Der humane IgE wurde über aufeinanderfolgende IMAC, Kationenaustauschchromatographie und Gelfiltration gereinigt, um eine monodisperse Lösung zu erhalten. Die Proben wurden in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5) vermessen. Die SAXS-Daten wurden mittels eines optimierten Prototypen der kommerziell erhältlichen *three-pinhole* NanoSTAR Kamera (Bruker AXS) aufgenommen [143]. Das Instrument verwendet eine Drehanode als Röntgenquelle und Göbelspiegel, um den Strahl zu monochromatisieren. Der divergente Strahl wird durch die Spiegel reflektiert und so parallelisiert. Die Distanz zwischen Probe und Detektor beträgt 65 cm und das Instrument deckt Streuvektor-Moduli s von $0.008 - 0.33 \text{ \AA}^{-1}$ ab. Der s -Wert ist dabei definiert als

$$s = 4\pi \frac{\sin(\theta)}{\lambda}$$

Wobei 2θ der Winkel zwischen eintreffendem und gestreutem Strahl und λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ist. Ein semitransparenter *beam stop* mit einem Durchmesser vom 3.0 mm wurde verwendet, was eine akkurate Normalisierung und Hintergrundsubtraktion erlaubte. Die Proben wurden in wiederverwendbare Quarzkapillaren (Durchmesser ~ 1.7 mm) gegeben, welche während der gesamten Messung mit einem Peltier Element auf $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt wurden. Es wurden Konzentrationen von 5.4 mg/mL, 2.7 mg/mL und 1.35 mg/mL jeweils in

einem Volumen von 40 μL vermessen. Der Strahldurchmesser bei Eintreffen auf die Probe betrug 1.0 mm.

Eine Messung von HEPES-Puffer wurde für die Hintergrundsubtraktion verwendet. Die Software SUPERSAXS wurde zur Hintergrundsubtraktion sowie für alle notwendigen Normalisierungen eingesetzt. Die Daten wurden an einer absoluten Skala mit einer Probe von ddH_2O als Primärstandard normalisiert.

3.6.1.2 *ab initio* Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Model-unabhängige *ab initio* Analysen der erhaltenen SAXS-Daten durchgeführt. Hierfür werden durch verschiedene mathematische Operationen und graphische Auftragungen die Daten interpretiert, sodass verschiedene Eigenschaften des Proteins extrahiert werden können. Durch Auftragung der logarithmischen Streuintensität gegen den quadratischen Streuvektor wird der Guinier Plot erhalten, aus dessen Steigung direkt der Streumasseradius berechnet werden kann. Außerdem gibt die Linearität des Guinier Plots Auskunft über die Monodispersität der Probe und lässt so Aussagen über die Qualität der Probe zu [144].

Die indirekte Fourier Transformation (IFT) der Streudaten ergibt die Paar-Abstands-Verteilungs-Funktion $p(r)$, welche in verdünnten monodispersen Lösungen ein Histogramm der Abstände zwischen Paaren von einzelnen Punkten innerhalb des streuenden Partikels ist. Bei der IFT handelt es sich um eine numerische Methode zum gleichzeitigen *smoothing*, *desmearing* und der Fourier Transformation von SAXS-Daten, die praktisch keine Extrapolation der Daten voraussetzt [145]. Die Streuintensität kann angegeben werden als:

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) \frac{\sin sr}{sr} d(r)$$

Wobei D_{\max} die maximale Dimension des streuenden Partikels ist. D_{\max} kann, wenn notwendig, manuell mittels *a priori* Informationen an die vorhergesagte Molekülgröße angepasst werden, worauf hier allerdings verzichtet wurde. Die Paar-Abstands-Verteilungs-Funktion $p(r)$ ist hierbei gegeben als Serie von Basisfunktionen:

$$p(r) = \sum_{i=1}^M c_i \Phi_i(r) \quad \text{für } 0 \leq r \leq D_{\max}$$

Wobei $\phi_i(r)$ kubische *b-splines*, c_i der Expansionskoeffizient und M die Anzahl der *b-splines* und Expansionskoeffizienten ist. Die $p(r)$ -Funktion gibt Aufschluss über Größe und Form des vermessenen Proteins, sowie über die Größenverteilung.

Der Kratky Plot ist die Auftragung von $I(s)s^2$ gegen s . Anhand des Kurvenverlaufs - speziell bei mittleren und großen s -Werten - kann zuverlässig die Flexibilität des Moleküls vorhergesagt werden [146]. Ein Kurvenanstieg in diesem Bereich indiziert ein flexibles Molekül, während ein Plateau rigide Molekülstrukturen vorhersagt.

Alle Berechnungen wurden für die höchste vermessene Proteinkonzentration von 5.4 mg/mL durchgeführt

4. Ergebnisse

4.1 Reaktivitätsanalyse von Seren humaner Hymenoptereingiftallergiker mit Komponenten aus den Giften von *Vespula vulgaris* und *Polistes dominula*

Für die komponentenaufgelöste Diagnostik zur besseren Abgrenzung der Feldwespenallergie von Allergien gegen andere Hymenopterenarten im Speziellen gegen Wespen, sollten Allergene aus dem Gift der Feldwespe *Polistes dominula* sowie der gemeinen Wespe *Vespula vulgaris* rekombinant in Sf9-Zellen exprimiert werden. Eine Diagnostik auf Grundlage von IgE-Reaktivitäten mit dem kompletten Gift ist selten möglich, da es zwischen diesen beiden Arten aufgrund ihrer engen Verwandtschaft zu ausgeprägten proteinbasierten Kreuzreaktivitäten kommt. Bislang sind drei Allergene aus dem Gift der Feldwespe *Polistes dominula* bekannt: eine Phospholipase A1 (Pol d 1), eine Serinprotease (Pol d 4) und das Antigen 5 (Pol d 5). Für eine detaillierte Diagnostik unter Verwendung eines Prototyps des EUROline Assays (Euroimmun, Lübeck) sollte das komplette Set der drei bekannten Allergene von *Polistes dominula* sowie die kreuzreaktiven Analoga aus dem Wespengift Ves v 1 und Ves v 5 verwendet werden. Da von den Phospholipasen bekannt ist, dass sie in Sf9-Zellen nur geringe Expressionsraten zeigen und äußerst schlecht sekretiert werden, wurden Pol d 1 und Ves v 1 nach firmeninternem Protokoll von Euroimmun in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Die übrigen Komponenten wurden im Rahmen dieser Arbeit in Sf9-Zellen exprimiert und gereinigt. Diese Zelllinie wird im Arbeitskreis standardmäßig für die Expression von Hymenoptereingiftkomponenten verwendet, da sie neben hohen Expressionsraten auch die Produktion von glykosylierten aber CCD-freien rekombinanten Allergenen erlaubt. Dies ist eine grundlegende Voraussetzung für die Reaktivitätsanalyse humaner Spenderseren unter Ausschluss kohlenhydratbasierter Kreuzreaktivitäten.

Anschließend sollten Seren von humanen Spendern mit bestätigter Hymenoptereingiftallergie aus Feldwespen-endemischen und nicht endemischen Regionen unter Verwendung dieses Systems analysiert werden, um beurteilen zu können inwieweit hierdurch eine diagnostische Differenzierung möglich ist.

4.1.1 Expression von rekombinanten Hymenoptereingiftallergenen

Der Vektor für die Expression des Antigens 5 aus dem Gift der Feldwespe *Polistes dominula* Pol d 5 stand zu Beginn dieser Arbeit bereits im Arbeitskreis zur Verfügung. Für die

Generierung des Expressionsvektors wurde mRNA aus dem Giftsack einer *Polistes dominula* isoliert und mittels reverser Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation des Pol d 5-Gens für die Ligation in den Expressionsvektor pACgp67B wurde mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, welche die Einführung der benötigten Schnittstellen erlaubten (Pol d 5 Xba Xa for und Pol d 5 Not Stop rev). Für eine spätere optionale Abspaltung der verwendeten Tags von dem Zielprotein wurde auf diesem Weg zusätzlich am N-Terminus der Sequenz eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa eingefügt. Der Expressionsvektor pACgp67B (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) dient als Transfektor im Baculovirusexpressionssystem und erlaubt die Expression von Proteinen unter dem Polyhedrinpromotor als Fusionsprotein mit der gp67-Signalsequenz. Dies ist die effektivste baculoviral codierte Signalsequenz und erlaubt die effiziente Sekretion auch von normalerweise nicht sekretierten Proteinen. Das Signalpeptid wird während des Transports durch die Membran vom Zielprotein abgespalten.

Da die analoge Amplifikation des Pol d 4 Gens aus cDNA nicht gelang, wurde ein synthetisches Gen für Pol d 4, welches von der Firma Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA USA) hergestellt wurde, verwendet. Die Sequenz wurde dabei für die Expression in Sf9-Zellen codonoptimiert. Die Amplifikation der genetischen Information aus dem gelieferten DNA-String Format erfolgte analog zu der des Pol d 5 Gens mit spezifischen Oligonukleotiden, die die Einführung der benötigten Schnittstellen und einer Faktor Xa Schnittstelle erlaubten (Pol d 4 Xba Xa for und Pol d 4 Not Stop rev). Das Amplifikat des Pol d 4 Gens sowie der Vektor pACgp67B wurden mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und NotI geschnitten, wobei der Vektor zusätzlich mittels Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert wurde, um potentielle Religation zu vermeiden. Nach der Ligation wurde der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung bestätigt.

Beide Allergengene wurde außerdem mit einem N-terminalen 10-fach His-Tag zur leichten Reinigung mittels IMAC generiert, welches von der Sequenz des V5-Epitops gefolgt wird. Das V5-Epitop umfasst 14 Aminosäuren und entstammt aus P- und V-Proteinen des Simian Parainfluenzavirus 5. Es erlaubt hier die einfache Detektion der Zielproteine durch anti-V5 Antikörper. Der Aufbau der Expressionskassette ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

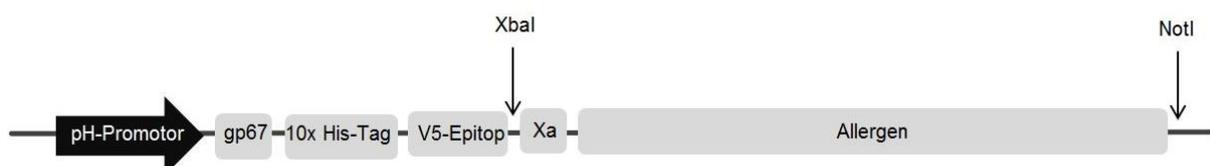


Abb. 6 Schematische Darstellung der Expressionskassette für die Expression von Hymenopterengiftallergenen im Vektor pACgp67B.

Ergebnisse

Die Expression der Allergene erfolgte unter Nutzung des Baculovirusexpressionssystems in Sf9-Insektenzellen. Hierfür wurde linearisierte BaculoGold-DNA (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet. Die Transfektion von Sf9-Zellen erfolgte unter Nutzung des Cellfectin II-Transfektionsreagenzes als Cotransfektion des Transfervektors, welcher das Allergengen trug, und der linearisierter BaculoGold-DNA. Die Rekombination zwischen Transfervektor und Virus-DNA findet anschließend in der Zelle statt. Der Erfolg von Transfektion und Rekombination kann anhand der Expression von GFP (*green fluorescent protein*) überprüft werden, welches über die linearisierte BaculoGold-DNA in die Wirtszelle eingebracht wird. Im Rahmen des *titerless infection* Protokolls wurden nach einer Amplifikationsrunde zelluläre Kryostocks hergestellt und in einer Testexpression der optimale Titer für eine Expression im großen Maßstab bestimmt. Die Kulturüberstände der Testexpression wurden anschließend mittels Immunoblot unter Verwendung eines anti-V5 Epitop Antikörpers analysiert. Dargestellt werden nun zunächst die Ergebnisse der Expression von Pol d 4.

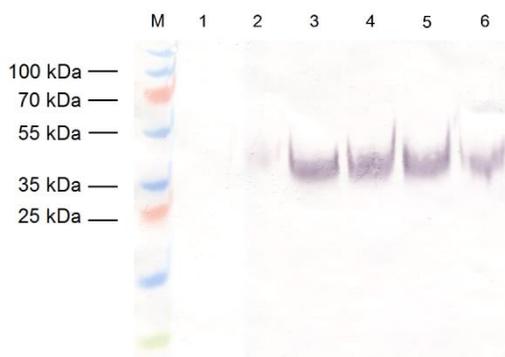


Abb. 7 Analyse der Testexpression von Pol d 4.

SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Tricin-Gel nach anschließendem Immunoblot. Es wurde n1.5 µL des Markers und jeweils 25 µL der Proben reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1-6: TE mit 1, 10, 25, 50, 75 und 100 µL des resuspendierten Pol d 4 Kryostocks. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-V5 Antikörper (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundärantikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Der Immunoblot zur Analyse der Testexpression von Pol d 4 in Sf9 Zellen zeigt, dass ab einer Zugabe von 25 µL der Kryostock-Suspension (vgl. Bahn 3 in Abbildung 7) keine sichtbare Zunahme des Expressionsniveaus stattfand. Werden diese Bedingungen auf die Verwendung von einem Kryostock mit einem Volumen von 1 mL für die Expression im Großmaßstab übertragen, entspricht dies einem Expressionsvolumen von 1.2 L.

Es wurde dementsprechend eine Sf9-Expressionskultur mit einem Gesamtvolumen von 1 L auf zwei identische Kulturen von 500 mL aufgeteilt, mit einem Pol d 4 Kryostock versetzt und für drei Tage unter Schütteln inkubiert.

Die Isolation des rekombinanten Pol d 4 erfolgte nach Tangentialflussfiltration mittels Cross Flow zum Austausch des Kulturmediums gegen PBS pH 8 und Einengen auf ein finales Volumen von etwa 300 mL mittels IMAC unter Verwendung des ÄKTA Start Systems.

Der Erfolg der IMAC-Reinigung wurde mittels Coomassie-gefärbtem Polyacrylamidgel und Immunoblot unter Verwendung eines polyklonalen anti-V5 Epitop-Antikörpers analysiert.

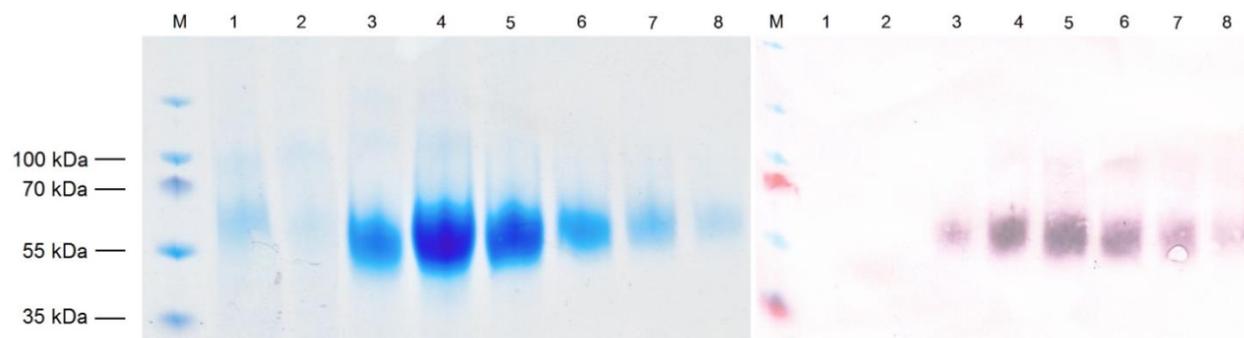


Abb. 8 Analyse der IMAC-Reinigung von Pol d 4.

SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Tricin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 µL des Markers und jeweils 25 µL der Proben reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: Expressionsüberstand; 2: Durchlauf; 3-8: Elutionsfraktionen. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-V5 Antikörper (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundäntikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Abbildung 8 zeigt die Analyse der IMAC-Reinigung von Pol d 4 aus 1 L Sf9-Zell Expressionsüberstand. Die Bande auf Höhe von etwa 45 kDa, welche auch im Immunoblot mit dem anti-V5 Antikörper detektiert wird, entspricht dem rekombinanten Pol d 4, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 33 kDa aufweist. Da die Proteinsequenz jedoch 6 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen beinhaltet, ist das tatsächliche Molekulargewicht durch die extensive Glykosylierung vermutlich deutlich höher. Es wird deutlich, dass Pol d 4 in guter Reinheit und hohen Ausbeuten erhalten werden konnte. Die Fraktionen, welche das Zielprotein enthielten wurden vereinigt und eine photometrische Quantifizierung durch Bestimmung der Absorption bei 260/280 nm ergab eine Gesamtmenge von 9 mg Pol d 4, welche aus einem Liter Expressionskultur erhalten wurde.

Für die Expression von Pol d 5 wurde analog vorgegangen und Abbildung 9 zeigt den Immunoblot zur Analyse der Testexpression.

Ergebnisse

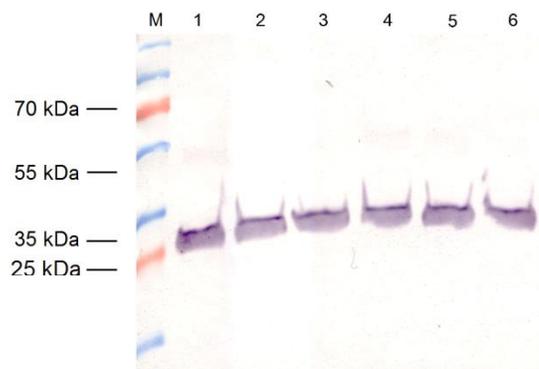


Abb. 9 Analyse der Testexpression von Pol d 5.

SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Tricin-Gel nach anschließendem Immunoblot. Es wurde n1.5 µL des Markers und jeweils 25 µL der Proben reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1-6: TE mit 1, 10, 25, 50, 75 und 100 µL des resuspendierten Pol d 5 Kryostocks. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-V5 Antikörper (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundäntikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Der Immunoblot zur Analyse der Testexpression von Pol d 5 in Sf9 Zellen zeigt, dass bereits bei einer Zugabe von 1 µL der Kryostock-Suspension (vgl. Bahn 1 in Abbildung 9) das maximale Expressionsniveau erreicht wurde. Ein 1 mL-Kryostock würde somit rechnerisch die Expression eines Volumens von bis zu 30 L erlauben, was den Bedarf bei weitem überstieg. Daher wurde auch hier ein finales Expressionsvolumen von 1 L gewählt.

Die Reinigung von Pol d 5 erfolgte analog zu der von Pol d 4 mittels IMAC. Die Analyse mittels Coomassie-gefärbtem Polyacrylamidgel und Immunoblot wird in Abbildung 10 wiedergegeben.

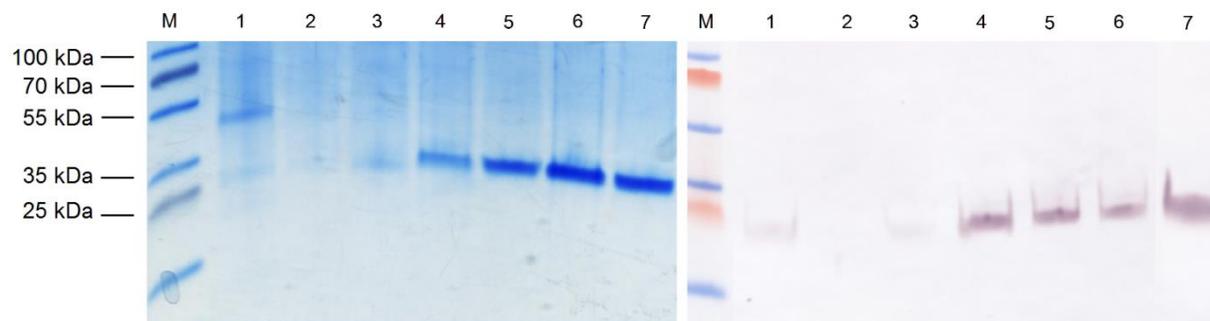


Abb. 10 Analyse der IMAC-Reinigung von Pol d 5.

SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Tricin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 µL des Markers und jeweils 25 µL der Proben reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: Expressionsüberstand; 2: Durchlauf; 3-7: Elutionsfraktionen. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-V5 Antikörper (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundäntikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Die gezeigte Analyse der IMAC-Reinigung von Pol d 5 zeigt in dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel eine dominante Bande auf Höhe von etwa 30 kDa, welche dem

rekombinanten Pol d 5 entspricht und auch im Immunoblot mit anti-V5 Antikörper detektiert wird. Die Fraktionen, welche das Zielprotein enthielten wurden vereinigt und eine photometrische Quantifizierung durch Bestimmung der Absorption bei 260/280 nm ergab eine Gesamtmenge von 5 mg Pol d 5, welche aus einem Liter Expressionskultur erhalten wurde.

Der Expressionsvektor sowie geeignete Kryostocks für die Expression von Ves v 5 standen im Arbeitskreis bereits zur Verfügung. Nach bereits etabliertem Protokoll wurde analog zu den Feldwespengiftallergenen das Antigen 5 aus dem Wespengift in einem Expressionsvolumen von 500 mL in Sf9-Zellen produziert und ebenfalls mittels IMAC gereinigt.

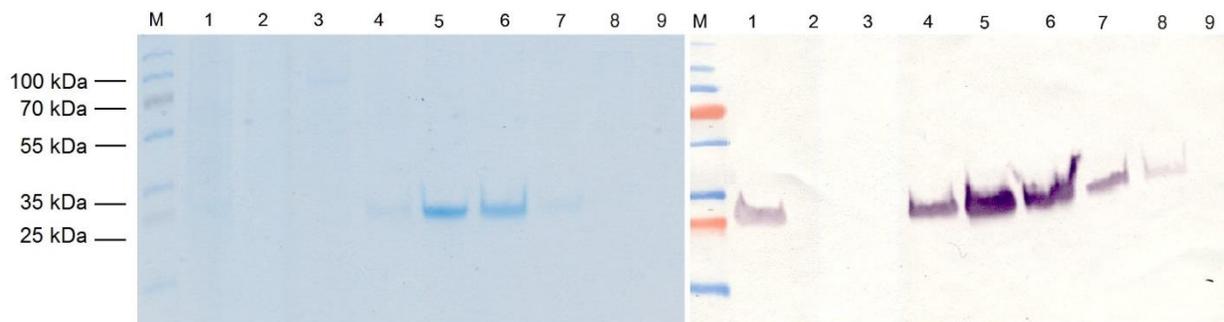


Abb. 11 Analyse der IMAC-Reinigung von Ves v 5.

SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Tricin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 µL des Markers und jeweils 25 µL der Proben reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: Expressionsüberstand; 2: Durchlauf; 3-9: Elutionsfraktionen. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-V5 Antikörper (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundäntikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Die in Abbildung 11 präsentierte Analyse der IMAC-Reinigung von Ves v 5 zeigt in dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel eine dominante Bande auf Höhe von etwa 30 kDa, welche dem rekombinanten Ves v 5 entspricht und auch im Immunoblot mit anti-V5 Antikörper detektiert wird. Die Fraktionen, welche das Zielprotein enthielten wurden vereinigt und eine photometrische Quantifizierung durch Bestimmung der Absorption bei 260/280 nm ergab eine Gesamtmenge von etwa 1 mg Ves v 5.

Wie bereits erwähnt, wurden Sf9-Zellen als Expressionssystem für die rekombinanten Hymenoptereingiftallergene verwendet, da sie eine CCD-freie Expression erlauben. Da die Allergene im Folgenden für die Reaktivitätsanalyse humaner Spenderseren verwendet werden sollten, ist dies unbedingt nötig, um Kreuzreaktivitäten aufgrund von CCD-spezifischen IgE-Antikörpern in den Seren auszuschließen. Die Antigene 5 sind nicht glykosyliert, Pol d 4 jedoch besitzt sechs potentielle *N*-Glykosylierungspositionen. Daher sollte mittels Immunoblot

Ergebnisse

unter Verwendung eines HRP-spezifischen Kaninchenserums das Vorhandensein von CCDs auf dem rekombinanten Pol d 4 ausgeschlossen werden. Dieses Serum wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit HRP erhalten. HRP ist hochgradig glykosyliert und trägt pflanzentypische Glykane vom MMXF³-Typ. Das Kaninchenserum weist daher hohe Titer an CCD-spezifischen IgG-Antikörpern auf, welche die Detektion von α -1,3-Fukose und β -1,2-Xylose erlauben. Kaninchen werden seit Jahrzehnten standardmäßig als Versuchstier zur Gewinnung polyklonaler Antikörper eingesetzt, da sie gegen eine Vielzahl von Antigenen hochaffine Antikörper bilden [147]. Daher konnte das Serum ohne weitere Affinitätsreinigung direkt eingesetzt werden.

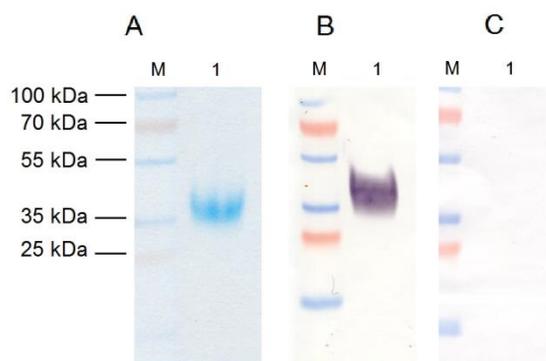


Abb. 12 Analyse der Glykosylierung von rekombinanten Pol d 4.

SDS-PAGE mit einem 10 % Tris-Tricin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (A) und Immunoblot (B und C). Es wurde 1.5 μ L des Markers und jeweils 25 μ L der Proben reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: rPol d 4; A: Coomassiefärbung, B: Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-V5 Antikörper (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundärintikörper durchgeführt. C: Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-HRP Kaninchenserum (1:5000) und anti-rabbit IgG Antikörper (1:20,000) als Sekundärintikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte jeweils durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Abbildung 12 zeigt die Analyse der Glykosylierung des rekombinanten Pol d 4 aus Sf9-Zellen. Sowohl in der Coomassiefärbung als auch im Immunoblot unter Verwendung des anti-V5 Antikörpers ist eine deutliche Bande auf Höhe von etwa 45 kDa zu sehen, welche dem rekombinanten Pol d 4 entspricht. Mit dem anti-HRP Kaninchenserum, welches eine Spezifität für α -1,3-Fukose und β -1,2-Xylose aufweist, konnte jedoch keine Detektion gezeigt werden, was die Abwesenheit dieser Glykan-Epitope indiziert. Die Expression in Sf9-Zellen lieferte also Pol d 4 ohne immunologisch nachweisbare CCD-Reaktivität, weshalb es für die folgenden Reaktivitätsanalysen humaner Spender ebenso wie die nicht glykosylierten Antigene 5 eingesetzt werden konnte.

Die generelle Reaktivität der in Sf9-Zellen exprimierten Allergene wurde vor dem Einsatz im EUROLIne Assay zunächst im ELISA unter Verwendung von humanen Seren analysiert.

Hierfür wurden 10 Seren von Patienten aus dem Mittelmeerraum mit diagnostizierter Allergie auf Spezies der Vespidae eingesetzt.

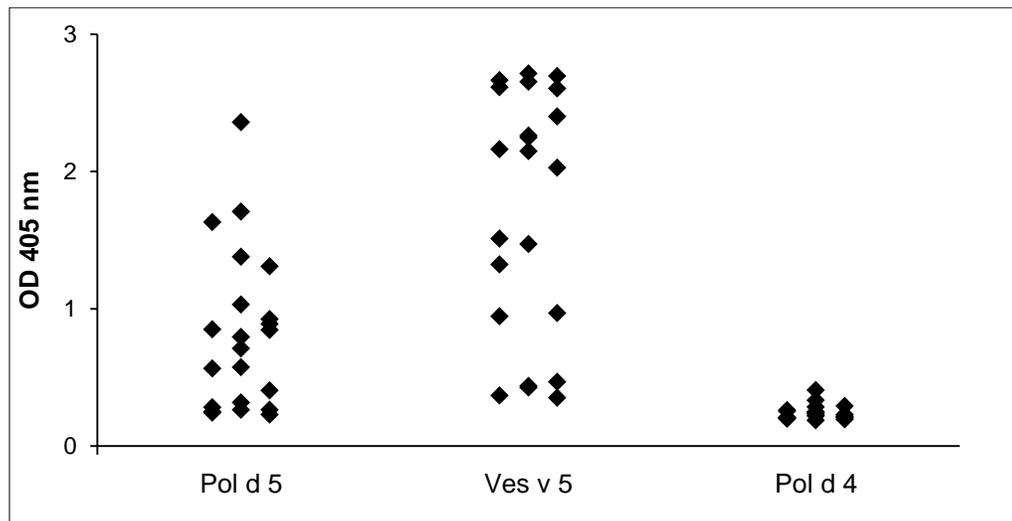


Abb. 13 IgE-Reaktivitätsanalyse humaner Spenderseren mit rekombinanten Wespen- und Feldwespenallergenen mittels ELISA.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit den rekombinanten Allergenen belegt und mit 4% MPBS blockiert. Je 10 µL der Seren wurden in demselben Volumen 4%MPBS verdünnt und über Nacht inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000). Die Farbentwicklung wurde photometrisch bei 405 nm gemessen nach Inkubation mit pNPP-Substratlösung.

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich wird, zeigte ein Großteil der verwendeten Spenderseren mittlere bis hohe IgE-Reaktivitäten mit rekombinantem Pol d 5 und Ves v 5. Im Gegensatz zu den Antigenen 5 konnte allerdings kaum Reaktivität für Pol d 4 bestimmt werden. Da jedoch für diese Voranalyse lediglich ein relativ kleines Spenderkollektiv verwendet wurde und Pol d 4 unter Umständen kein Majorallergen darstellt, kann dies durch die fehlende Sensibilisierung gegen dieses Allergen bei den untersuchten Spendern erklärt werden. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die rekombinanten Allergene, welche in Sf9-Zellen exprimiert wurden, für die Verwendung im EUROLIne Assay geeignet sind.

Wie bereits einleitend erwähnt, finden sich in den Giften von Wespe und Feldwespe stark kreuzreaktive Komponenten. Da in dem Gift der Feldwespen keine CCDs gefunden wurden, lässt sich dieser Befund ausschließlich auf homologe Epitope auf Proteinen zurückführen, welche in beiden Giften vorliegen.

Die Serinprotease Pol d 4 teilt eine Sequenzhomologie von etwa 49% mit der putativen Wespengiftprotease Ves v 4, was etwas höher liegt als die Homologie mit der Bienengiftprotease Api m 7 (40% sowohl mit Ves v 4 als auch mit Pol d 4). Die

Ergebnisse

Sequenzhomologie der Proteasen ist damit etwas geringer als für die Phospholipasen (54%) und die Antigene 5 (59%). Abbildung 14 zeigt mögliche Strukturmodelle beider Proteine.



Abb. 14 Strukturmodell der Proteasen aus dem Gift von *Vespula vulgaris* und *Polistes dominula*.

Dargestellt sind die Strukturmodelle von Pol d 4 (blau) und Ves v 4 (rot) sowie die Überlagerung beider Strukturen, welche mittels molekularem *modelling* unter Verwendung der SWISS-MODEL workspace Web-Software ermittelt wurden. Als Templat wurde PFAll (*prophenoloxidase activating factor II* aus *Holotrichia diomphalia*) verwendet.

Aus den Strukturmodellen von Pol d 4 und Ves v 4 geht hervor, dass die beiden Proteasen große Bereiche homologer Strukturen aufweisen, allerdings auch weniger stark geordnete *loop*-Strukturen, die sich in beiden Proteasen unterscheiden. Eine IgE-Kreuzreaktivität mit den Proteasen aus beiden Giften ist also wahrscheinlich, allerdings vermutlich weniger stark ausgeprägt, als für die Phospholipasen und die Antigene 5, welche bekanntermaßen stark kreuzreaktiv sind für verschiedene Spezies der Vespidae.

Ein Vergleich der Strukturmodell der Antigene 5 Pol d 5 und Ves v 5 ist in Abbildung 15 gezeigt.

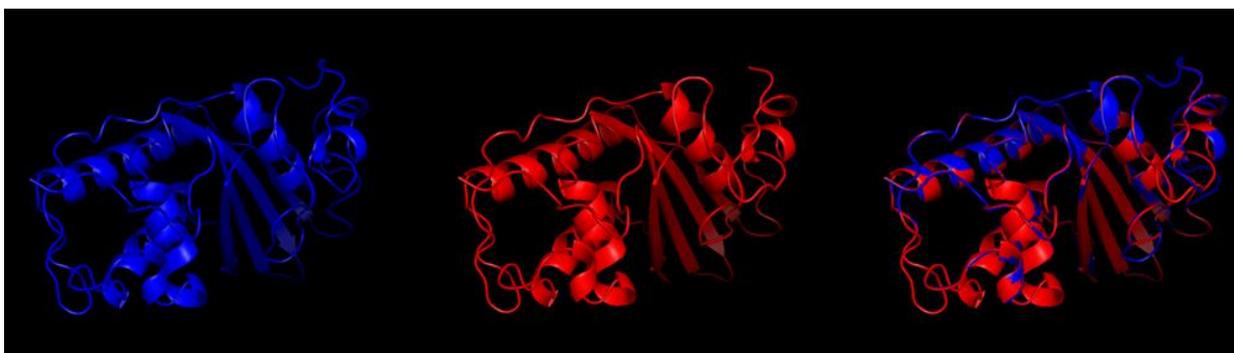


Abb. 15 Strukturmodell der Antigene 5 aus dem Gift von *Vespula vulgaris* und *Polistes dominula*.

Dargestellt sind die Strukturmodelle von Pol d 5 (blau) und Ves v 5 (rot) sowie die Überlagerung beider Strukturen, welche mittels molekularem *modelling* unter Verwendung der SWISS-MODEL workspace Web-Software ermittelt wurden. Als Templat wurde rVes v 5 aus *E. coli* verwendet.

Die Strukturmodelle der Antigene 5 zeigen große homologe Bereiche der Allergene aus dem Gift der Wespe und der Feldwespe, was besonders in der Überlagerung beider Strukturen deutlich wird. Die strukturelle Homologie scheint also noch ausgeprägter, als die Sequenzhomologie bereits andeutet. Diese hohe molekulare Ähnlichkeit der beiden Moleküle deutet wie erwartet also auf ausgeprägte IgE-Kreuzreaktivität der Antigene 5 hin. Dieser Befund deutete sich bereits in der Reaktivitätsanalyse der Antigene 5 mit humanen Spenderseren an, da hier nahezu alle Seren IgE-Reaktivitäten mit beiden Antigenen 5, allerdings kaum mit Pol d 4 zeigten (vgl. Abb. 13).

Eine analoge Anfertigung von Strukturmodellen für die Phospholipasen war aufgrund fehlender Template in der Datenbank nicht möglich.

Die Phospholipase-Allergene Ves v 1 und Pol d 1 wurden nach internem Protokoll von der Firma Euroimmun in *E. coli* exprimiert und anschließend unter geeigneten Bedingungen für die Rückfaltung aus *inclusion bodies* gereinigt. Alle im EUROLIne Assay eingesetzten Allergene sind in Abbildung 16 in einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel gezeigt.

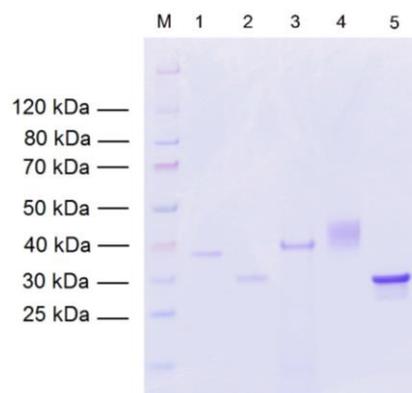


Abb. 16 Gereinigte rekombinante Allergene aus dem Gift der Wespe und der Feldwespe zur Immobilisierung im EUROLIne Assay.

SDS-PAGE mit einem 4-12% Bis-Tris -Gel nach anschließender Coomassie-Färbung. Es wurde 1.5 µL des Markers und jeweils 20 µL der Proben reduzierend aufgetragen. M: PageRuler prestained; 1: Ves v 1; 2: Ves v 5; 3: Pol d 1; 4: Pol d 4; Pol d 5.

4.1.2 Reaktivitätsanalyse von Seren humaner Hymenopterengiftallergiker mittels EUROLIne Assay

Die rekombinanten Allergene aus dem Gift von *Polistes dominula* Pol d 1, Pol d 5 und Pol d 4 und *Vespula vulgaris* Ves v 1 und Ves v 5 sowie die entsprechenden Giftextrakte und MuxF³ als CCD Marker wurden im EUROLIne Assay hinsichtlich ihrer Reaktivität mit humanen Spenderseren analysiert. Der Aufbau des Teststreifens ist in Abbildung 17 gezeigt.

Ergebnisse

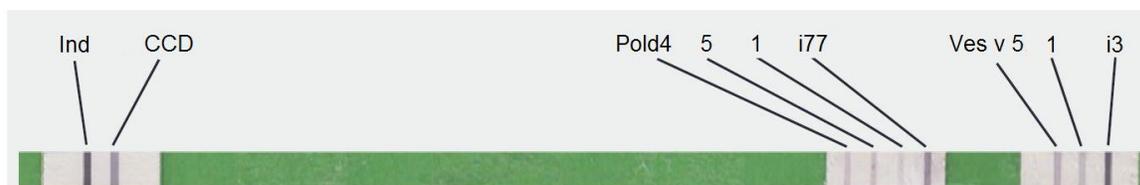


Abb. 17 Darstellung des für den EUROLine Assay eingesetzten Teststreifen.

Immobilisierte Komponenten: Indikator (Ind), MuxF³-HSA-Konjugat (CCD), rekombinantes Pol d 4, 5 und 1, *Polistes dominula*-Gift (i77), rekombinantes Ves v 5 und 1, *Vespula vulgaris*-Gift (i3).

Bei den eingesetzten Seren handelte es sich um Seren von Patienten mit bestätigter Allergie auf das Gift von Spezies der Vespidae. Eine weitere Abgrenzung zwischen Wespen- und Feldwespenallergikern wurde nicht vorgenommen. Jedoch wurden 56 Seren von Patienten aus Feldwespen-endemischen Regionen (Italien) und 50 Seren aus nicht endemischen Regionen (Ostdeutschland) untersucht. Eine genuine Sensibilisierung gegen das Gift der Feldwespe sollte bei der Feldwespen-endemischen Gruppe (PG) deutlich häufiger auftreten als in der nicht Feldwespen-endemischen Gruppe, wobei Allergien gegen das Wespengift in beiden Gruppen vorkommen sollten. Der Einfachheit halber wird die nicht endemische Gruppe im Folgenden als *Vespula* Gruppe (VG) bezeichnet, da davon auszugehen ist, dass sie von Sensibilisierungen auf das Gift von *Vespula* Spezies dominiert wird. Tabelle 5 zeigt hier zunächst die Sensibilisierungsprofile beider Gruppen bezüglich der Giftextrakte und den einzelnen Allergenen. Die vollständigen Daten sind in tabellarischer Form im Anhang aufgeführt.

Tab. 5 IgE-Reaktivitätsanalyse der Seren aus der *Polistes*- und der *Vespula* Gruppe bezüglich CCDs, Giftextrakte und rekombinanten Allergene aus *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris*.

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Spender, welche mindestens IgE-Reaktivitäten der RAST-Klasse 1 auf die Allergene zeigten. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLine Assay bestimmt.

Allergen	IgE-Reaktivität der PG	IgE-Reaktivität der VG
Wespengift	88%	96%
Ves v 1	46%	84%
Ves v 5	70%	86%
Feldwespengift	68%	32%
Pol d 1	46%	72%
Pol d 5	77%	82%
Pol d 4	32%	30%
CCD	29%	64%

Die Analyse zeigt zunächst insgesamt eine höhere IgE-Reaktivität gegen Wespengift im Vergleich zu Feldwespengift in beiden Gruppen, was mit der Häufigkeit dieser Spezies übereinstimmt. Jedoch wird auch deutlich, dass eine Diagnostik allein anhand der Giftextrakte kaum möglich ist, da besonders in der *Polistes* Gruppe die IgE-Reaktivität mit beiden Giften ähnlich hoch ist. Außerdem ist die CCD-Reaktivität innerhalb der *Vespula* Gruppe mit 64% mehr als doppelt so hoch wie in der *Polistes* Gruppe, was in Einklang mit der Abwesenheit solcher Strukturen im Feldwespengift ist. Der Anteil der Spender, welche spezifische IgE (sIgE) gegen die Phospholipasen und Antigene 5 aufweisen, ist für beide Gruppen hoch. Hierbei sind die Reaktivitäten auf die Antigene 5 insgesamt häufiger, was sich besonders in der *Polistes* Gruppe zeigt. Die Reaktivität der Serinprotease Pol d 4 ist insgesamt mit etwa 30% in beiden Kollektiven als eher gering einzuschätzen. Hier kann, anders als erwartet, eine vergleichbare IgE-Reaktivität der Spenderseren aus der *Vespula* Gruppe und der *Polistes* Gruppe beobachtet werden, was eine Kreuzreaktivität mit der putativen Protease Ves v 4 aus dem Wespengift vermuten lässt.

Im Folgenden sollen die Sensibilisierungen der Patientenseren aus den untersuchten Kollektiven auf die einzelnen Allergene betrachtet werden.

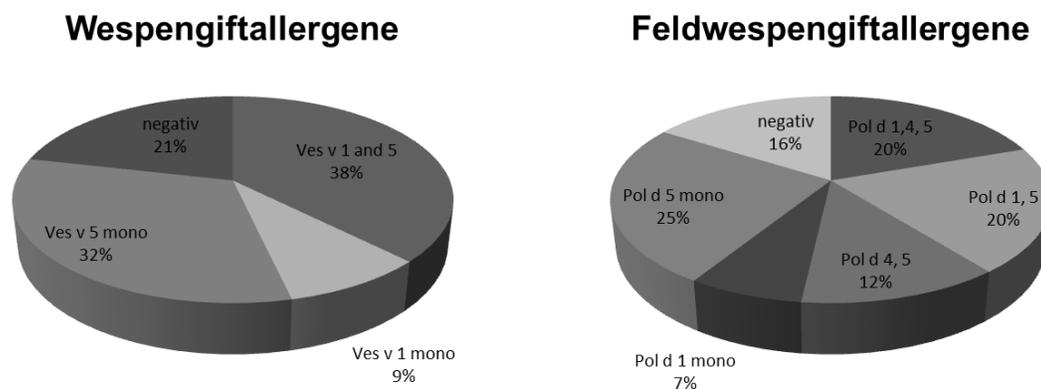


Abb. 18 Komponentenaufgelöste IgE-Reaktivitätsanalyse der Spenderseren aus der *Polistes* Gruppe.

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Spender, welche mindestens IgE-Reaktivitäten der RAST-Klasse 1 auf die rekombinanten Allergene zeigten. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLIne Assay bestimmt.

Betrachtet man die Sensibilisierungsmuster (Abbildung 18) der gesamten *Polistes* Gruppe bezüglich der einzelnen Feldwespenallergene, wird deutlich, dass 40% der Spender sowohl Pol d 1 als auch Pol d 5 erkennen. Ein Viertel aller Seren zeigt IgE-Reaktivität ausschließlich mit Pol d 5 und ein geringer Anteil von lediglich 7% ist monosensibilisiert auf Pol d 1. Eine Monosensibilisierung auf die Serinprotease Pol d 4 konnte innerhalb des Kollektivs nicht nachgewiesen werden. Die IgE-Reaktivitäten mit den Wespengiftallergenen, offenbart hier ein

Ergebnisse

vergleichbares Muster. Während von den 70% der Patienten, welche IgE-Reaktivität auf Ves v 5 zeigen, etwa jeweils die Hälfte mono- bzw. doppelt sensibilisiert sind, sind auch auf die Wespengiftphospholipase nur ein geringer Prozentsatz (9%) monosensibilisiert.

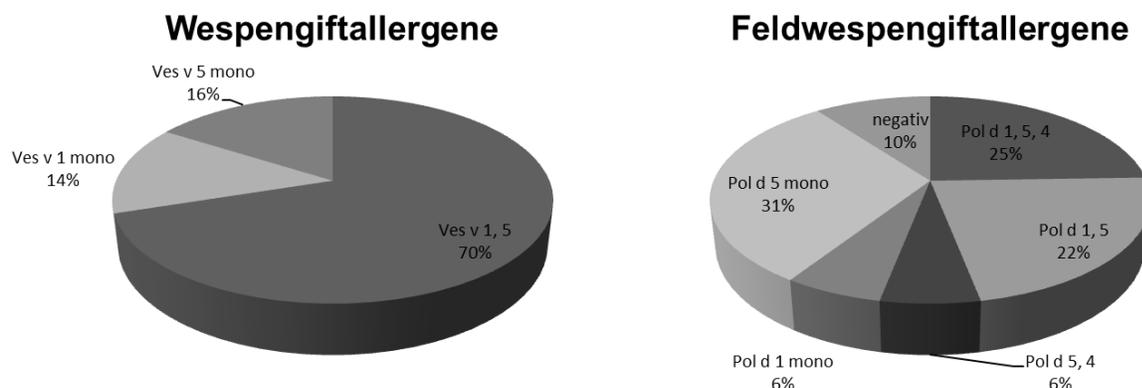


Abb. 19 Komponentenaufgelöste IgE-Reaktivitätsanalyse der Spenderseren aus der *Vespula* Gruppe.

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Spender, welche mindestens IgE-Reaktivitäten der RAST-Klasse 1 auf die rekombinanten Allergene zeigten. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLIne Assay bestimmt.

Eine analoge Analyse der Patientenserum aus der *Vespula* Gruppe ist in Abbildung 19 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Doppelsensibilisierung auf beide Wespengiftallergene mit 70% deutlich stärker ausgeprägt ist, als in der *Polistes* Gruppe. Lediglich 14 bzw. 16% zeigen eine Monosensibilisierung auf Ves v 1 bzw. Ves v 5. Auffallend ist auch, dass alle Patienten auf mindestens eines dieser Allergene positiv getestet wurden, während 21% der Seren aus der *Polistes* Gruppe keine IgE-Reaktivitäten mit den getesteten Wespengiftallergenen zeigten. Die Verteilung der Reaktivitäten auf die rekombinanten Allergene aus dem Feldwespengift ist hier ähnlich differentiell wie für die *Polistes* Gruppe, wobei auch hier der große Anteil an Seren mit Reaktivität auf Pol d 5 und in geringerem Maße auch Pol d 1 gefunden wurde. Nur 10% der Seren reagierten mit keinem der Feldwespenallergene.

Die starke Reaktivität der Phospholipasen A1 und im Besonderen der Antigene 5 unterstreicht ihre diagnostische Relevanz. Jedoch zeigte sich in dieser Studie eine starke Kreuzreaktivität beider Allergene der untersuchten Spezies, wie in Abbildung 20 für beide Patientenkollektive graphisch dargestellt ist.

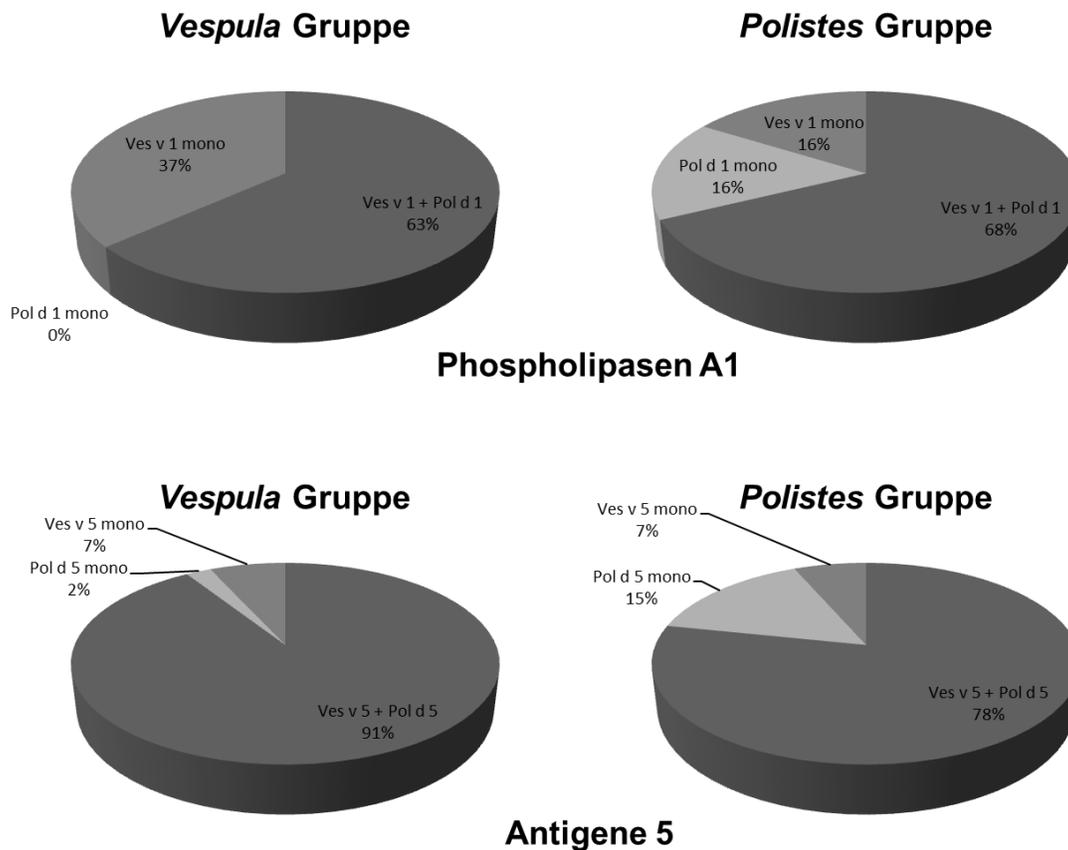


Abb. 20 IgE-Kreuzreaktivitäten der Phospholipasen A1 und der Antigene 5 aus den Giften von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris*.

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Spender, welche mindestens IgE-Reaktivitäten der RAST-Klasse 1 auf die rekombinanten Allergene zeigten. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLIne Assay bestimmt.

Hierbei wird deutlich, dass die Antigene 5 noch stärkere Kreuzreaktivitäten als die Phospholipasen zeigen, für welche in beiden Gruppen etwa zwei Drittel doppelt positive Spenderseren gefunden wurden. Die Kreuzreaktivität der Antigene 5 ist in der *Vespula* Gruppe mit 91% doppelt positiven Spenderseren sogar noch deutlicher ausgeprägt, als in der *Polistes* Gruppe mit 78%.

Eine zuverlässige Diagnostik anhand der Bestimmung der spezifischen IgE-Reaktivitäten auf einzelne Komponenten ist somit nur in wenigen Fällen möglich. Bislang wurden die Reaktivitäten allerdings nur hinsichtlich der Kriterien „positiv“ und „negativ“ unterteilt. Ein Vergleich der jeweiligen sIgE-Titer für die Einzelkomponenten kann für eine Reihe von Patienten bereits Hinweise auf die genuine Sensibilisierung bzw. das Vorliegen von Kreuzreaktivitäten geben.

Ergebnisse

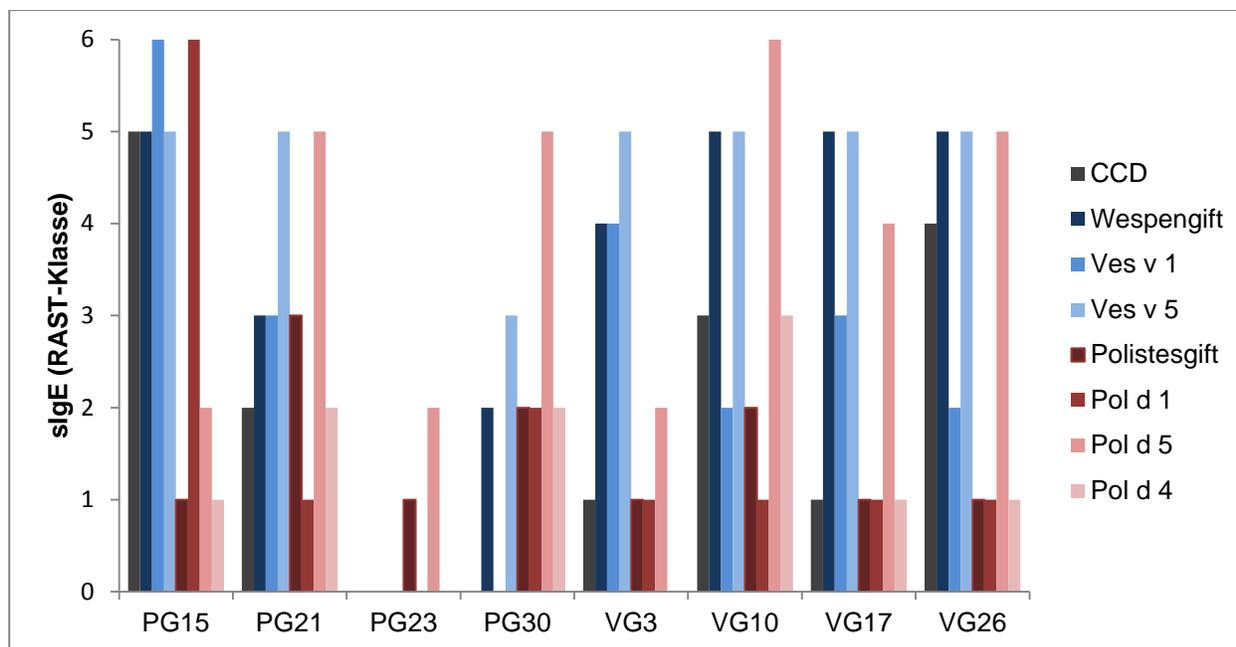


Abb. 21 sIgE-Reaktivitäten ausgewählter Spenderseren auf die verschiedenen rekombinanten Allergene und Giftextrakte von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* sowie CCDs.

Dargestellt sind jeweils die sIgE-Reaktivitäten von vier Spendern aus der *Polistes* (PG) und der *Vespula* Gruppe (RG) in RAST-Klassen. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROline Assay bestimmt.

Abbildung 21 zeigt die sIgE-Reaktivitäten ausgewählter Spender beider Patientenkollektive und verdeutlicht, dass in einigen Fällen durch komponentenaufgelöste Evaluierung der Daten die Möglichkeit besteht eine genuine Sensibilisierung auf eine der beiden Vespidae Spezies mit relativ großer Sicherheit zu bestimmen. So zeigt beispielsweise Serum PG15 eine deutlich höhere Reaktivität mit Wespengift und Ves v 5 als mit Feldwespengift und Pol d 5. Hierbei muss zusätzlich beachtet werden, dass sIgE-Reaktivitäten der RAST-Klasse 1 in der Regel nicht mit klinischen Symptomen des Patienten einhergehen. Der hohe CCD-spezifische IgE-Titer ist ein weiteres Indiz dafür, dass bei diesem Patienten eher eine Sensibilisierung gegen Wespengift vorliegt. Die hohe Reaktivität auf Pol d 1 und auch die geringe Reaktivität auf Pol d 5 kann in diesem Fall vermutlich auf Kreuzreaktivitäten mit den Wespengiftanaloga zurückgeführt werden. Ähnliche Tendenzen zeigen auch die Seren VG3, VG17 und VG26 aus der *Vespula* Gruppe. Für VG17 lässt sich aufgrund der fehlenden CCD-Reaktivität sogar mit noch größerer Wahrscheinlichkeit eine genuine Sensibilisierung diagnostizieren, da hier die sehr hohe IgE-Reaktivität mit Wespengiftextrakt nicht durch karbohydratbasierte Kreuzreaktivität verursacht werden kann. Das Serum PG23 zeigt ausschließlich auf Pol d 5 eine nennenswerte IgE-Reaktivität, weshalb mit großer Bestimmtheit eine genuine Sensibilisierung gegen das Gift von *Polistes dominula* vorliegt. Keine eindeutige Zuordnung ist

für die Seren PG21, PG30 und VG10 möglich, da hier hohe Reaktivitäten auf Komponenten aus beiden Giften erhalten wurden. Hier wären sowohl ausgeprägte Kreuzreaktivitäten der IgE-Antikörper in den Seren, als auch potentielle Doppelsensibilisierungen denkbar.

Bemerkenswerterweise ließen sich aufgrund der sIgE-Reaktivitäten innerhalb der *Vespula* Gruppe keine Patientenseren auffinden, die eher eine genuine Feldwespensensibilisierung aufweisen. Dies war hinsichtlich der geographischen Herkunft der Patienten zwar zu erwarten, unterstreicht aber dennoch die Aussagekraft der erhaltenen Daten.

Für Patientenseren, deren sIgE-Reaktivitäten keine klare Bestimmung der primären Sensibilisierung erlauben, werden für die Diagnostik jedoch zusätzliche Kriterien benötigt. Um eine zuverlässige Analyse auch der Seren zu erreichen, welche nahezu identische sIgE-Titer auf Ves v 5 und Pol d 5 aufweisen, wurden EUROLIne-Analysen durchgeführt, welche die Affinität der Serum-Antikörper berücksichtigen. Hierfür wurden die Teststreifen nach Inkubation mit den Patientenseren mit einem chaotropen Reagenz gewaschen und so niederaffine IgE entfernt. Für die Auswertung werden somit nur hochaffine IgE-Antikörper berücksichtigt, wodurch eine stärkere Signalreduktion im Vergleich zum herkömmlich behandelten Teststreifen erreicht werden sollte, wenn es sich um kreuzreaktive Antikörper handelt, im Gegensatz dazu, wenn eine tatsächliche Sensibilisierung besteht. Es wurden so jeweils 15 Seren aus der *Polistes* und der *Vespula* Gruppe hinsichtlich der relativen IgE-Affinitäten zu Ves v 5 und Pol d 5 analysiert. Abbildung 22 zeigt die drei möglichen erhaltenen Reaktivitätsmuster für ausgewählte Seren.

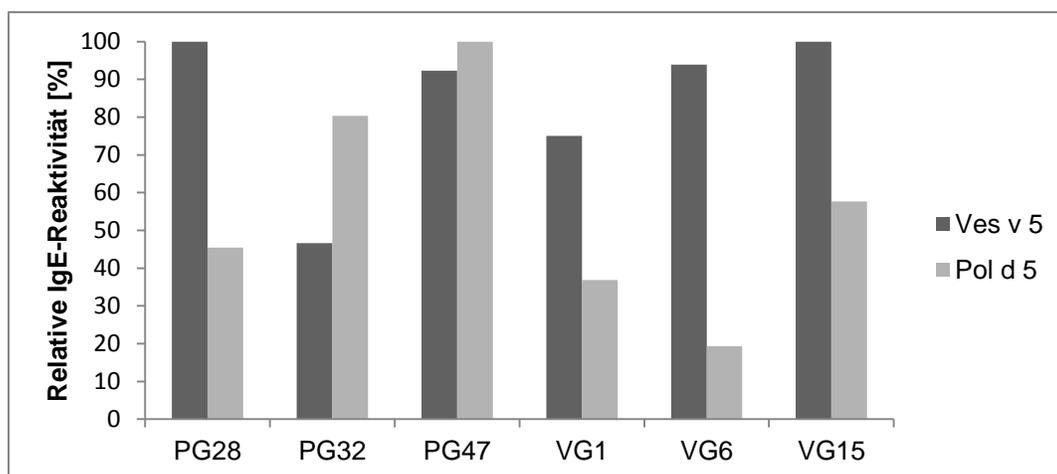


Abb. 22 Relative IgE-Reaktivitäten ausgewählter Seren auf Ves v 5 und Pol d 5 unter Berücksichtigung der relativen Antikörperaffinitäten.

Gezeigt ist die prozentuale Bindung von IgE-Antikörpern nach Behandlung der Teststreifen mit chaotropen Reagenz im Vergleich zu den herkömmlich behandelten Teststreifen von jeweils drei Spendern aus der *Polistes* und *Vespula* Gruppe. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLIne Assay bestimmt.

Ergebnisse

Für die analysierten Spender der *Polistes* Gruppe konnten drei verschiedene relative Affinitätsmuster für die Antigene 5 aus dem Gift von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* ermittelt werden, welche in Abbildung 22 stellvertretend für je ein Serum gezeigt sind. Serum PG28 zeigt nach der chaotropen Behandlung keinen Reaktivitätsverlust auf Ves v 5, jedoch eine Reduktion des Signals für Pol d 5 um mehr als 50%. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Anteil niederaffiner Bindung für Pol d 5 deutlich höher ist und es sich hierbei vermutlich lediglich um kreuzreaktive Antikörper handelt. Somit ist eine genuine Sensibilisierung auf Gifte der *Vespula*-Spezies sehr wahrscheinlich. Das entgegengesetzte Muster wurde für Serum PG32 erhalten. Auch wenn das Verhältnis der relativen Reaktivitäten hier nicht so ausgeprägt zugunsten von Pol d 5 ausfällt, kann dennoch mit einiger Sicherheit von einer Sensibilisierung gegen das Gift von *Polistes dominula* ausgegangen werden. Im Gegensatz zu diesen relativ deutlichen Tendenzen, wurden für eine Reihe von Seren, wie PG47, keine eindeutigen Ergebnisse erhalten. Die Ursache hierfür kann eine tatsächliche Mehrfachsensibilisierung des Patienten sein oder die Methode lässt in diesen Fällen keine Bestimmung der primären Sensibilisierung zu. Für alle analysierten Seren aus der *Vespula* Gruppe konnte ausschließlich das zuerst vorgestellte Reaktivitätsmuster in verschieden starker Ausprägung beobachtet werden, was indiziert, dass bei allen Patientenseren, die hier getestet wurden, wahrscheinlicher eine genuine Sensibilisierung gegen das Gift von *Vespula*-Spezies als gegen Feldwespengift vorliegt.

Eine analoge Analyse unter Verwendung der weniger kreuzreaktiven Phospholipasen Ves v 1 und Pol d 1 lieferte keine entsprechenden Unterschiede in den IgE-Affinitäten, sodass hieraus keine weiteren Informationen bezüglich der Sensibilisierung gewonnen werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verwendung von rekombinanten CCD-freien Allergenen aus dem Gift von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* im EUROLIne Assay eine deutliche Verbesserung der Diagnostik im Vergleich zur Verwendung von lediglich den Giftextrakten erlaubt. In einigen Fällen konnte durch die Analyse von Sensibilisierungsprofilen und Vergleich von sIgE-Reaktivitäten auf die kreuzreaktiven Komponenten bereits mit hoher Sicherheit eine Aussage bezüglich der primär sensibilisierenden Spezies gemacht werden. Durch Analyse der relativen Antikörperaffinitäten zu den Antigenen 5 war es zusätzlich in einigen Fällen möglich, auch solche Patienten zu diagnostizieren, deren absolute sIgE-Titer keinen Aufschluss über eine genuine Sensibilisierung zuließen.

4.2 Expression und Charakterisierung von humanem IgE

Der Expressionsvektor, welcher für die Baculovirus-medierte Insektenzelleexpression des chimären leporid/humanen IgE verwendet wurde, basiert auf dem kommerziell erhältlichen pFastBac Dual Vektor. Dieser Vektor hat zwei *multiple cloning sites* für die simultane Expression zweier Proteine und ist daher besonders geeignet für die Antikörperexpression. Die Expression der schweren Antikörperkette steht dabei unter dem Polyhedrin-Promotor; die der leichten Kette unter dem p10-Promotor, wobei es sich in beiden Fällen um starke Promotoren handelt, was hohe Expressionsraten beider Ketten ermöglicht. Sowohl schwere als auch leichte Kette werden als Fusionsproteine mit einer gp67-Signalsequenz exprimiert, um eine effiziente Sekretion zu gewährleisten. Der Ausgangsvektor für die dargestellte Klonierung beinhaltete die leporiden variablen Domänen des CCD-spezifischen Klons HMM5, eine humane kappa-C_L und die humane IgG₁-C_{H1} und erlaubte somit die Expression des HMM5-Fab-Fragments. Der Klon HMM5 wurde bereits zuvor in der Arbeitsgruppe durch *phage-display*-Selektion einer leporiden Bibliothek gegen die Glykoproteine HRP und MuxF³-HSA erhalten und ist spezifisch für CCDs, im Besonderen α -1,3-*core*-fukosylierte und (jedoch nur in Kombination mit dem Fukose-Epitop) β -1,2-*core*-xylosylierte Glykoproteine. Für die Selektion des HMM5-Klons wurde ein Kaninchen mit HRP immunisiert und aus Milz und Knochenmark isolierte mRNA verwendet, um eine scFv (*single chain fragment variable*)-Bibliothek zu erstellen.

Die Amplifikation der humanen IgE-schweren Kette (C_{H1}-C_{H4}) erfolgte aus bereits im Arbeitskreis vorhandenen Konstrukten für die HEK-Zell-Expression von IgE-Antikörpern bei gleichzeitiger Einführung der notwendigen Schnittstellen und eines C-terminalen 5-fach His-Tags unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide (IgEHC5xHisHindIII rev und IgE HC Xho for). Da alle im Arbeitskreis vorhandenen Konstrukte mindestens eine mutierte Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, wurden der vordere (C_{H1}-C_{H2}) und der hintere Bereich der IgE-schweren Kette (C_{H2}-C_{H4}) aus jeweils unterschiedlichen Konstrukten amplifiziert und über eine Hybridisierungs-PCR ligiert. Die Oligonukleotide für die Hybridisierung (IgEHCREMutP/S+V/D for und IgEHCREMutP/S+V/D rev) wurden dabei so gewählt, dass sie beide mutierten Nukleotide aus den Ausgangskonstrukten umfassten und somit eine simultane Rückführung der mutierten Sequenzen zum Wildtyp erlaubten. Das hybridisierte Amplifikat, sowie der pFastBac Dual Vektor wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen Xho I und Hind III geschnitten und der Vektor zusätzlich dephosphoryliert. Anschließend wurden die schwere Kette des humanen IgE und pFastBac

Ergebnisse

Dual ligiert, sodass der Vektor zur Expression des humanen HMM5-IgE erhalten wurde, was durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigt wurde. Die komplette Expressionskassette zur Expression des HMM5 IgE im Vektor pFastBac Dual ist in Abbildung 23 gezeigt.

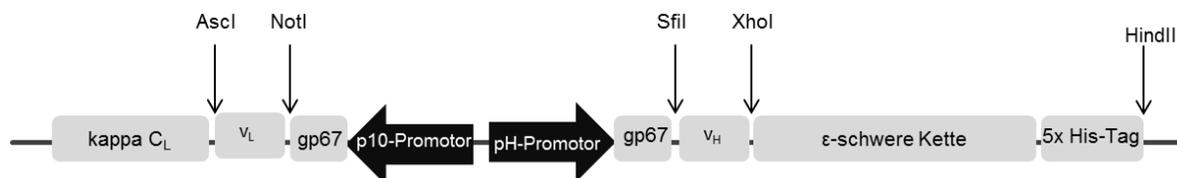


Abb. 23 Schematische Darstellung der Expressionskassette des humanen IgE im Vektor pFastBac Dual.

Nach erfolgreicher Klonierung des HMM5 IgE wurde dieselbe Expressionskassette für die Expression des murin/humanen HyHEL 10 IgE verwendet, welcher spezifisch für Hühnereilysozym ist. Hierfür wurden die variablen Domänen des HMM5 gegen die des HyHEL 10 ausgetauscht. Diese wurden über geeignete Oligonukleotide (HyHEL VL Not I for und HyHEL VL AscI rev für die v_L und HyHEL VH SfiI for und HyHEL VH Sall rev für die v_H) unter Einführung der notwendigen Schnittstellen aus einem Vektor amplifiziert, welcher die Expression eines leporiden HyHEL 10 IgG erlaubte. Die v_L und v_H wurden anschließend nacheinander mit dem Vektor ligiert. Aufgrund seiner hohen Affinität zu dem günstig verfügbaren Antigen Hühnereilysozym wird dieser Klon häufig als Modellantikörper eingesetzt. In dieser Arbeit sollte der HyHEL 10 IgE für weiterführende strukturelle Analysen im Besonderen im Komplex mit seinem Antigen eingesetzt werden, um Schwierigkeiten zu umgehen, welche eine analoge Analyse mit dem HMM5 mit sich bringen würde.

Im Folgenden werden nun zunächst die Ergebnisse aus der Expression des HMM5 IgE vorgestellt.

Die Transfektion von Sf9-Insektenzellen erfolgte nach Protokoll des Bac-to-Bac Systems. Hierfür wurden zunächst die rekombinanten Bacmide generiert und anschließend Sf9-Insektenzellen unter Verwendung von Cellfectin II transfiziert. Im Rahmen des *titerless infection* Protokolls wurden nach einer Amplifikationsrunde zelluläre Kryostocks hergestellt und in einer Testexpression (TE) der optimale Titer für eine Expression im großen Maßstab bestimmt. Außerdem wurden nach 3 und 5 Tagen Proben der Testexpressionsüberstände genommen, um die optimale Expressionsdauer festzustellen. Mittels ELISA wurden die relativen Expressionsraten der unterschiedlichen Proben verglichen (Abbildung 24).

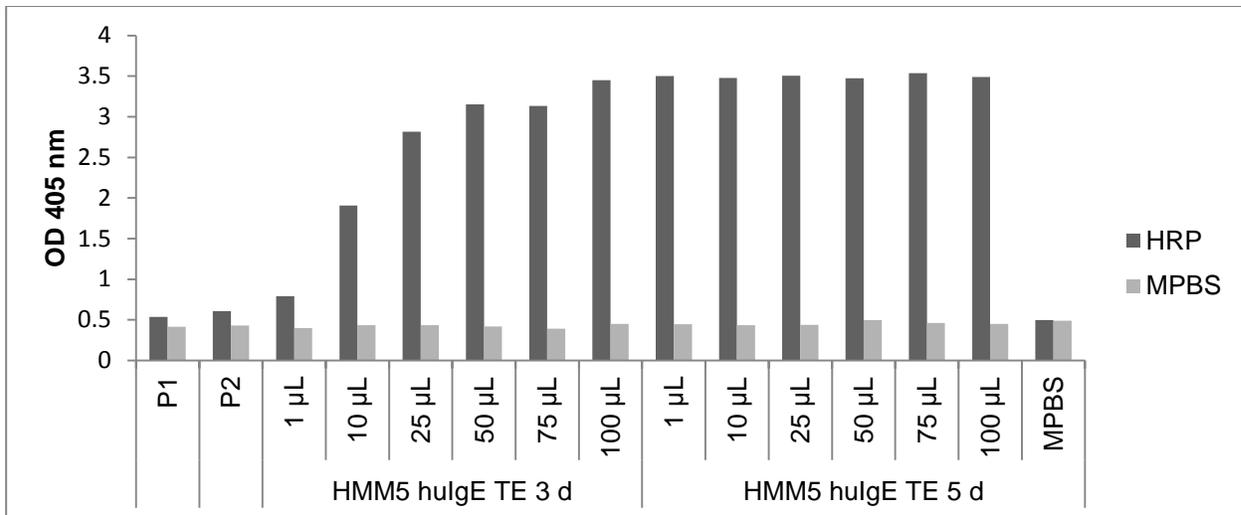


Abb. 24 ELISA zur Analyse der Expressionsraten des HMM5 IgE in der Testexpression nach 3 und 5 Tagen sowie des Überstands nach Transfektion (P1) und einer Amplifikationsrunde (P2).

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit HRP belegt und mit 4% MPBS blockiert. Die Überstände der Testexpressionen wurden unverdünnt über Nacht inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000). Die Farbentwicklung wurde photometrisch bei 405 nm gemessen nach Inkubation mit pNPP-Substratlösung.

Die ELISA-Analyse der Testexpressionsüberstände des HMM5 IgE zeigt hierbei zum einen - besonders für die Testexpressionen mit geringeren Volumina an zugegebener Kryostock-Suspension - höhere Expressionsraten bei einer Expression über fünf Tage im Vergleich zu lediglich drei Tagen, wodurch eine längere Expressionsdauer vorzuziehen ist. Außerdem ist nach fünf Tagen Expression kein deutlicher Unterschied in den Expressionsniveaus der einzelnen Testexpressionen zu sehen. Für die Expression im Großmaßstab wurde daher ein mittleres Expressionsvolumen von 1 L gewählt, welches mit einem 1 mL Aliquot der Kryostocks versetzt wurde. Die Bedingungen liegen hierbei entsprechend zwischen denen der Testexpressionen mit 25 µL (entspricht 1200 mL Expressionsvolumen pro mL Kryostock) und 50 µL (entspricht 600 mL Expressionsvolumen pro mL Kryostock) der Kryostock-Suspension. Nach fünftägiger Expression wurde die Kultur zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen und jeweils 500 mL des Überstands mittels IMAC bzw. *KappaSelect*-Matrix unter Verwendung des ÄKTA-Start-Systems gereinigt. Für die *KappaSelect*-Reinigung wurde der Überstand auf pH 7.4 eingestellt und direkt für die Proteinreinigung verwendet. Der Expressionsüberstand, der Durchlauf der Reinigung sowie proteinhaltige Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und Immunoblot mittels polyklonalem anti-human IgE-AP analysiert.

Ergebnisse

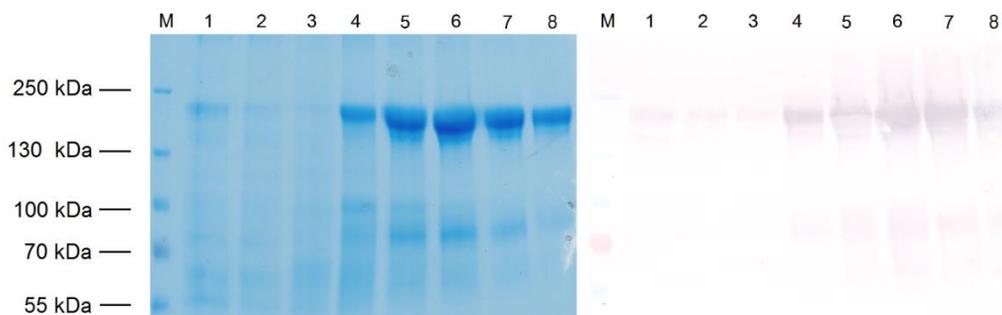


Abb. 25 Analyse der *KappaSelect*-Reinigung des humanen HMM5 IgE.

SDS-PAGE mit einem 7.5% Tris-Glycin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 μ L des Markers und jeweils 25 μ L der Proben nicht reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: Expressionsüberstand; 2: Durchlauf; 3-8: Elutionsfraktionen. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Sowohl in dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel als auch im Immunoblot ist eine dominante Bande auf der Höhe von ungefähr 200 kDa zu sehen, welche dem intakten humanen IgE entspricht (vgl. Abb. 25). Eine geringere Menge eines kleineren Fragments auf der Höhe von 80 kDa wird im Immunoblot mit anti-human IgE-AP ebenfalls detektiert, weshalb davon auszugehen ist, dass es zumindest Teile der schweren Kette enthält.

Für die Reinigung des HMM5 IgE mittels IMAC wurde der Kulturüberstand zunächst mittels Tangentialflussfiltration an der Cross Flow auf ein finales Volumen von etwa 300 mL eingeeengt und gleichzeitig das Kulturmedium gegen PBS pH 8 ausgetauscht. Die IMAC Reinigung wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und Immunoblot unter Verwendung eines Gemischs aus polyklonalem anti-human IgE-AP und polyklonalem anti-human kappa-light chain-AP Antikörper analysiert.

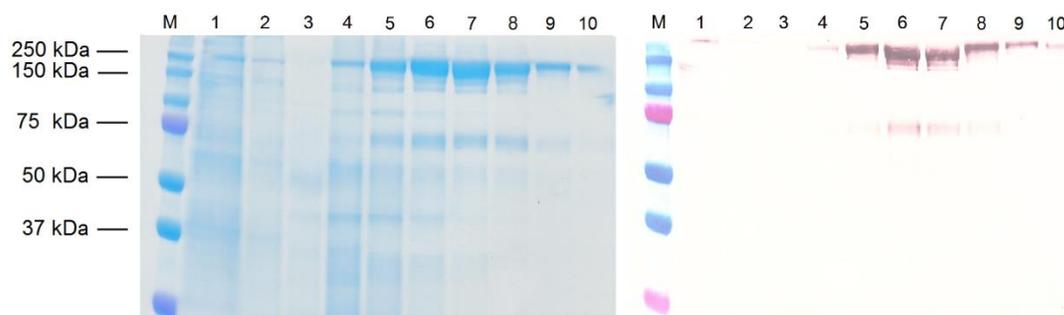


Abb. 26 Analyse der IMAC-Reinigung des humanen HMM5 IgE.

SDS-PAGE mit einem 12.5% Tris-Glycin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 μ L des Markers und jeweils 20 μ L der Proben nicht reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: Expressionsüberstand; 2: Durchlauf; 3-10: Elutionsfraktionen. Der Immunoblot wurde mit einem Gemisch aus polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000) und polyklonalem anti-human kappa-light chain-AP Antikörper (1:20,000) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Die Analyse der IMAC-Reinigung des HMM5 IgE zeigte ein mit der *KappaSelect*-Reinigung vergleichbares Ergebnis. Die dominante Bande läuft hier auf der Höhe von etwa 250 kDa, was jedoch durch die höhere Prozentigkeit des verwendeten Gels erklärt werden kann. Sie entspricht dem intakten humanen IgE. Eine Reihe kleinerer Fragmente konnte durch die IMAC nicht entfernt werden und wird in geringen Konzentrationen sowohl in dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel als auch zum Teil im Immunoblot nachgewiesen.

Beide Reinigungsmethoden eignen sich zur Isolation des HMM5 IgE aus Sf9-Insektzellkulturüberstand. Aufgrund der mildereren Elutionsbedingungen wurde jedoch für die nachfolgenden funktionellen und strukturellen Analysen ausschließlich mittels IMAC gereinigter IgE verwendet.

Um zuvor die korrekte Kettenzusammensetzung beurteilen zu können, wurde der über IMAC gereinigte IgE mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen analysiert.

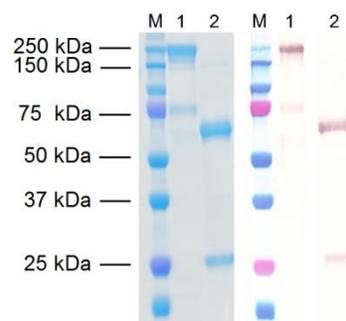


Abb. 27 Analyse des humanen HMM5 IgE unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen.

SDS-PAGE mit einem 12.5% Tris-Glycin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 μ L des Markers und jeweils 20 μ L der Proben nicht reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: nicht reduzierend; 2: reduzierend. Der Immunoblot wurde mit einem Gemisch aus polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000) und polyklonalem anti-human kappa-light chain-AP Antikörper (1:20,000) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Die Analyse mittels Coomassie-gefärbtem Polyacrylamidgel sowie Immunoblot mit anti-human IgE und anti-human kappa-light chain Antikörper ist im Abbildung 27 dargestellt und zeigt zunächst für die nicht reduzierte Probe die dem intakten IgE-Antikörper entsprechende dominante Bande auf Höhe von 250 kDa. In der reduzierten Probe werden zwei Banden auf Höhe von etwa 70 kDa und 25 kDa nachgewiesen, welche der schweren bzw. leichten Kette des IgE entsprechen. Dies lässt auf eine korrekte Assemblierung des HMM5 IgE schließen.

Mittels eines *Sandwich*-ELISA wurde die Konzentration des in den Expressionsüberstand sekretierten humanen HMM5 IgE bestimmt. Hierbei wird ein Isotyp-spezifischer Fänger- sowie HRP-konjugierter Detektionsantikörper verwendet und mithilfe eines IgE-haltigen Serums

Ergebnisse

bekannter Konzentration eine Standardreihe erstellt. Für die serielle Verdünnungsreihe des HMM5 IgE wurde der Expressionsüberstand in der höchsten Konzentration in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt. Die Quantifizierung des IgE ergab hierbei für zwei separate Expressionen Konzentrationen von über 30 mg/L.

Die Transfektion von Sf9-Zellen mit den Bacmiden für die Expression des HyHEL 10 IgE erfolgte analog zu der oben für den HMM5 IgE beschriebenen, jedoch wurde bei der Testexpression auf eine Probenahme nach drei Tagen verzichtet und lediglich die Überstände nach fünftägiger Expression untersucht, wie in Abbildung 28 dargestellt.

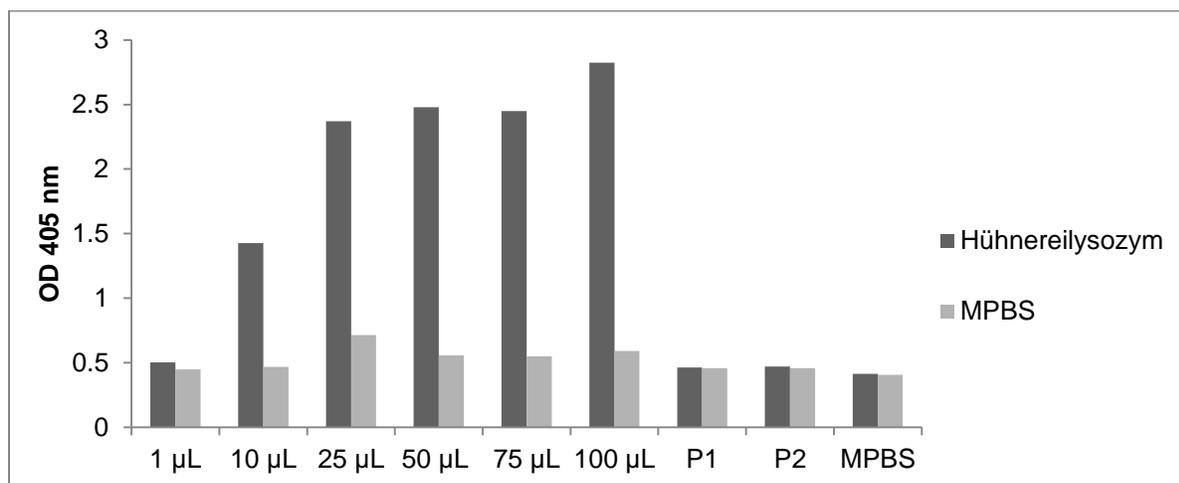


Abb. 28 ELISA zur Analyse der Expressionsraten des HyHEL 10 IgE in der Testexpression nach 5 Tagen sowie des Überstands nach Transfektion (P1) und einer Amplifikationsrunde (P2).

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit Hühnereilysozym belegt und mit 4% MPBS blockiert. Die Überstände der Testexpressionen wurden unverdünnt über Nacht inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000). Die Farbentwicklung wurde photometrisch bei 405 nm gemessen nach Inkubation mit pNPP-Substratlösung.

Die Analyse der Kulturüberstände aus der Testexpression zeigt, dass funktionaler HyHEL 10 IgE exprimiert und in den Kulturüberstand sekretiert wird, welcher sein Antigen Hühnereilysozym bindet. Jedoch wird erst bei einer Zugabe von 100 µL der Zellstocksuspension die maximale Expressionsrate erreicht. Dies entspricht der Verwendung eines 1 mL Aliquots für die Expression in einem Volumen von 300 mL. Da jedoch die Expressionsniveaus der Testexpressionen bei einer Zugabe von 25 µL bis 75 µL nur geringfügig schwächer waren, wurde für die Expression im großen Maßstab ein finales Volumen von 500 mL Sf9-Zellkultur infiziert. So sollte die erhaltene Gesamtmenge des Antikörpers maximiert werden. Nach fünftägiger Expression wurde der Expressionsüberstand mittels IMAC gereinigt und der Erfolg mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-

Färbung sowie Immunoblot unter Verwendung von polyklonalem anti-human kappa-light chain-AP Antikörper analysiert, wie in Abbildung 29 gezeigt.

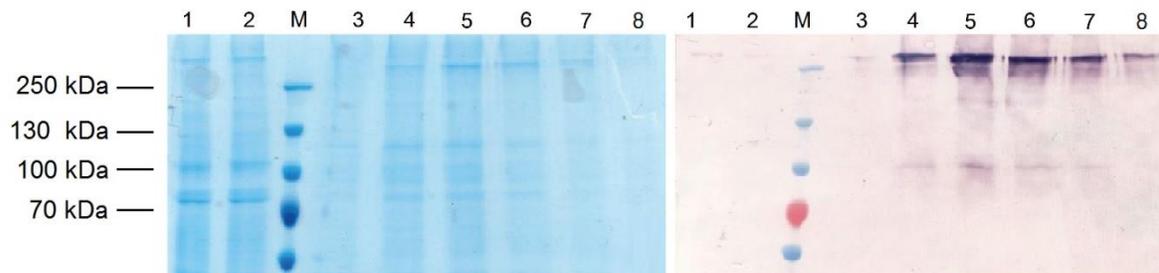


Abb. 29 Analyse der IMAC-Reinigung des humanen HyHEL 10 IgE.

SDS-PAGE mit einem 7.5% Tris-Glycin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung (links) und Immunoblot (rechts). Es wurden 1.5 μ L des Markers und jeweils 20 μ L der Proben nicht reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: Expressionsüberstand; 2: Durchlauf; 3-8: Elutionsfraktionen. Der Immunoblot wurde mit polyklonalem anti-human kappa-light chain-AP Antikörper (1:20,000) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch NBT/x-Phos-Substratlösung.

Aus der Analyse der Elutionsfraktionen der IMAC-Reinigung des humanen HyHEL 10 IgE mittels SDS-PAGE wird deutlich, dass es gelungen ist den intakten IgE-Antikörper aus dem Expressionsüberstand zu isolieren, welcher der Bande auf Höhe 250 kDa entspricht. Auch hier wurde zusätzlich ein kleineres Fragment erhalten, welches eine Laufhöhe von etwa 100 kDa zeigt und auch im Immunoblot mit anti-human kappa light chain Antikörper detektiert wird. Jedoch wird auch deutlich, dass dieser Antikörper im Vergleich zu dem HMM5 IgE ein deutlich geringeres Expressionsniveau zeigt. Eine Quantifizierung des Expressionsüberstands mittels Sandwich-ELISA ergab eine Konzentration von etwa 500 μ g/L, was einer 60-fach geringeren Expressionsrate im Vergleich zum HMM5 IgE entspricht. Die Ursachen dieser Diskrepanz sind noch unklar, jedoch sollte beachtet werden, dass es sich bei den chimären Antikörpern im Fall des HMM5 IgE um ein leporid/humanes und bei dem HyHEL10 um ein murin/humanes Konstrukt handelt. Inwieweit dieser Unterschied generell eine Beeinträchtigung des Expressionsverhaltens nach sich ziehen könnte, bleibt offen.

Aufgrund der geringen Ausbeute für den HyHEL 10 IgE wurden alle folgenden funktionellen und strukturellen Analysen ausschließlich mit dem HMM5 IgE durchgeführt.

4.2.1 Interaktionsanalysen mit Antigenen und Rezeptoren

Die korrekte Faltung und Funktionalität des IgE Fc-Teils wurde durch die Analyse mit dem IgE-spezifischen humanisierten Antikörper Omalizumab und dem hochaffinen Fc ϵ -Rezeptor I im ELISA überprüft. Omalizumab (Handelsname Xolair) ist ein humanisierter therapeutischer

Ergebnisse

Antikörper mit Spezifität für humanen IgE, welcher bei mittlerem bis schwerem allergischem Asthma eingesetzt wird. Das Epitop ist bislang unbekannt, jedoch gilt es als sicher, dass es sich im Fc-Teil des Antikörpers befindet, da Omalizumab die Bindung von IgE an seine Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen inhibiert. Für die Bindungsanalyse wurden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit dem rekombinanten humanen HMM5 IgE belegt und anschließend mit Omalizumab bzw. einem Fusionsprotein aus der α -Kette des humanen Fc ϵ RI und IgY inkubiert. Dieses Fusionsprotein erlaubt hohe Expressionsraten, gute Löslichkeit sowie eine einfache Detektion mit anti-*chicken* IgY.

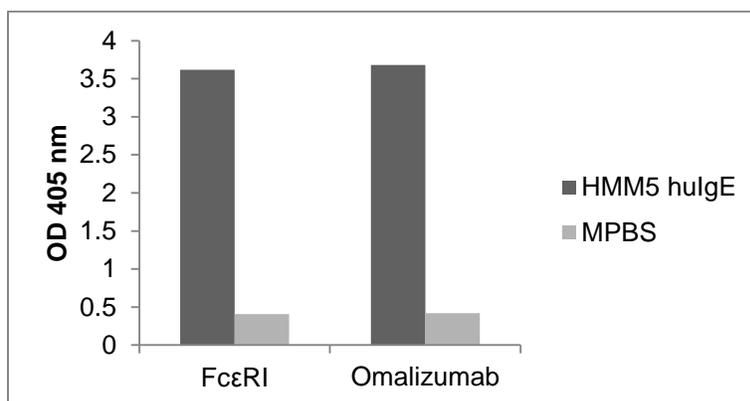


Abb. 30 ELISA zur Analyse der Reaktivität des rekombinanten HMM5 IgE mit dem hochaffinen Fc ϵ RI und dem therapeutischen anti-IgE Antikörper Omalizumab.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit humanem HMM5 IgE (50 μ g/mL) belegt und mit 4% MPBS blockiert. Die Lösungen mit dem α Fc ϵ R/IgY-Fusionsprotein und Omalizumab wurden 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalem anti-chicken IgY-AP Antikörper (1:30,000) bzw. polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:30,000). Die Farbentwicklung wurde nach Inkubation mit pNPP-Substratlösung photometrisch bei 405 nm gemessen.

Der ELISA in Abbildung 30 zeigt eindeutig, dass der HMM5 IgE sowohl durch Omalizumab als auch den hochaffinen Fc ϵ -Rezeptor I gut gebunden wird, was die strukturelle Integrität und Funktionalität des in Insektenzellen exprimierten IgE beweist.

Für eine analoge Untersuchung der Antigenbindungsstelle wurden ELISA-Analysen mit entsprechenden Antigenen durchgeführt. Der Antikörperklon HMM5 hat eine Spezifität für die CCD-Strukturen α -1,3-*core*-Fukose sowie in Kombination zu der Fukosylierung β -1,2-*core*-Xylose. Das Glykoprotein HRP hat sieben potentielle *N*-Glykosylierungsstellen und trägt als Pflanzenprotein typische Glykostrukturen vom MMXF³-Typ. Das MuxF³-Glykan unterscheidet sich vom MMXF³-Glykan ausschließlich in einer terminalen Mannose und somit in der Verzweigung. Da diese Glykane beide Epitope enthalten und sowohl HRP als auch MuxF³-HSA in der Selektion des Klons verwendet wurden, wurde die Antigenbindung des rekombinanten HMM5 IgE im ELISA mit diesen Glykoproteinen analysiert. Hierfür wurden die

Antigene auf eine ELISA-Platte gebunden und mit HMM5 IgE-Lösungen abnehmender Konzentration versetzt, um die niedrigste Konzentration zu bestimmen, mit der noch eine spezifische Bindung der Antigene erzielt werden kann.

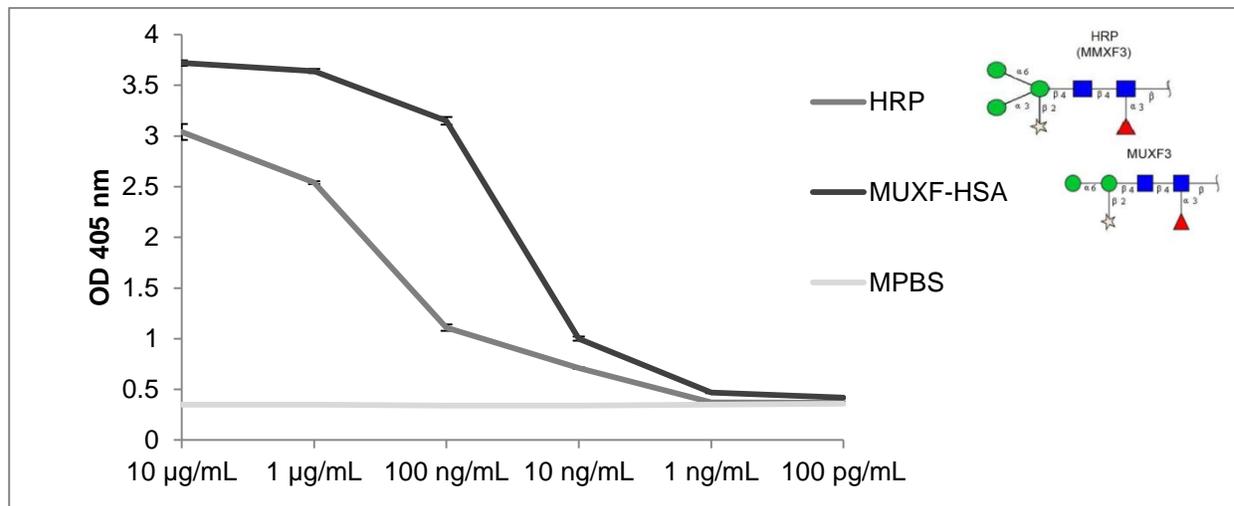


Abb. 31 ELISA zur Analyse der Reaktivität des rekombinanten humanen HMM5 IgE mit seinen Antigenen HRP und MuxF³-HSA Konjugat.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit HRP bzw. MuxF³-HSA Konjugat (20 µg/mL) belegt und mit 4% MPBS blockiert. Die Verdünnungen des HMM5 IgE wurden 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalem anti-human IgE-AP Antikörper (1:20,000). Die Farbentwicklung wurde nach Inkubation mit pNPP-Substratlösung photometrisch bei 405 nm gemessen. Der ELISA wurde als Dreifachbestimmung ausgeführt. Die Balken geben die Standardabweichung wieder.

Aus vorangegangenen Studien mit anderen Isotypen des HMM5 Antikörpers in der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass dieser sowohl HRP als auch MuxF³-Konjugate mit hoher Affinität bindet, wobei die Affinität zu MuxF³ etwas höher liegt als zu MMXF³-Glykanen. Der ELISA mit dem humanen IgE aus Sf9-Zellen bestätigt dieses Ergebnis. Die Titrationskurve zeigt außerdem, dass noch Konzentrationen von 100 ng/mL ausreichen, damit eine deutliche Bindung zu MuxF³ nachzuweisen ist. Die Titrationskurve für HRP verläuft wie erwartet flacher und eine deutliche Bindung ist hier nur bis zu IgE-Konzentrationen von minimal 1 µg/mL nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Antigenbindungsstelle im HMM5 IgE korrekt gefaltet ist und die spezifische Bindung der Antigene auch bei geringen Antikörperkonzentrationen gewährleistet ist.

Zusätzlich zu den ELISA-Studien wurde die Spezifität und Sensitivität des Antikörpers mittels des ImmunoCAP Systems (Thermo Fisher Scientific) untersucht, welches in der Allergiediagnostik routinemäßig zur Analyse von spezifischen IgE-Reaktivitäten humaner Patientenserum eingesetzt wird. Hierfür wurden verschiedene Glykoproteine, welche bekanntermaßen CCD-Strukturen tragen, einige nicht-glykosylierte Proteine und verschiedene

Ergebnisse

pflanzliche, parasitäre und Insektengiftextrakte auf der ImmunoCAP Festphase gekoppelt und der rekombinante HMM5 IgE als Analyt nach Standardmethode vermessen.

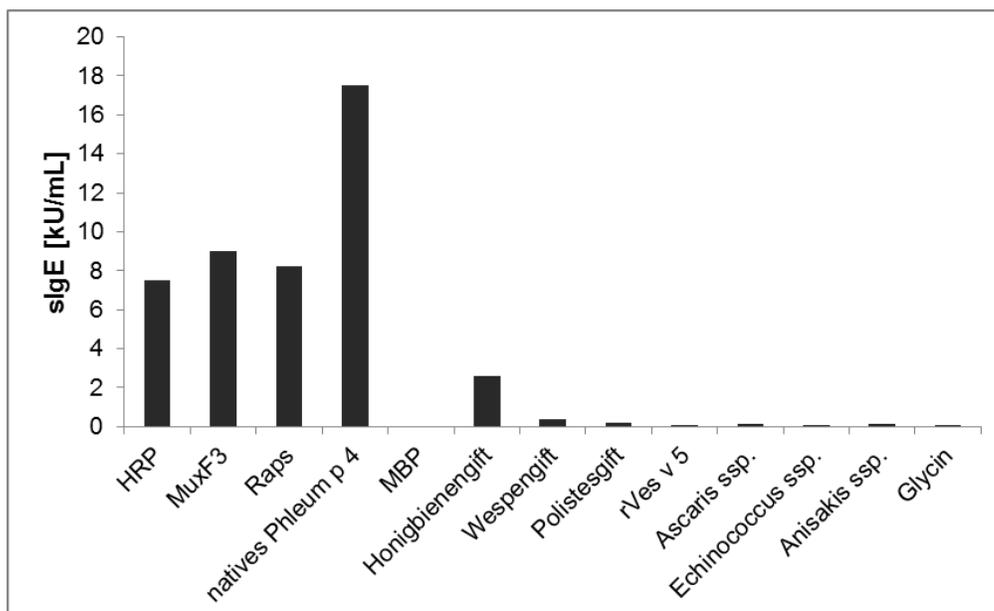


Abb. 32 Immunoreaktivität des rekombinanten HMM5 IgE mit verschiedenen natürlichen und rekombinanten Proteinen sowie Allergie-relevanten Extrakten analysiert mittels ImmunoCAP.

Die Messung wurde an einem Phadia 250 Gerät nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Reaktivitätsanalyse des HMM5 IgE im ImmunoCAP. Hier wird zunächst deutlich, dass auch in diesem Testsystem HRP und MuxF³ gebunden werden, während nicht-glykosylierte Proteine wie MBP und rekombinantes Ves v 5 ebenso wie die als Negativkontrolle dienende Aminosäure Glycin keine Reaktivitäten zeigen. Neben HRP und MuxF³ werden auch andere pflanzliche Strukturen, wie Rapsextrakt und natives Phl p 4, ein Majorallergen aus dem Wiesen-Lieschgrass *Phleum pratense*, mit besonders hoher Reaktivität erkannt. Mit geringerer Reaktivität wurde das ebenfalls stark glykosylierte Bienengift erkannt und in geringem Maße auch Wespengift. Vorrangegangene Studien haben gezeigt, dass Feldwespengiftkomponenten im Gegensatz zu anderen Hymenoptereingiftallergenen keine CCDs tragen, was hier die fehlende Reaktivität im ImmunoCAP erklärt. Diese spezifischen Erkennungsmuster lassen sich durch die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von Pflanzen- und Insektenproteinen erklären. In Pflanzen werden generell beide für die Antikörperbindung relevanten CCD-Strukturen, die α -1,3-core-Fukose und die β -1,2-Xylose, etabliert. Die hier untersuchten Insektengiftextrakte - mit Ausnahme des Feldwespengifts - tragen hingegen ausschließlich α -1,3-core-Fukose. Interessanterweise zeigt der HMM5 IgE mit den parasitären Extrakten praktisch keine

Reaktivität obwohl putativ auch Helminthen diese CCDs etablieren. Getestet wurden hier Extrakte von Spulwürmern (*Ascaris ssp.*), Bandwürmern (*Echinococcus ssp.*) und Fadenwürmer (*Anisakis ssp.*). Es scheinen hier also andere Effekte eine spezifische Erkennung der Extrakte zu verhindern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl der Fc-Teil als auch die Antigenbindungsstelle des rekombinanten humanen HMM5 IgE aus Sf9 Zellen, in korrekt gefalteter Form vorliegen und die erwartete Interaktionen mit Antigenen, dem hochaffinen Rezeptor und spezifischen Antikörpern zeigten.

4.2.2 Analyse der Glykosylierung

Der vermutlich größte Unterschied der Expression in Sf9-Zellen im Vergleich zu der üblicheren Mammalia-Expression in HEK-293- oder auch CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*), liegt vermutlich in der posttranslationalen Modifikation der Proteine und besonders den etablierten Glykosylierungsmustern. Dies spielt für die Expression von Antikörpern und IgE im speziellen eine große Rolle, da IgE mit sieben *N*-Glykosylierungsstellen hochgradig glykosyliert ist und außerdem bekannt ist, dass Art und Ausmaß der Glykosylierung starken Einfluss auf die Struktur und die Rezeptorbindung haben. Während Mammaliazellen hauptsächlich Glykane vom Komplextyp etablieren, findet man auf Sf9-Zell exprimierten Proteinen überwiegend oligomannosidische und paucimannosidische Strukturen.

Die Glykosylierung des rekombinanten humanen IgE aus Insektenzellen wurde zunächst im ELISA mit verschiedenen Lektinen analysiert. Hierfür wurde zum einen GNA verwendet, das terminale Mannose, welche an Mannose in einer Reihe von verschiedenen Verknüpfungen, einschließlich α -1,3, α -1,6 und α -1,2, gebunden ist, erkennt. Zum anderen wurde das Lektin AAL eingesetzt, welches spezifisch für Fukose in α -1,6 und α -1,3-Verknüpfung an GlcNAc ist. Als Referenz wurde ein HEK-293-Zell-exprimierter IgE verwendet, welcher humane Glykostrukturen aufweisen sollte. Da der Klon HMM5 in HEK-293-Zellen als IgE-Isotyp keine nachweisbare Expression zeigt, wurde für die Lektin-Analyse der Klon 425 verwendet. Dieser Antikörper ist spezifisch für den EGFR und eine stabil exprimierende HEK-Zelllinie lag im Arbeitskreis bereits vor. Der 425-IgE wurde in HEK-293-Zellen nach etabliertem Protokoll in einem Volumen von 500 mL exprimiert und anschließend mittels IMAC gereinigt. Als Kontrollprotein für den ELISA wurde nicht glykosyliertes rekombinantes MBP verwendet.

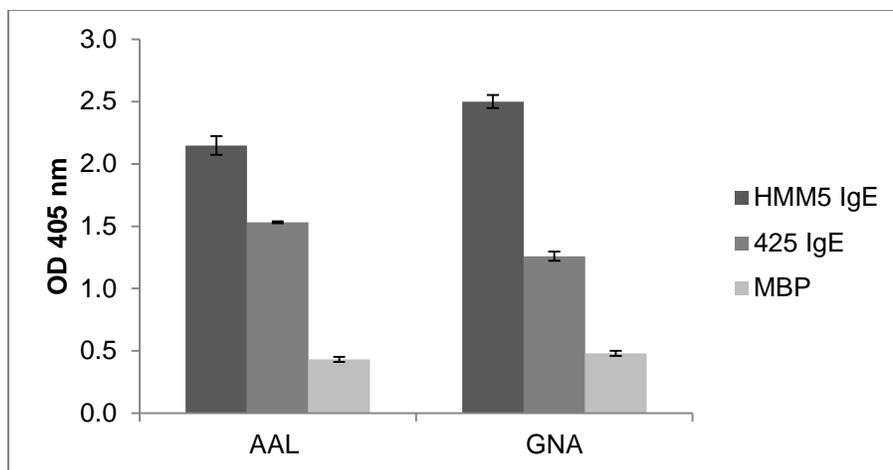


Abb. 33 ELISA zur Analyse der Glykosylierung von rekombinanten humanen IgE-Antikörpern verschiedener Expressionssysteme mittels Lektinen.

Es wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit dem in Insektenzellen produzierten und dem HEK-293-Zell exprimierten IgE sowie nicht glykosylierten MBP (10 µg/mL) belegt und anschließend mit Carbo-Free Blocking Solution blockiert. Biotyniliertes AAL bzw. GNA (10 µg/mL) wurden mit ExtrAvidin-AP (1:20,000) vorinkubiert und anschließend 1 Stunde bei RT in den Vertiefungen inkubiert. Die Farbentwicklung wurde nach Inkubation mit pNPP-Substratlösung photometrisch bei 405 nm gemessen. Der ELISA wurde als Dreifachbestimmung ausgeführt. Die Balken geben die Standardabweichung wieder.

Die Analyse der rekombinanten IgE-Antikörper unterschiedlicher Expressionssysteme zeigt zunächst, dass beide Antikörper in einem gewissen Maß glykosyliert sind. Darüber hinaus sind die Signale mit AAL und GNA deutlich höher für den in Sf9-Zellen exprimierten HMM5 IgE als für den HEK-293-Zell exprimierten 425 IgE. Die etwas höhere Reaktivität von AAL mit dem HMM5 IgE lässt auf ein stärkeres Maß an Fukosylierung in Insektenzellen im Vergleich zu HEK-293-Zellen schließen. Da das Vorhandensein von α -1,3-core-Fukosylierungen in Sf9-Zellen als unwahrscheinlich gilt [148], ist davon auszugehen, dass ähnlich wie auch HEK-293-Zellen Sf9-Zellen ein relativ hohes Maß an α -1,6-core-Fukose etablieren. Ein deutlicherer Unterschied ist in den Reaktivitäten der IgE-Antikörper mit GNA zu erkennen. Dies deutet auf einen höheren Anteil an Mannose-Resten in dem Sf9-Zell exprimierten IgE hin, was in Übereinstimmung mit den Erwartungen von größtenteils oligomannosidischen und paucimannosidischen Glykanen im Gegensatz zu dem großen Anteil von Komplextypglykanen in HEK-293-Zellen steht.

Für eine detaillierte Betrachtung der Glykosylierung des humanen IgE aus Sf9-Zellen wurde eine massenspektrometrische Analyse der schweren Kette durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande, welche der schweren Kette des IgE entsprach, wurde anschließend ausgeschnitten. Nach enzymatischer Spaltung mit verschiedenen Proteasen wurden die

erhaltenen Glykopeptide mittels MALDI-TOF analysiert. Die Auswertung beschränkt sich aufgrund der komplexen Daten auf die Glykosylierungsstelle 3 (Asn218), da eine Reihe von Glykopeptiden detektiert und zugeordnet werden konnten, welche diese Glykosylierungsstelle enthielten. Abbildung 34 zeigt stellvertretend ein repräsentatives Massenspektrum, welches nach tryptischen Verdau der schweren Kette des in Sf9-Zellen exprimierten HMM5 IgE und Anreicherung der Peptide über R2-Matrix erhalten wurde. Die intensivsten Peaks konnten einem Glykopeptid zugeordnet werden, welches die unterschiedlichen schematisch eingezeichneten Glykane trugen.

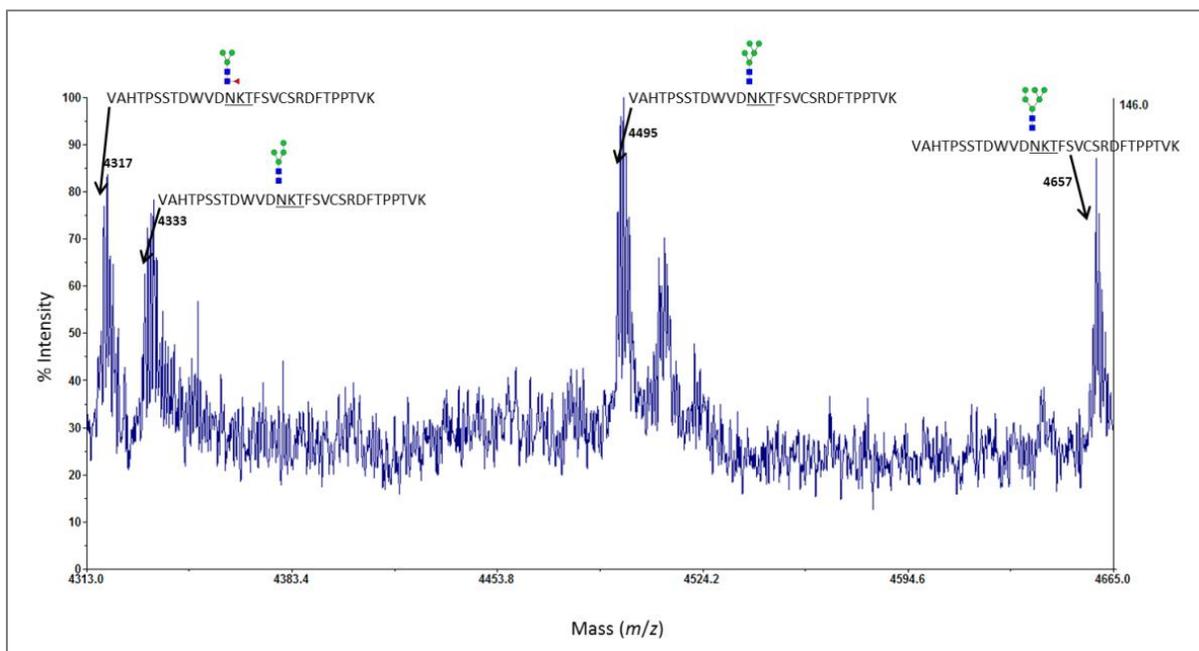


Abb. 34 Massenspektrum der HMM5 IgE schweren Kette nach Verdau mit Trypsin im m/z Bereich von 4313 bis 4665.

Das mittels MALDI-TOF erhaltene Spektrum wurde nach tryptischen Verdau der schweren Kette des in Sf9-Zellen exprimierten HMM5 IgE und Anreicherung der Peptide über R2-Matrix gemessen. Die intensivsten Peaks korrespondieren mit einem identischen Peptid, welches die Glykosylierungsstelle 3 (Asn 218) enthält. Die Peptidsequenz sowie die Struktur des enthaltenen Glykans sind den Peaks zugeordnet (blaue Quadrate stellen N-Acetylglucosamin dar, grüne Kreise Mannose und rote Dreiecke Fukose).

Die übrigen erhaltenen Massenspektren wurden analog zu dem in Abbildung 34 gezeigten manuell ausgewertet und die Glykopeptide, die eindeutig den gefundenen Peaks zugeordnet werden konnten, sind mit der Peptidsequenz und der Glykanstruktur in Tabelle 6 für die Glykosylierungsstelle 3 aufgelistet.

Ergebnisse

Tab. 6 Mittels MALDI-TOF identifizierte N-Glykane der Glykosylierungsstelle 3 (Asn 218) der schweren Kette des in Sf9-Zellen exprimierten humanen HMM5 IgE.

Die schwere Kette des rekombinanten IgE wurde mit den angegebenen Enzymen proteolytisch verdaut und die Peptide anschließend über R2-Matrix aufkonzentriert. Cystein- und Methioninreste können carbaminomethyliert (car) vorliegen. Die konservierte N-Glykosylierungsstelle ist unterstrichen. Die Glykanstrukturen sind in der gewohnten Weise dargestellt: blaue Quadrate stellen N-Acetylglukosamin dar, grüne Kreise Mannose und rote Dreiecke Fukose.

Protease	Peptidsequenz	Experimentelle <i>m/z</i>	N-Glykanstruktur
Trypsin	VAHTPSSTDWVD <u>DNK</u> TFSV (car)SR	3432	
Trypsin	VAHTPSSTDWVD <u>DNK</u> TFSVCSR DFTPPTVK	4317	
Trypsin	VAHTPSSTDWVD <u>DNK</u> TFSVCSR DFTPPTVK	4333	
Trypsin	VAHTPSSTDWVD <u>DNK</u> TFSVCSR DFTPPTVK	4495	
Trypsin	VAHTPSSTDWVD <u>DNK</u> TFSVCSR DFTPPTVK	4657	
Chymotrypsin	VD <u>DNK</u> TFSV(car)SRDF	2791	
Proteinase K	<u>DNK</u> T	1515	
Proteinase K	VD <u>DNK</u> T	1614	
Proteinase K	<u>DNK</u> T	2179	
Proteinase K	VD <u>DNK</u> T	2278	

Für die Position Asn218 wurden verschiedene oligo- und paucimannosidische Strukturen gefunden, wobei ein Teil der paucimannosidischen Glykane zusätzlich fukosyliert war. Aus

den oben erwähnten Gründen wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um α -1,6-Fukose handelt. Für die übrigen Glykosylierungsstellen konnten insgesamt weniger Glykopeptide identifiziert werden und die Zuordnung war weniger eindeutig möglich. Jedoch wurden auch für die Glykosylierungsstellen 2, 5 und bemerkenswerter Weise 6, welche im nativen humanen IgE unbesetzt ist, ähnliche Strukturen gefunden. Insgesamt bestätigt die glykoproteomische Analyse mittels Massenspektrometrie also die Erwartungen und die Ergebnisse der Analyse mittels Lektinen, dass das Glykosylierungsmuster des rekombinanten humanen IgE bei der Expression in Sf9-Insektenzellen zu oligo- und paucimannosidischen Glykanen verschoben ist.

4.2.3 Bestimmung der Affinität mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) wurden die Affinitäten des rekombinanten humanen HMM5 IgE zu den Antigenen HRP und MuxF³-HSA Konjugat bestimmt. Hierfür wurden die Antigene auf die Oberfläche jeweils einer Flusszelle eines CM5-Chips gekoppelt und der IgE in Konzentrationen zwischen 0.4525 nM und 277.8 nM als Analyt in der mobilen Phase darüber geleitet. Für die Messung wurde mittels *IgE-Quantitation Set* quantifizierter Sf9-Kulturüberstand eingesetzt. Zur Detektion der unspezifischen Bindung wurde auf der Oberfläche einer weiteren Flusszelle HSA immobilisiert und bei der Messung der Wert, der hier gemessenen *response units* RU abgezogen.

Die Echtzeitmessung von Assoziation und Dissoziation unterschiedlicher Analytkonzentrationen lieferte einzelne Sensogramme. Anhand dieser Kurvenverläufe kann auf das Bindungsverhalten des Antikörpers mit den entsprechenden Liganden zurückgeschlossen werden. Die Auswertung der Sensogramme erfolgte mittels des *steady-state* Affinitätsmodells unter Nutzung des Langmuir 1:1 Bindungsmodells. Dies lieferte die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (K_a) und Dissoziation (K_d), woraus die Equilibriumsdissoziationskonstante oder auch Bindungskonstante K_D als K_d/K_a errechnet wurde. Die Bindungskonstante K_D ist ein Maß für die Affinität des Analyten zu dem Liganden. Abbildung 35 zeigt die erhaltenen Sensogramme der Echtzeitmessung bei der Bindung und Dissoziation von HMM5 IgE an HRP bzw. MuxF³-HSA Konjugat.

Ergebnisse

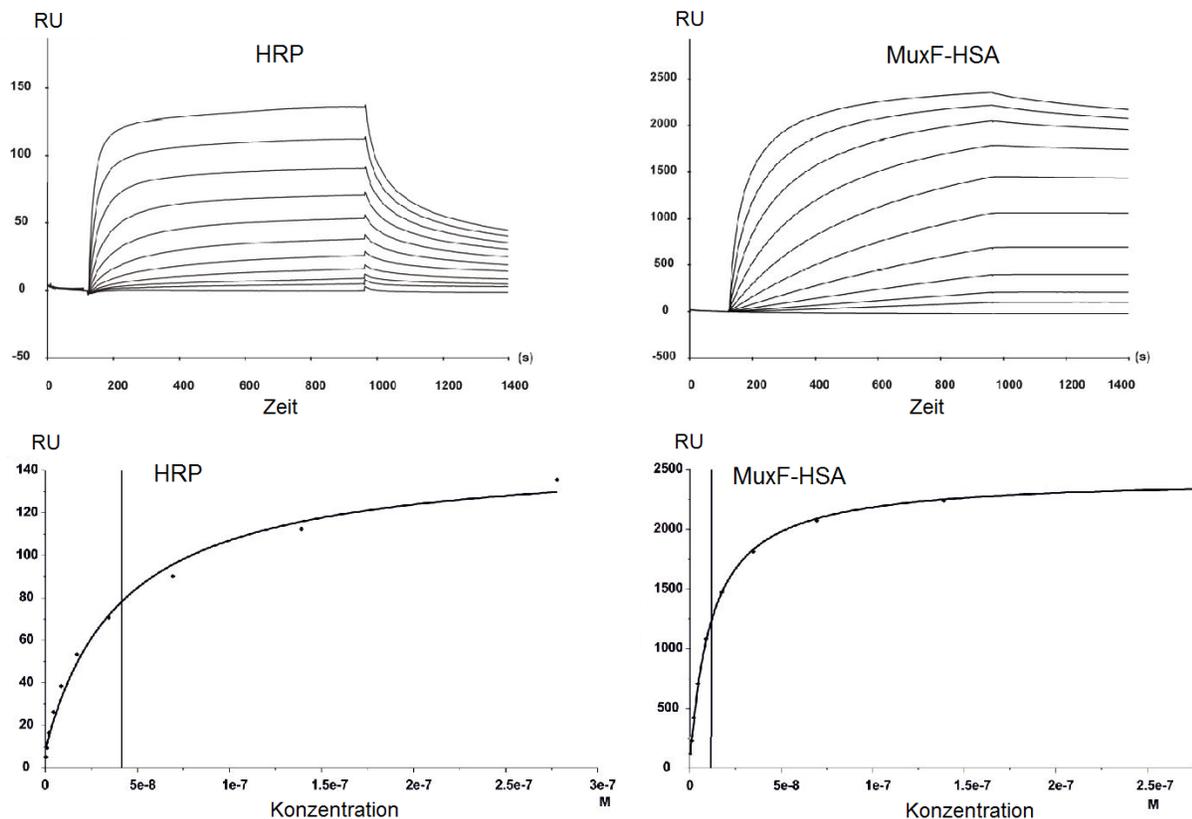


Abb. 35 SPR Analyse verschiedener Konzentrationen HMM5 IgE als Analyt mit HRP bzw. MuxF³-HSA-Konjugat als Ligand.

Die Messung erfolgte an einem Biacore T200-Biosensor, die Auswertung mit der dazugehörigen Software. Der Analyt wurde mit einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Die Assoziationsphase wurde für 840 s aufgezeichnet, die Dissoziationsphase für 600 s. Die Sensoroberfläche wurde nach jeder Messung regeneriert. Die konzentrationsabhängigen Kurven wurden mittels *steady-state* Affinitätsmodell analysiert.

Die Auswertung der SPR-Analysen ergab einen K_D von $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ für die Bindung des HMM5 IgE mit HRP und $1 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ für die Bindung mit MuxF³-HSA Konjugat. Diese hohen Affinitäten bestätigen die spezifische Bindung beider Kohlenhydrat-Epitope, welche bereits im ELISA gezeigt werden konnte. Auch die höhere Affinität des Antikörpers zu MuxF³ im Vergleich zu HRP konnte bereits im ELISA gezeigt werden.

4.2.4 Degranulationsassay mit humanisierten RBL-SX38-Zellen

Um die biologische Aktivität des rekombinanten HMM5 IgE aus Sf9-Zellen zu analysieren, wurde dessen Fähigkeit zur Degranulation von RBL-SX38 Zellen durch Quervernetzung des IgE-Antikörpers untersucht. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um basophile Leukämie-Zellen aus der Ratte, welche mit dem humanen Fc ϵ RI stabil transfiziert sind und diesen somit auf

ihrer Oberfläche tragen. Damit können sie als Modellzelllinie verwendet werden, um die IgE-medierte Degranulation von humanen Mastzellen und basophilen Granulozyten zu imitieren. Durch die Degranulation werden eine Reihe von Entzündungsmediatoren freigesetzt, neben Histamin und Serotonin u.a. auch β -Hexosaminidase. Dieser Mediator setzt das Substrat p-Nitro-phenyl-*N*-acetyl- β -D-Glukosamin (pNAG) um, welches nach Zugabe von Natriumcarbonat ein chromogenes Produkt ergibt und somit bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann. Dabei korreliert die Menge der freigesetzten β -Hexosaminidase und somit des chromogenen Produkts mit dem Maß der Degranulation.

Die posttranslationale Modifikation des humanen IgE, welcher in Sf9-Insektenzellen exprimiert wurde, unterscheidet sich von der eines IgE humaner Herkunft, was insbesondere für die Glykosylierung bereits gezeigt wurde. Um zu gewährleisten, dass der rekombinante IgE unabhängig davon das Potenzial zur zellulären Aktivierung besitzt, wurden mittels Degranulationsassay der Insektenzell-exprimierte HMM5 IgE mit HEK-293-Zell-exprimiertem 425 IgE und nativem Myeloma IgE verglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Antigen-spezifitäten der einzelnen Antikörper, wurde für eine bessere Vergleichbarkeit antigenunabhängig mit polyklonalem anti-human IgE Antikörper quervernetzt.

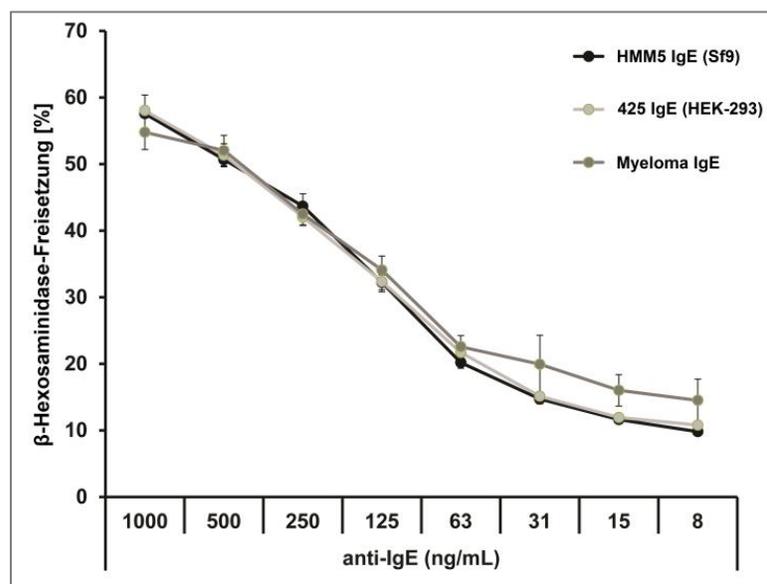


Abb. 36 Degranulationsassay von RBL-SX38-Zellen durch Bindung von humanen IgE-Antikörpern aus Sf9-Zellen, HEK-293-Zellen und Myeloma IgE und Quervernetzung mit anti-human IgE.

Die RBL-SX38-Zellen wurden eine Stunde mit dem jeweiligen IgE inkubiert. Die Degranulation wurde anschließend über die Zugabe von anti-human IgE Antikörper in sinkenden Konzentrationen induziert. Die Freisetzung der β -Hexosaminidase wurde photometrisch nach Zugabe des Substrats pNAG bei 405 nm detektiert. Die IgE-induzierte Freisetzung der β -Hexosaminidase wurde mit der durch Zellyse erreichten Gesamtmenge prozentual errechnet. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Balken geben die Standardabweichung wieder.

Der Degranulationsassay zeigt, dass der in Sf9-Zellen exprimierte HMM5 IgE in gleichem Maße wie der in HEK-293-Zellen exprimierte 425 IgE und nativer Myeloma IgE zur Aktivierung und Degranulation von Basophilen in der Lage ist. Die Quervernetzung des rezeptorgebundenen IgE aus Sf9-Zellen mit anti-human IgE Antikörper führte zu einer nahezu identischen zellulären Aktivierung wie bei Verwendung von HEK-293-Zell-exprimiertem IgE und nativem Myeloma IgE. Auch mit niedrigen Konzentrationen des quervernetzenden Antikörpers von bis zu 30 ng/mL konnte noch eine effiziente Degranulation ausgelöst werden. Dieses Ergebnis legt eindeutig nahe, dass die Expression in Sf9-Insektenzellen einen humanen IgE liefert, welcher unabhängig von der modifizierten Glykosylierung das Potenzial zur Bindung an den humanen FcεRI und dessen Quervernetzung hat. Damit kann von voller biologischer Aktivität des HMM5 IgE ausgegangen werden.

4.2.5 enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding (ELIFAB)

Der ELIFAB Assay wird durchgeführt, um die blockierende Aktivität allergenspezifischer IgG₄-Antikörper und somit indirekt auch den Erfolg einer SIT bei Patienten zu messen. Hierfür wird zunächst monomeres sCD23 auf eine ELISA-Mikrotiterplatte gebunden. Ein Indikatorserum, welches von einem atopischen Patienten mit hohem spezifischem IgE-Titer stammt, wird mit dem Testserum eines Patienten nach SIT und dem Allergen vorinkubiert. Eine Probe aus Indikatorserum mit dem Allergen alleine dient als Standard. Diese Proben werden dann in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben, sodass IgE-Allergen-Komplexe an CD23 binden. Hierbei gilt, dass überwiegend IgE-Allergen-Komplexe und kaum monomeres gebundener IgE detektiert werden, da die Bindung an CD23 vermutlich die Bindungsstelle für den Detektionsantikörper maskiert [149]. Die IgG₄-Antikörper aus dem Testserum inhibieren die Komplexbildung, sodass das gemessene Signal dadurch umgekehrt proportional zu den IgG₄-Titern des SIT-Patienten verringert wird. In dem hier beschriebenen Ansatz wurde das dafür bislang verwendete humane Indikatorserum durch den rekombinanten HMM5 IgE aus Sf9-Zellen ersetzt. Da humane Seren natürlichen Schwankungen in IgE-Klonalität und -Titern sowie auch anderer Antikörperisotypen unterliegen war es bislang durch Nutzung dieser als Indikator nicht möglich den ELIFAB Assay zu standardisieren. Durch Einsatz rekombinanter humaner IgE-Antikörper definierter Qualität und Konzentration sollte dies möglich gemacht werden. Die Verwendung des HMM5 IgE mit HRP als Antigen sollte als Modellsystem die generelle Machbarkeit beweisen. Hierfür wurden drei Patientenseren getestet, welche unterschiedlich hohe IgG-Reaktivitäten mit CCDs zeigten, was anhand der Bindung von HRP getestet wurde.

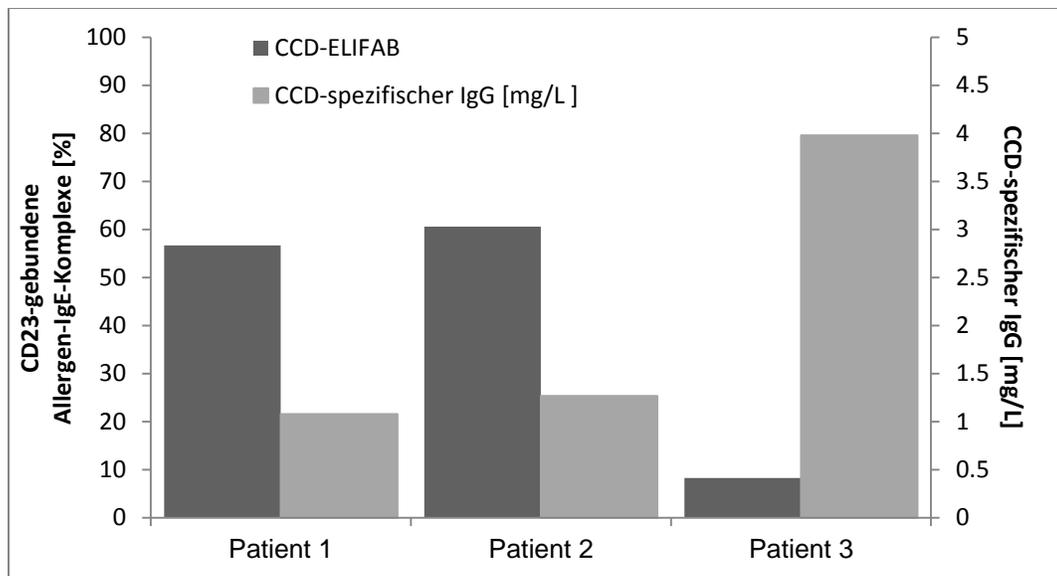


Abb. 37 ELIFAB Analyse von drei ausgewählten Patientenserum mit unterschiedlichen HRP-spezifischen IgG-Titern unter Nutzung von rekombinatem humanem HMM5 IgE als Indikatorserum.

Dargestellt ist jeweils in hellgrau der HRP-spezifische IgG-Titer der Patienten sowie in dunkelgrau die Bindung von IgE-HRP-Immunkomplexen nach Inkubation des Patientenserums mit HRP und dem HMM5 IgE an immobilisiertes sCD23 als prozentualer Wert im Vergleich zur Bindung ohne Patientenserum.

Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der ELIFAB Analyse für die drei Patientenserum. In grau sind die ermittelten HRP-spezifischen IgG-Titer der humanen Seren gezeigt, in schwarz das ELIFAB-Signal, welches durch Berechnung der prozentualen Bindung von IgE-HRP-Komplexen an immobilisiertes monomeres CD23 nach Inkubation des Patientenserums mit dem Antigen und dem rekombinanten HMM5 IgE detektiert wurde im Vergleich zu dem Signal, welches ohne das Patientenserum gemessen wurde und als 100% gesetzt wurde. Es konnte hier zunächst gezeigt werden, dass für die drei verwendeten Seren eine deutliche Verringerung des ELIFAB-Signals erreicht werden konnte, indem ein Patientenserum während der Komplexbildung zugesetzt wurde. Außerdem steigt das Ausmaß dieser Verringerung des Signals mit zunehmenden HRP-spezifischen IgG₄-Titern im Patientenserum. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erwartungen überein und beweisen, dass der eingesetzte rekombinante humane IgE aus Sf9-Insektenzellen in der Lage ist Komplexe mit seinem Antigen HRP zu bilden und dass diese Komplexe von CD23 effizient gebunden werden. Außerdem wird diese Komplexbildung, ebenso wie bei der Verwendung von nativen humanen IgE-Antikörpern, in Anwesenheit von antigenspezifischen humanen IgG₄-Antikörpern blockiert. Damit liegt zunächst ein weiterer Beweis für die Funktionalität des in Sf9-Zellen exprimierten HMM5 IgE vor. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse allerdings auch, dass alle

Voraussetzungen für den Einsatz rekombinanter monoklonaler IgE Antikörper als Ersatz für humane Indikatorseren prinzipiell erfüllt sind.

4.3 Strukturelle Analyse des CCD-spezifischen humanen IgE mittels *small angle X-ray scattering* (SAXS)

Die Strukturaufklärung von Antikörpern des IgE-Isotyps war bislang durch die schlechte Zugänglichkeit ausreichender Mengen intakten IgEs limitiert. Empirische strukturelle Daten liegen daher nur für Fc-Fragmente des Antikörpers vor. Die rekombinante Expression des humanen HMM5 IgE in hohen Ausbeuten erlaubte nun erstmals die Strukturanalyse mittels *small angle X-ray scattering* (SAXS).

SAXS-Messungen beruhen auf der Streuung von Röntgenstrahlung an gelösten Partikeln, wobei sehr kleine Streuwinkel gemessen werden, welche Rückschluss auf Größe und Form der untersuchten Partikel erlauben. Die Methode ermöglicht die strukturelle Analyse auch von biologischen Makromolekülen und Komplexen in Lösung unter nahezu physiologischen Bedingungen mit einer Auflösung im nm-Bereich. Der entscheidende Vorteil gegenüber der Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie ist sicherlich, dass es nicht notwendig ist geordnete Kristalle zu produzieren, was den Aufwand erheblich reduziert. Jedoch muss die Proteinprobe sehr rein sein, da Verunreinigungen durch Fremdprotein, Abbauprodukte oder im Besonderen auch Proteinaggregate die eingestrahlte Röntgenstrahlung ebenfalls streuen und das Signal der Zielstruktur überlagern würden. Obwohl bei weitem keine atomare Auflösung erreicht wird, können aus den erhaltenen Streudaten bereits durch *ab initio* Verfahren wichtige Informationen über die Konformation von Proteinen gewonnen werden. Obwohl es prinzipiell auch möglich ist die erhaltenen SAXS-Daten für Modelling-Strategien zu nutzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich zuverlässigere Modell-unabhängige Analysen durchgeführt.

4.3.1 Probenvorbereitung des humanen IgE für die SAXS-Messung

Um ein möglichst überlagerungsfreies Signal zu erhalten, muss die zu untersuchende Probe für SAXS-Messungen äußerst rein sein. Der in Sf9-Zellen exprimierte und aus dem Kulturüberstand mittels IMAC gereinigte humane HMM5 IgE wurde daher über zwei weitere Chromatographieschritte gereinigt. 20 mg des IMAC-gereinigten HMM5 IgE wurden zunächst mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt, welche es erlaubt Proteine aufgrund ihrer Nettoladung zu trennen. Hierfür wurde eine 1 mL SourceS Säule verwendet. Aus

Kapazitätsgründen des Säulenmaterials wurden zwei identische Läufe durchgeführt und die Proben anschließend vereinigt. Abbildung 38 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil des ersten Laufs in einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel, wobei deutlich wird, dass ein Teil des kleineren Fragments, welches auf Höhe von etwa 80 kDa läuft, aus der Probe entfernt werden konnte.

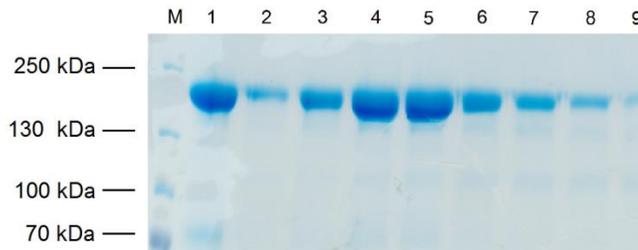


Abb. 38 Analyse der Kationenaustauschchromatographie des humanen HMM5 IgE.

SDS-PAGE mit einem 7.5% Tris-Glycin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung. Es wurden 1.5 μ L des Markers und jeweils 25 μ L der Proben nicht reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1: IMAC gereinigter HMM5 IgE vor Kationenaustausch; 2-9: Elutionsfraktionen.

Nach der Kationenaustauschchromatographie wurden die Elutionsfraktionen beider Läufe, die das Zielprotein in guter Reinheit enthielten, vereinigt und unter Verwendung einer Ultrazentrifugationseinheit (MWCO 15 kDa) auf ein Volumen von 500 μ L eingengt, wobei gleichzeitig der Puffer gegen den Laufpuffer für die Gelfiltration ausgetauscht wurde. Insgesamt wurde so eine Menge von 9 mg HMM5 IgE erhalten und über eine 24 mL Superdex 200 Gelfiltrationssäule gereinigt, um in der Probe befindliche Proteinaggregate abzutrennen. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert.

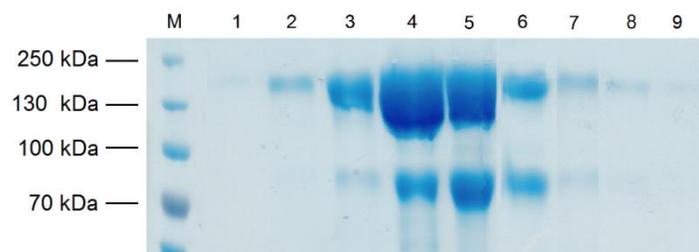


Abb. 39 Analyse der Gelfiltration des humanen HMM5 IgE.

SDS-PAGE mit einem 7.5% Tris-Glycin-Gel nach anschließender Coomassie-Färbung. Es wurden 1.5 μ L des Markers und jeweils 25 μ L der Proben nicht reduzierend aufgetragen.

M: PageRuler Plus prestained, 1-9: Elutionsfraktionen.

Abbildung 39 zeigt das Elutionsprofil der Gelfiltration des HMM5 IgE, woraus hervorgeht, dass trotz extensiver Reinigungsschritte die Verunreinigung, welche bei etwa 80 kDa läuft nicht

entfernt werden konnte. Da sich diese Bande zuvor im Western Blot mit anti-human IgE-Antikörper detektieren ließ, wird davon ausgegangen, dass es sich um ein Fragment des IgE handelt, welches die schwere Kette enthält. Da es sich in der Probe zwar abreichern aber nicht ganz entfernen ließ, ist nicht ausgeschlossen, dass der intakte HMM5 IgE im Laufe der Zeit degradiert und dieses Fragment abspaltet. Daher wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet und stattdessen zeitnah die SAXS-Messung durchgeführt. Die Fraktionen, die den HMM5 IgE enthielten wurden vereinigt und mittels einer Ultrazentrifugationseinheit (MWCO 15 kDa) auf ein Volumen von 500 μ L eingengt, wobei die finale Proteinkonzentration 5.4 mg/mL betrug.

4.3.2 *ab initio* Verfahren zur Strukturaufklärung des humanen IgE

Die SAXS-Daten wurden mittels eines optimierten Prototypen der kommerziell erhältlichen *three-pinhole* NanoSTAR Kamera (Bruker AXS) aufgenommen. Es wurden drei serielle 1:2 Verdünnungen der Probe vermessen, um Konzentrationseffekte zu minimieren und Aggregation der Probe zu verhindern. Die Auswertung wurde für die höchste Konzentration des HMM5 IgE von 5.4 mg/mL vorgenommen, da die erhaltenen Streuintensitäten für die geringer konzentrierten Proben zu niedrig waren und selbst bei dieser verhältnismäßig hohen Proteinkonzentration keine Aggregation beobachtet werden konnte.

Für die Strukturanalyse wurden die SAXS-Daten mittels Modell-unabhängiger *ab initio* Verfahren ausgewertet. Diese lassen zum einen eine Qualitätskontrolle der verwendeten Probe zu, da beispielsweise Monodispersität sowie Konzentrations- und Aggregationseffekte gezeigt werden können. Zum anderen können zuverlässig erste Aussagen zu Größe und Form des HMM5 IgE gemacht werden. Der Vorteil dieses Vorgehens ist, dass lediglich eine mathematische Auswertung der Daten vorgenommen wird und keine *a priori* Informationen benötigt werden, welche die Ergebnisse beeinflussen würde.

Die erhaltenen Streudaten werden zunächst zur Datenreduktion radial integriert, sodass eine eindimensionale Kurvendarstellung möglich wird. Der Guinier-Plot trägt den natürlichen Logarithmus der Streuintensität gegen das Quadrat des Streuvektors auf und lässt eine erste Beurteilung der Probenqualität zu. Eine Nicht-Linearität des Guinier-Plots lässt auf Aggregation der Probe oder interpartikuläre Wechselwirkungen schließen.

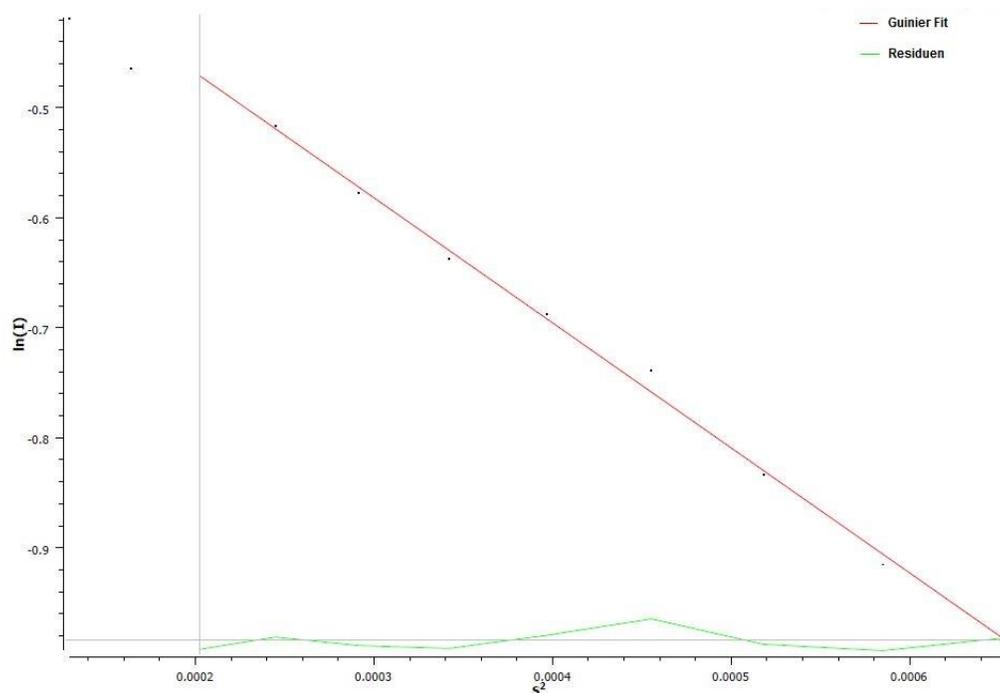


Abb. 40 Guinier-Plot der erhaltenen SAXS-Daten aus der Messung des HMM5 IgE.

In rot ist die Guinier-Näherung eingezeichnet, in grün die Residuen, die die Abweichung der realen Daten zur idealen Gerade angeben. Die Linearität der Daten indiziert eine monodisperse und ausreichend verdünnte Probe des HMM5 IgE.

Abbildung 40 zeigt die Auftragung des Guinier-Plots ($\ln(I)$ gegen s^2) für die SAXS-Messung des HMM5 IgE. Die Abweichung der Guinier-Näherung zu der idealen Gerade ist für fast alle Datenpunkte äußerst gering. Es ist aufgrund dieser Linearität also insgesamt von einer guten Probenqualität mit hoher Monodispersität auszugehen. Auch Wechselwirkungen zwischen IgE-Molekülen sollten trotz der relativ hohen Probenkonzentration so ausgeschlossen werden können. Aus dem Guinier-Plot lässt sich außerdem der Streumasseradius des HMM5 IgE berechnen. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich ein Streumasseradius von $52.7 \text{ \AA} \pm 0.86 \text{ \AA}$, was im Rahmen des erwarteten hydrodynamischen Radius eines Antikörpers liegt und somit die Qualität der Daten unterstreicht.

Abbildung 41 zeigt die logarithmische Auftragung der Streuintensität I gegen den Streuvektor s sowie die indirekte Fourier Transformation der Daten. Die Indirekte Fourier Transformation (IFT) lässt ein intuitiveres Verständnis der Partikelgröße zu, da sie den realen Raum betrachtet im Gegensatz zu dem Guinier-Plot, welcher den reziproken Raum beschreibt.

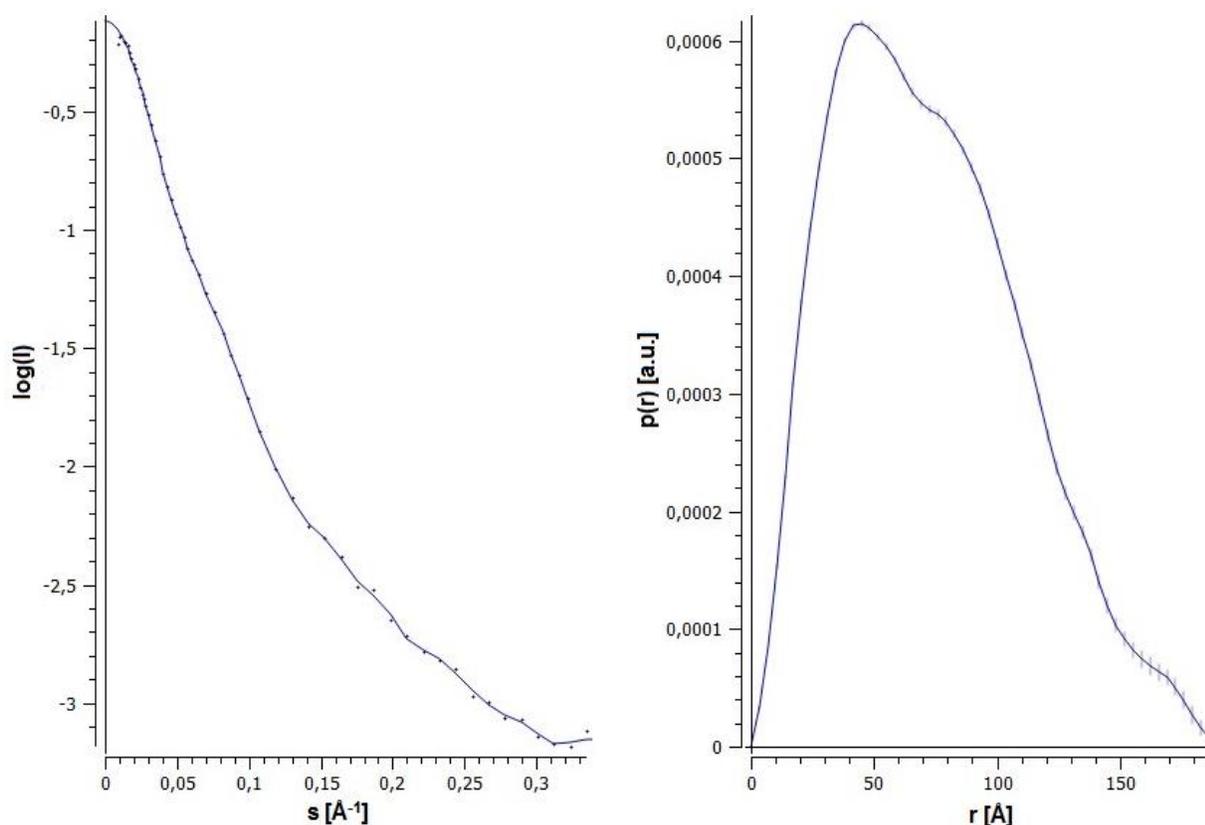


Abb. 41 Logarithmische Auftragung der Streudaten erhalten durch Messung des HMM5 IgE (links) und Auftragung nach indirekter Fourier Transformation (rechts).

Die schmale Glockenform der IFT deutet eine kompakte Struktur des HMM5 IgE und eine relativ homogene Größenverteilung an.

Die indirekte Fourier Transformation ($p(r)$ gegen r) ergibt die Paar-Abstands-Verteilungsfunktion und ist in einer verdünnten monodispersen Lösung ein Histogramm der Entfernungen zwischen Paaren von Punkten innerhalb des vermessenen Partikels, also des HMM5 IgE. Die maximale Dimension des IgE ist gegeben als D_{\max} und entspricht dem Schnitt der x-Achse bei etwa 190 \AA und liegt damit sinnvollerweise über der Größe eines gestreckten Antikörpermoleküls. Die $p(r)$ -Funktion enthält Informationen über die Größe und Form des streuenden Partikels. Da sich aus der IFT eine eher schmale Glockenkurve ergibt, die ihr Maximum nahe bei $D_{\max}/2$ hat, ist von einer relativ engen Größenverteilung und einer kompakten Struktur des HMM5 IgE auszugehen. Das leichte Auslaufen der Kurve in Richtung höherer r -Werte deutet eine leicht elongierte Struktur an, jedoch ist dieser Effekt nicht deutlich ausgeprägt. Außerdem liegt das Maximum der Kurve bei etwa 50 \AA , was in guter Übereinstimmung mit dem aus dem Guinier-Plot erhaltenen Streumasseradius von 52.7 \AA ist. Eine Betrachtung der Flexibilität des HMM5 IgE ist mittels des Kratky-Plots möglich, der $I(s)s^2$ gegen s aufträgt.

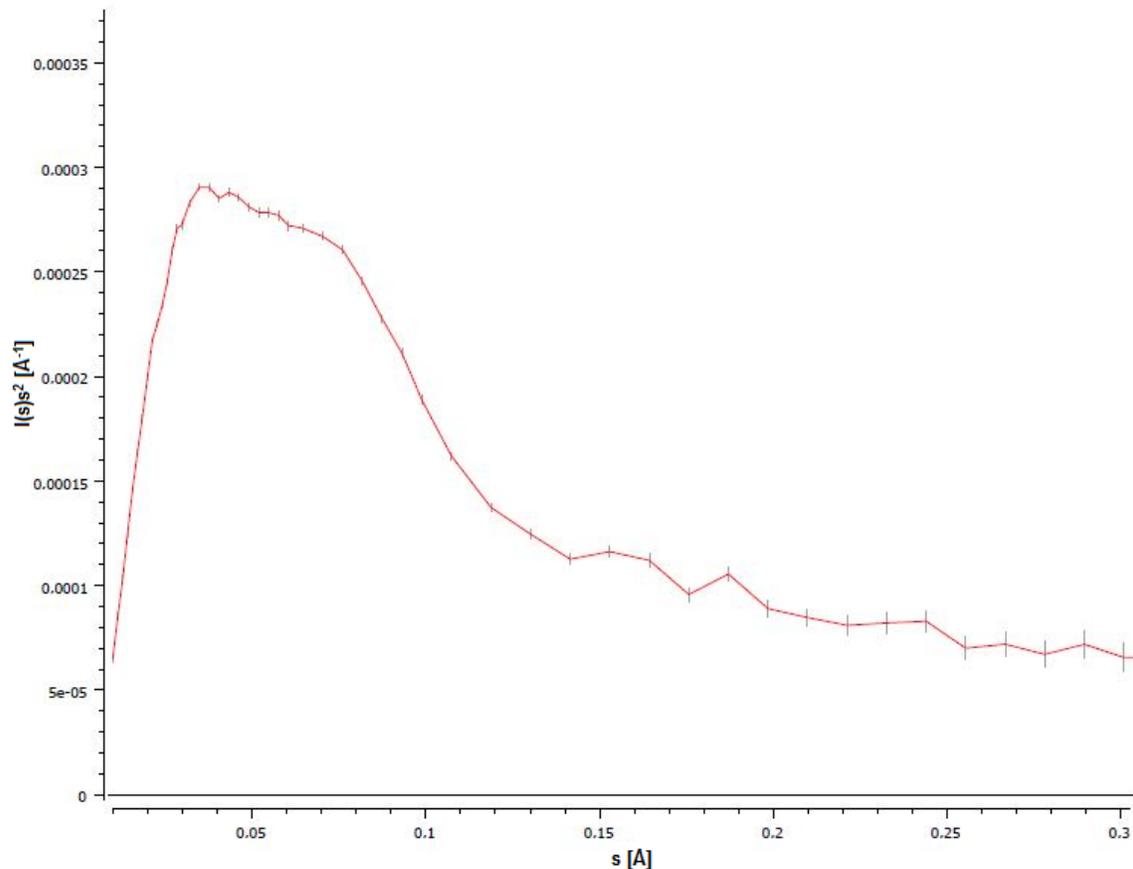


Abb. 42 Kratky-Plot der erhaltenen SAXS-Daten aus der Messung des HMM5 IgE.

Der flache Kurvenverlauf bei mittleren und hohen s -Werten indiziert eine rigide Struktur des rekombinanten humanen HMM5 IgE.

Bei der Betrachtung des Kratky-Plots gilt zu beachten, dass die Kurve für flexible Strukturen bei mittleren und hohen s -Werten ansteigt, während kompakte, rigide Strukturen einen flachen Kurvenverlauf bei hohen s -Werten zeigen und stetig gegen Null gehen. Der Kratky-Plot, welcher aus den Streudaten des HMM5 IgE erhalten wurde, zeigt eindeutig keinen Anstieg für $I(s)s^2$ bei hohen s -Werten, sondern ein Plateau mit einem leichten Abfall gegen Null. Der Kurvenverlauf indiziert damit offenkundig, dass es sich bei dem rekombinanten humanen IgE trotz seiner Größe um ein wenig flexibles Molekül handelt.

Insgesamt beweisen die aus den SAXS-Daten extrahierten Ergebnisse, dass es sich bei dem untersuchten rekombinanten humanen IgE um ein kompaktes Molekül mit einem hydrodynamischen Radius von etwa 50 Å handelt, welches kaum strukturelle Flexibilität zeigt. Außerdem lieferte das gewählte Protokoll zur Expression, Reinigung und Vorbereitung des HMM5 IgE eine Probe guter Qualität mit hoher Monodispersität und nicht nachweisbarer Aggregation. Auch starke intermolekulare Wechselwirkungen aufgrund der hohen Proteinkonzentration schienen nicht aufzutreten. Dies sollten daher offensichtlich gute

Ergebnisse

Bedingungen für folgende SAXS-Messungen mit höherer Auflösung unter Nutzung einer Synchrotronröntgenquelle sein. Dadurch werden auch zuverlässige Strukturmodelle des IgE mit atomarer Auflösung zugänglich. Des Weiteren legt die Rigidität des IgE röntgenkristallographische Ansätze zur Strukturaufklärung nahe.

5. Diskussion

5.1 Reaktivitätsanalyse von Seren humaner Hymenoptereingiftallergiker mit Komponenten aus den Giften von *Vespula vulgaris* und *Polistes dominula*

Allergische Erkrankungen betreffen etwa 25% der Bevölkerung von Industrienationen, wobei die Prävalenz seit den 1960er Jahren stetig zunimmt [5]. Gerade bei Allergien auf Hymenoptereingiftkomponenten treten häufig besonders schwere Symptome bis hin zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock auf [52]. Dennoch wird insbesondere die Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie durch IgE-Kreuzreaktivitäten zwischen den Giften verschiedener Hymenopterenarten erschwert. Diese Kreuzreaktivitäten werden zum einen durch Proteinepitope, die auf homologen Allergenen in den Giften verschiedener Arten gefunden werden, hervorgerufen. Zum anderen können IgE-Antikörper im Serum des Patienten vorliegen, welche gegen kreuzreaktive Kohlenhydrat-Epitope (CCDs) gerichtet sind. Da diese Kohlenhydrat-Epitope auf den Glykoproteinen der meisten Hymenopteren und vielen Pflanzenproteinen vorliegen, sind CCDs für die Mehrheit der Kreuzreaktivitäten verantwortlich [150]. Die molekularen Strukturen, welche diese Epitope ausbilden, sind im Falle von Pflanzenproteinen die α -1,3-*core*-Fukose und die β -1,2-*core*-Xylose und bei Insektenproteinen die α -1,3-*core*-Fukose in exklusiver Form. Die Verwendung rekombinanter Allergene in der *in vitro* Diagnostik hat gegenüber dem Einsatz von Giftextrakten den entscheidenden Vorteil, dass diese ohne CCDs erzeugt werden können. Außerdem lassen sich in der komponentenaufgelösten *in vitro* Diagnostik Einzelreaktivitäten auf Allergene messen, was eine detaillierte Betrachtung eines Sensibilisierungsprofils und in den meisten Fällen für Bienen- und Wespengiftallergie eindeutige diagnostische Abgrenzung zulässt [151-153].

Auch zwischen den Giften der Vespidae *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* kommt es aufgrund der engen Verwandtschaft zu ausgeprägten Kreuzreaktivitäten. Da das Gift der *Polistes*-Spezies frei von CCDs ist [63], sind hierfür ausschließlich proteinbasierte Epitope verantwortlich. Für die diagnostische Differenzierung zwischen beiden Allergien gibt es allerdings bislang noch kaum Möglichkeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher rekombinante Allergene aus dem Gift der Feldwespe *Polistes dominula* sowie die Analoga aus dem Gift der gemeinen Wespe *Vespula vulgaris* in einem Prototyp des EUROLine Assays eingesetzt, um eine Reaktivitätsanalyse humaner Seren von Patienten mit bestätigter Allergie auf Arten der Vespidae durchzuführen und eine mögliche diagnostische Differenzierung zu prüfen. Bei den drei bekannten Allergenen aus dem Gift von *Polistes dominula* handelt es sich um die Phospholipase A1 Pol d 1, die

Diskussion

Serinprotease Pol d 4 und das Antigen 5 Pol d 5 mit unbekannter Funktion. Im Wespengift finden sich hochgradig kreuzreaktive Analoga der Phospholipase A1 (Ves v 1) und des Antigens 5 (Ves v 5).

Die Antigene 5 beider Spezies sowie Pol d 4 wurden hierfür in guten bis sehr guten Ausbeuten (2-9 mg/L) als CCD-freie Proteine in Sf9-Zellen exprimiert und mittels IMAC gereinigt. Da die Phospholipasen in Sf9-Zellen nur schlecht exprimiert und in geringem Maße sekretiert werden, wurden diese in *E. coli* exprimiert und gereinigt.

Der EUROline Assay ist ein diagnostisches Testsystem, welches auf dem Prinzip des Western Blots basiert und erlaubt spezifische IgE-Reaktivitäten auf Allergenextrakte sowie native oder rekombinante Allergene zu bestimmen. Ein entsprechendes System ist beispielsweise für die diagnostische Differenzierung zwischen Allergien auf die Gifte der Honigbiene *Apis mellifera* und der gemeinen Wespe *Vespula vulgaris* bereits auf dem Markt erhältlich. Hier sind neben den Giftextrakten dieser Spezies, welche hochgradig kreuzreaktive Komponenten enthalten, auch die rekombinanten Allergene Api m 1 (Phospholipase A2) und Ves v 5 und ein CCD-Marker immobilisiert. Da diese Allergene als Majorallergene definiert sind und keine kreuzreaktiven Analoga im jeweils anderen Gift besitzen, lässt sich mit diesem Testsystem in den meisten Fällen eine eindeutige Allergiediagnose stellen. Eine Ausnahme stellt die Diagnose von doppelt sensibilisierten Patienten dar, welche keine IgE-Reaktivität auf Api m 1 zeigen. Hier konnte kürzlich gezeigt werden, dass der zusätzliche Einsatz von rApi m 3 und rApi m 10 die Diagnose einer genuinen Bienengiftallergie in 45-60% der Api m 1 negativen Patienten erlaubte [70]. Somit sind Api m 3 und Api m 10 in vielen Fällen ebenfalls als relevante Markerallergene zu betrachten und für die *in vitro* Diagnostik unerlässlich.

Für eine entsprechende Analyse der Patientenserum mit Vespidae-Allergie wurden Ves v 1, Ves v 5, Pol d 1, Pol d 5, Pol d 4, die Giftextrakte von Wespe und Feldwespe sowie ein CCD-Marker auf der Membran eines EUROline Teststreifens immobilisiert. Dieser diente anschließend als Prototyp für die Analyse der Spenderseren. Da bislang keine zuverlässige Diagnostik der Feldwespengiftallergie möglich ist, wurden zwei Spenderkollektive definiert, welche sich lediglich in der Herkunft der Patienten unterschieden. Es wurden 56 Patientenserum aus Feldwespen-endemischen (Italien) und 50 Seren aus nicht-endemischen Regionen (Ostdeutschland) analysiert. Hierbei war zu erwarten, dass eine Sensibilisierung auf das Gift von *Polistes dominula* mit großer Wahrscheinlichkeit nur bei Patienten aus der Feldwespen-endemischen Gruppe zu erwarten war, während die Patienten aus der zweiten Gruppe vermutlich nur auf *Vespula* Spezies – hauptsächlich *Vespula vulgaris* – sensibilisiert sein würden.

Zunächst wurden die Daten qualitativ analysiert indem lediglich unterschieden wurde, ob Spender IgE-Reaktivitäten auf die jeweiligen Allergene zeigten. Hierfür wurde dann von einem positiven Ergebnis ausgegangen, wenn die IgE-Reaktivität mindestens der RAST-Klasse 1 entsprach (>0.35 kU/L). Die Analyse der IgE-Reaktivitäten auf die Giftextrakte ergab, dass in beiden Gruppen ein größerer Anteil der Spender IgE-Reaktivität auf Wespengift als auf Feldwespengift zeigte. Das kann ein Indiz dafür sein, dass tatsächlich ein großer Teil der Spender eine Wespengiftallergie aufwies. Dies wird durch die größere Differenz in der *Vespula* Gruppe gestützt (96% gegen 32% im Gegensatz zu 88% gegen 68% in der PG). Unterschiede in der Qualität der Giftextraktpräparationen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Besonders innerhalb der *Vespula* Gruppe zeigte ein großer Teil der Spender etwas ausgeprägtere Reaktivitäten auf die Phospholipasen und Antigene 5 des Wespengifts, als auf die entsprechenden Komponenten des Feldwespengifts. In der *Vespula* Gruppe waren etwa 70% der Seren doppelt positiv auf beide Wespengiftallergene. Innerhalb der *Polistes* Gruppe zeigte sich – auch aufgrund der Zahl der untersuchten Allergene – ein etwas differenzierteres Bild. Zwar wurden auch hier ein Großteil der Seren positiv sowohl auf Pol d 5 als auch auf Pol d 1 getestet (40%), was sich in etwa mit dem Anteil an Ves v 1 und Ves v 5 doppelt sensibilisierten Seren dieser Gruppe deckte. Jedoch zeigte ein Viertel der PG-Seren eine alleinige Reaktivität auf Pol d 5. Bezüglich der Wespengiftallergene war die Monosensibilisierung auf das Antigen 5 etwas ausgeprägter. Etwa ein Drittel der Seren aus der *Polistes* Gruppe zeigte zwar mit Ves v 5 eine IgE-Reaktivität, nicht jedoch mit Ves v 1. Eine Monosensibilisierung auf die Phospholipasen war in beiden Gruppen selten. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den bekannten Sensibilisierungsprofilen von Wespengiftallergikern, weshalb sowohl Ves v 1 als auch Ves v 5 als Majorallergene definiert sind [60]. Die hohen Reaktivitäten stellen die Relevanz der Phospholipasen und Antigene 5 für die *in vitro* Diagnostik heraus. Jedoch wurden ausgesprochen hohe Kreuzreaktivitäten für beide Allergene gefunden. In beiden untersuchten Spenderkollektiven fanden sich etwa zwei Drittel der Seren, welche mit beiden Phospholipasen reagierten. Für die Antigene 5 war die Kreuzreaktivität sogar noch größer; 78% der Spender aus der *Polistes* Gruppe hatten erhöhte sIgE-Titer für beide Antigene 5. In der *Vespula* Gruppe waren es sogar 91%. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Studien, welche native Allergene verwenden, in der Tendenz überein [62, 154]. Monsalve *et al.* konnten in einer ebenfalls *Polistes*-endemischen Gruppe unter Verwendung von rekombinanten und nativen Allergenen nachweisen, dass die meisten Seren IgE-Reaktivitäten auf mindestens eines der Majorallergene aufwiesen, wobei auch hier eine höhere Sensibilisierung auf die Antigene 5 beobachtet wurde. Interessanterweise waren

die hier gemessenen Reaktivitäten auf die nativen Allergene deutlich höher als auf die rekombinanten Komponenten, im Besonderen nPol d 5 im Vergleich zu rPol a 5 [62]. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass es sich bei dem rekombinanten Feldwespen-Antigen 5 um das Allergen aus dem Gift von *Polistes annularis* handelt, welche zwar hohe Homologien zu dem *Polistes dominula* Analog hat, jedoch nicht identisch ist. Außerdem wurden die rekombinanten Allergene in *Pichia pastoris* exprimiert, was eine weniger authentische Faltung des Proteins zur Folge haben könnte. Die Qualität der rekombinanten Allergene scheint also von großer Bedeutung für die Reaktivitätsanalyse humaner Seren zu sein.

Für die Serinprotease Pol d 4 wurde mittels EUROLIne Assay insgesamt nur ein relativ geringer Anteil reaktiver Seren von etwa einem Drittel in beiden Gruppen identifiziert. Dies legt eine untergeordnete Bedeutung dieses Proteins für die *in vitro* Diagnostik nahe, da es vermutlich eher als Minorallergen einzuordnen ist. Da in beiden Gruppen etwa derselbe Anteil an Seren mit Pol d 4-spezifischen IgE-Antikörpern ermittelt wurde, ist von einer starken Kreuzreaktivität mit der putativen Protease Ves v 4 im Wespengift auszugehen. Diese Ergebnisse sind überraschen, da ursprünglich aufgrund von vorangegangenen Studien von einer deutlich höheren Sensibilisierungsrate ausgegangen wurde [155]. Außerdem haben die Vergleiche der Strukturmodelle beider Proteasen eher eine geringere immunologische Kreuzreaktivität erwarten lassen.

Zusätzlich zu den Allergenen wurde auch die CCD-spezifische IgE-Reaktivität der Seren gemessen. Es wurde gezeigt, dass etwa zwei Drittel der Seren aus der *Vespula* Gruppe erhöhte IgE-Titer auf CCDs aufzeigten, während es in der *Polistes* Gruppe nur etwa halb so viele waren, was vermutlich mit dem Fehlen der kreuzreaktiven Kohlenhydratstrukturen im Feldwespengift zusammenhängt [63].

Aufgrund dieser ausgeprägten Kreuzreaktivitäten aller bekannter Allergenkomponenten aus dem Gift von *Polistes dominula* mit den entsprechenden Allergenen des Wespengifts, ist eine Zuordnung der primären Sensibilisierungsquelle in den meisten Fällen nicht möglich, wenn die Stärke der IgE-Reaktivität außer Acht gelassen wird. Es ist vielmehr notwendig die sIgE-Titer eines Patienten auf die homologen Allergene aus beiden Spezies quantitativ zu vergleichen. Auf diese Art wurden jeweils vier Seren aus der *Polistes* und *Vespula* Gruppe vorgestellt, wobei alle Seren aus der *Vespula* Gruppe deutlich erhöhte sIgE-Titer auf die Wespengiftallergene sowie auf Wespengift als auch die Feldwespengiftallergene aufwiesen. Hierbei war die Differenz für die weniger kreuzreaktiven Phospholipasen wie erwartet deutlicher ausgeprägt als für die Antigene 5. Auch bei Betrachtung der Werte im gesamten Kollektiv war in der Regel eindeutig genuine Wespengiftsensibilisierung festzustellen.

Lediglich bei einem der hier vorgestellten Seren (VG10) aus der *Vespula* Gruppe wäre die eindeutige Zuordnung der allergieverursachenden Spezies problematisch, da neben dem Wespengift und Wespengiftallergenen auch eine RAST-Klasse 3 Reaktivität auf Pol d 4 und eine etwas stärkere IgE-Reaktivität mit Pol d 5 (6) im Vergleich zu Ves v 5 (5) vorliegt. In diesem Fall könnte unter Umständen eine multiple Sensibilisierung vorliegen und eine SIT mit beiden Giften wäre in Erwägung zu ziehen.

In der *Polistes* Gruppe zeigte sich erwartungsgemäß ein heterogeneres Bild. Es konnten aufgrund der sIgE-Titer einige Seren mit relativ großer Sicherheit als Feldwespengift- oder Wespengift-sensibilisiert eingeordnet werden. Bei anderen Seren lagen die gemessenen IgE-Reaktivitäten zu nah beieinander, um eine klare Einordnung zu ermöglichen. Insgesamt war ein deutlicher Unterschied (mindestens 2 RAST-Klassen für mindestens eins der Allergene) in den Reaktivitäten zu den Einzelkomponenten nur für weniger als der Hälfte der Seren möglich.

Für solche uneindeutigen Fälle konnte zum Teil unter Berücksichtigung der IgE-Affinitäten eine verbesserte Aussage getroffen werden. Hierfür wurden ausgewählte Seren aus beiden Gruppen analysiert, indem die Teststreifen nach Inkubation mit den Seren mit einem chaotropen Reagenz behandelt wurden, um niederaffine IgE-Antikörper zu entfernen. Durch Vergleich der Signalintensitäten mit denen aus dem Standardassay wurden relative Affinitäten der sIgE erhalten. Unter der Annahme, dass kreuzreaktive Interaktionen von geringerer Affinität sind als solche mit den genuinen Zielstrukturen, konnte anhand der relativen IgE-Affinitäten zu den Antigenen 5 eine primäre Sensibilisierung durch Feldwespen- oder Wespengift in einigen Seren ermittelt werden. Hierbei wurden für die Seren der *Polistes* Gruppe erneut alle möglichen Resultate erhalten. Sowohl die Abnahme der gemessenen sIgE-Reaktivität von Pol d 5 bei gleichbleibender Ves v 5 Reaktivität, als auch die deutlichere Abnahme der Ves v 5-spezifischen IgE-Reaktivität konnte gezeigt werden. Im Fall des ersten Patientenserums kann dieses damit mit großer Wahrscheinlichkeit als Wespenallergikerserum klassifiziert werden, wohingegen es sich bei dem zweiten Patienten vermutlich um einen Feldwespenallergiker handelt. Allerdings wurde bei einer Reihe von Seren kein Unterschied in den relativen Signalintensitäten von Ves v 5 und Pol d 5 erreicht, sodass hier keine Identifizierung des sensibilisierenden Insektengifts möglich war. Bemerkenswerterweise wurde für alle 15 getesteten Seren, der *Vespula* Gruppe ausschließlich eine deutlichere Reduktion der sIgE-Reaktivität für Pol d 5 erreicht. Auch wenn die Differenzen innerhalb der Gruppe variierten, ist für alle Seren relativ sicher von einer genuinen Sensibilisierung durch *Vespula* ssp. auszugehen. Eine entsprechende Analyse der IgE-Affinitäten zu den Phospholipasen

Diskussion

erwies sich als nicht möglich, da hier keine Unterschiede in der Signalreduktion erzielt werden konnten.

Ein weiterer diagnostischer Ansatz zur Differenzierung der Wespen- und Feldwespen Giftallergie ist die Analyse der kreuzreaktiven Allergene im Basophilenaktivierungstest (BAT). Erste Versuche hierzu wurden unter Verwendung der rekombinanten Antigene Ves v 5 und Pol d 5 im Arbeitskreis in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern bereits durchgeführt und evaluiert. Theoretisch könnte diese Methode effizient eine Differenzierung erlauben, indem Allergiker auf das Allergen, gegen welches sie genuin allergisch sind, bei geringeren Allergendosen eine Degranulation der Basophilen zeigen, als bei der kreuzreaktiven Komponente.

Die Grundlage hierfür läge in der putativ höheren Affinität bzw. der erhöhten Funktionalität der IgE gegen das genuine Antigen und geringere Affinität und Funktionalität gegen das kreuzreaktive Allergen, das allerdings mehr oder weniger stark ausgeprägte Unterschiede in der Primärstruktur und Faltung aufweisen sollte. So sollten z.B. Wespen Gift-Allergiker eine effizientere Degranulation der Basophilen bei geringeren Ves v 5 Konzentration zeigen, wohingegen der Einsatz von Pol d 5 nur in hohen Konzentrationen eine kreuzreaktivitätsbedingte Degranulation der Zellen induzieren sollte. Präliminäre Ergebnisse zeigen hier ein nicht so klares Bild. Unter Verwendung der beschriebenen Methode konnten zwar gezeigt werden, dass einige Wespen Gift-Allergiker stärker auf Ves v 5 als auf Pol d 5 reagierten, allerdings zeigten auch manche Patienten nahezu identische Reaktivität auf beide Antigene. Dies könnte neben einer möglichen Doppelsensibilisierung gegen beide Gifte auch auf eine geringe Spezifität in dem so durchgeführten Testsystem schließen lassen. Bislang wurde nur ein kleines Patientenkollektiv analysiert, welches unter Umständen hauptsächlich Wespen Giftallergiker beinhaltete. Im Falle der Feldwespen Gift-Allergiker ist es technisch schwieriger, verlässliche Aussagen zu erhalten. Hier wäre neben der Verfügbarkeit des Materials auch eine begleitende serologische Diagnostik außerordentlich wichtig.

In folgenden Versuchen soll daher die mögliche Differenzierung einer Wespen- und Feldwespen Giftallergie mittels BAT weiter evaluiert werden. Diese Ansätze sollten neben den Antigenen 5 zusätzlich die Allergene Pol d 1, Pol d 4 und Ves v 1 einschließen. Hierbei scheint besonders Pol d 4 ein möglicher Kandidat zur Differenzierung zu sein, da die strukturelle Homologie zu dem möglichen Wespen Giftallergen Ves v 4 deutlich geringer einzustufen ist, als die der Antigene 5.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die *in vitro* Diagnostik im Besonderen in der Abgrenzung zwischen Wespen- und Feldwespen Giftallergie durch die Analyse der sIgE-

Reaktivitäten auf rekombinante Allergene mittels EUROLIne Assay deutlich verbessert werden konnte, insbesondere im Vergleich zur alleinigen Verwendung entsprechender Giftextrakte. Obwohl ausgeprägte Kreuzreaktivitäten sowohl zwischen den Phospholipasen Ves v 1 und Pol d 1 als auch zwischen den Antigenen 5 Ves v 5 und Pol d 5 bestätigt wurden und auch zwischen der Serinprotease Pol d 4 und der putativen Wespengiftprotease Ves v 4 vermutet werden können, konnte in vielen Fällen die allergieverursachende Spezies identifiziert werden. Dadurch können für einzelne Patienten Therapien mit nur einem der Gifte durchgeführt werden, sodass sowohl die Kosten der SIT als auch das Risiko einer Neusensibilisierung ausgeschlossen bzw. verringert werden können.

Im Rahmen der vorgestellten Studie wurde gezeigt, dass bei den Seren von Patienten aus nicht Feldwespen-endemischen Regionen, vermutlich in keinem Fall eine genuine Sensibilisierung gegen das Gift der Feldwespe vorlag. Die Differentialdiagnostik bezüglich *Polistes dominula* sollte somit ausschließlich für Feldwespen-endemische Regionen wie den Mittelmeerraum eine Rolle spielen. Allerdings handelt es sich hierbei um eine invasive Spezies, weshalb sich der Lebensraum dieser Spezies weiter ausweiten könnte und bereits jetzt in Einzelfällen entsprechende diagnostische Systeme in Süddeutschland von Interesse sind. Außerdem wurde bislang außer Acht gelassen, dass neben *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* andere Vespidae, wie *Dolichovespula* ssp. und die Hornisse *Vespa crabro*, als allergieauslösende Spezies in Frage kommen. Dies gilt für die Patienten beider untersuchter Kollektive.

Insgesamt wurde deutlich, dass die gründliche Analyse der sIgE-Titer mit allen zur Verfügung stehenden rekombinanten Allergenen und Giftextrakten und in einzelnen Fällen auch die Analyse der CCD-Reaktivitäten notwendig ist, um eine zuverlässige Allergiediagnose zu stellen. Der Prototyp des EUROLIne Assays kann in vielen Fällen zu einer Differenzierung zwischen Feldwespen- und Wespengiftallergie beitragen und ist definitiv eine Verbesserung bestehender Testsysteme.

5.2 Expression und funktionelle Charakterisierung von humanem IgE

Die Rolle von Antikörpern des Isotyps E in der Allergie ist unumstritten und auch die Bedeutung in der Immunüberwachung und der unmittelbaren Detoxifikation wird in zunehmendem Maße anerkannt [102, 156], dennoch ist IgE aufgrund der geringen Serumkonzentration und der schlechten rekombinanten Zugänglichkeit der am wenigsten charakterisierte Isotyp. Die Interaktionsmodi von IgE mit seinen Antigenen, welche der

allergischen Sensibilisierung und Reaktion zugrunde liegen, sind weitestgehend unbekannt, weshalb der dringende Bedarf an rekombinanten humanen IgE-Antikörpern bzw. -Fragmenten besteht [157, 158]. Seit der ersten erfolgreichen rekombinanten Expression von IgE-Antikörpern fokussieren sich alle Versuche auf die Expression in Mammaliazelllinien wie HEK-293 und CHO [159]. Die Nutzung dieser Expressionssysteme ist jedoch zeitintensiv und liefert für komplexere Isotypen wie IgE, IgM oder weniger deutlich auch IgA häufig nur unbefriedigende Ausbeuten. So konnten beispielsweise für die Produktion von humanen Isotypen mit identischen variablen Domänen eine 1000-fach höhere Expressionsrate für IgG als für IgE erzielt werden [160]. Auch wenn diese Diskrepanz nicht immer so ausgeprägt auftritt, zeigt sich die generelle Unterlegenheit der Mammaliazell-basierten Expression für IgE-Antikörper. Der Grund hierfür ist nicht geklärt, jedoch könnte das höhere Molekulargewicht durch die zusätzliche Domäne im Fc-Teil des Antikörpers und die extensive Glykosylierung von humanen IgE-Antikörpern mit 7 *N*-Glykosylierungsstellen in der schweren Kette eine Rolle spielen. Alleine drei *N*-Glykosylierungen finden sich in der C_H1 und die ausgeprägte Glykosylierung könnte ein Hindernis für die Assemblierung mit der leichten Kette und die Ausprägung der korrekten Quartärstruktur und Faltung sein, was die Sekretion erschweren würde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verwendung eines nicht Mammalia-basierten Expressionssystem für die Produktion von IgE-Antikörpern untersucht werden. Seit mehr als 30 Jahren wird das Baculovirusexpressionssystem erfolgreich verwendet, um rekombinante Proteine in Insektenzellen zu exprimieren [161] und 1990 zeigten sowohl Hasemann und Capra [162] als auch zu Putlitz *et al.* [163], dass unter Nutzung dieses Systems voll funktionsfähige Immunoglobuline erhalten werden können, welche korrekt prozessiert, glykosyliert, gefaltet und assembliert werden. Seitdem konnten sowohl murine, chimäre, humane und porcine Antikörper als auch Antikörperfragmente wie scFv und Fab erfolgreich mittels des Baculovirusexpressionssystems exprimiert werden [164]. Bei den Vollängenantikörpern, die hier bislang beschrieben sind, handelt es sich allerdings zum größten Teil um IgG-Antikörper. Die Expression von komplexeren Isotypen wie IgA oder IgM ist deutlich seltener berichtet [165, 166]. Für Strukturstudien wurde der IgE-Fc-Teil entweder als C_H2-3- oder C_H2-4-Konstrukt in Insektenzellen exprimiert, allerdings bislang nicht der gesamte intakte Antikörper [110, 113, 167].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein chimärer IgE-Antikörper mittels des Baculovirusexpressionssystems in Sf9-Insektenzellen produziert. Dieser Antikörper enthält humane konstante Domänen und leporide variable Domänen mit Spezifität für die CCD-

Strukturen α -1,3-*core*-Fukose und β -1,2-*core*-Xylose. Diese Strukturen sind beinahe ubiquitär auf pflanzlichen und Helminthen-*N*-Glykanen zu finden und die α -1,3-*core*-Fukosylierung in exklusiver Form auch auf Insektenglykoproteinen. Da sie jedoch im humanen System nicht etabliert werden, sind sie hochimmunogen und tatsächlich stellen Karbohydrate vermutlich die häufigsten IgE-Epitope dar [168]. Außerdem sind sie in der Allergiediagnostik wie bereits im vorherigen Abschnitt ausführlich beschrieben für mindestens die Hälfte aller doppelt-positiven Testergebnisse verantwortlich [87]. Der Relevanz für die Diagnostik steht die kontrovers diskutierte klinische Bedeutung von CCDs in der Allergie und parasitären Infektionen gegenüber [86, 169]. Da in der Regel trotz ausreichend hoher Affinitäten und Titer keine klinischen Symptome durch CCD-spezifische IgE-Antikörper vermittelt werden, eröffnet sich die Frage, inwiefern der Epitop-Bindung grundsätzlich einzigartige Interaktionsmodi zugrundeliegen. Eine Ausnahme bilden IgE-Antikörper mit Spezifität für das α -Gal Epitop, welche für schwere anaphylaktische Reaktionen u.a. auf rotes Fleisch und den therapeutischen Antikörper Cetuximab verantwortlich sind [90, 170]. Der in dieser Arbeit exprimierte monoklonale Antikörper kann nun erstmals als Modell für humane CCD-spezifische IgE-Antikörper verwendet werden, um diese Interaktion auf molekularer Ebene zu analysieren und bestehende Testsysteme zu optimieren.

Bemerkenswerterweise ist es durch die Baculovirus-mediierte Expression gelungen den rekombinanten humanen IgE in außergewöhnlich hohen Ausbeuten von mehr als 30 mg/L als sekretiertes intaktes Protein zu produzieren. Vergleicht man dieses Expressionsniveau mit der Expression des selben Klons in HEK-293-Zellen, welche keine nachweisbare Antikörperproduktion zeigt (nicht veröffentlichte Daten), wird die deutliche Überlegenheit dieses Expressionssystems gegenüber der Mammaliaexpression deutlich. Auch vergleichbare leporid/humane IgE Antikörper anderer Spezifität zeigten in der HEK-Zellexpression deutlich geringere Ausbeuten.

Aus dem serumfreien Kulturüberstand konnte der Antikörper sowohl mittels *kappaSelect*-Affinitätschromatographie als auch mittels IMAC in guter Reinheit isoliert werden. Obwohl sich der IgE als strukturell relativ stabil erwies, ist die IMAC-Reinigung aufgrund der mildereren Elutionsbedingungen der *kappaSelect*-Reinigung vorzuziehen, da die Elution hier mit sehr niedrigem pH erfolgt und so eine partielle Degradation des Proteins nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine analoge Expression des chimären murin/humanen HyHEL 10 IgE lieferte hiergegen keine befriedigenden Ausbeuten. Zwar konnte gezeigt werden, dass intakter IgE exprimiert und sekretiert wird, welcher sein Antigen Hühnereilysozym im ELISA bindet und mittels IMAC

isoliert werden kann. Jedoch war das Expressionsniveau mit etwa 500 µg/L deutlich geringer. Die Ursache hierfür ist bislang nicht geklärt, jedoch sollte überprüft werden, inwieweit die hohen Expressionsraten einzigartig für Leporid/humane IgE-Antikörper sind. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen sollte in jedem Fall vorgenommen werden, um die Expressionsraten noch zu erhöhen. Hierfür könnte zunächst eine weitere Virusamplifikation durchgeführt werden, bevor die Kryostocks angefertigt werden, um den Virustiter zu erhöhen. Aufgrund der geringen Ausbeute wurden bislang keine weiteren Analysen des HyHEL 10 IgE durchgeführt.

Immunologische Analysen des HMM5 IgE mittels ELISA zeigten für diesen Antikörper jedoch die effiziente Bindung der Antigene, HRP und MuxF³-Konjugat, des Antikörpers. Mittels ImmunoCAP-Messung wurden ergänzende Daten zur Spezifität des Antikörpers erhalten. Das ImmunoCAP-System wird routinemäßig in der *in vitro* Allergiediagnostik eingesetzt, um spezifische IgE-Reaktivitäten von Patientenseren gegen verschiedene Allergenextrakte oder native und rekombinante Proteine zu bestimmen. Diese Analyse bestätigte nicht nur die Bindung von HRP und MuxF³, sondern offenbarte insgesamt eine hohe Reaktivität mit pflanzlichen Allergenquellen, die vermutlich ebenfalls *N*-Glykane vom MuxF³-Typ tragen, wie Rapsextrakt und das Majorallergen Phl p 4 aus dem Wiesen-Lieschgras. In geringerem Maße wurden auch Insektengifte erkannt, welche ausschließlich das α -1,3-*core*-Fukose-Epitop tragen. Hierbei bildete das CCD-freie Feldwespengift eine Ausnahme, da es wie erwartet nicht erkannt wurde. Überraschenderweise wurde keiner der parasitären Extrakte erkannt, obwohl auch hier α -1,3-*core*-fukosylierte Glykoproteine vorliegen sollten. Offensichtlich scheinen hier jedoch weitere Effekte eine Rolle für die Erkennung zu spielen, bzw. das Ausmaß der α -1,3-*core*-Fukosylierung deutlich geringer als in Insekten und Pflanzen zu sein. Unter Umständen sind die etablierten Glykanstrukturen in den untersuchten Parasiten auch insgesamt strukturell so komplex, dass eine Interaktion mit dem Antikörper nicht mehr möglich ist. Die gezeigte Antigenspezifität macht die korrekte Faltung der variablen Domänen deutlich, welche für die Epitoperkennung kritisch ist. Auch wenn die α -1,3-*core*-Fukose die dominante Zielstruktur darstellt, scheint die β -1,2-*core*-Xylose, sowie untergeordnet auch die terminale Mannose, welche in MMXF³-Glykanen fehlt, eine Rolle für die Antikörperbindung zu spielen. In diesem Zusammenhang ist eine Studie zu nennen, in welcher mittels eines Glykan-Arrays die Glykanstrukturen untersucht wurden, welche humane Seren von mit dem parasitären Wurm *Schistosoma mansoni* infizierten Patienten erkennen. Hier konnten Brzezicka unlängst zeigen, dass ausschließlich mono- oder biantennäre relativ kleine Oligosacharide erkannt werden.

Komplexere Glykane wurden unabhängig von dem Vorhandensein der immunogenen Untereinheiten nicht erkannt [171].

Die mittels SPR ermittelten Affinitäten liegen für HRP und MuxF³-Konjugat im mittleren nanomolaren Bereich, wobei die Affinität für MuxF³ etwa viermal so hoch ist wie für HRP. Die Glykanstrukturen unterscheiden sich nur in einer terminalen Mannose, jedoch scheint die geringere Verzweigung des MuxF³-Epitops eine bessere Bindung des Antikörpers zu erlauben, als das MMXF³-Epitop unter Umständen, weil es besser in die Bindungstasche dieses IgE passt. Dieses Verhältnis entspricht den Reaktivitäten, welche im ELISA und ImmunoCAP erhalten wurden, da auch hier hauptsächlich das MuxF³-Epitop erkannt wurde. Diese relativ hohen Werte widersprechen zudem der Theorie, dass Protein-Karbohydrat-Interaktionen generell schwächer sind (im mikromolaren Bereich) als Protein-Protein-Interaktionen (im nanomolaren bis picomolaren Bereich) [172]. Vielmehr liegen die für den chimären Ieporid/humanen IgE erhaltenen Affinitäten im Rahmen der für polyklonale IgG-Präparationen aus Kaninchenseren berichteten Affinitäten zu CCDs [173, 174].

Auch die Bindung des hochaffinen FcεRI konnte im ELISA nachgewiesen werden. Die Bindung des niederaffinen Fcε-Rezeptors CD23 wurde im ELIFAB Assay indirekt nachgewiesen, da sie die Grundvoraussetzung des Assays ist. Neben der Interaktion mit seinen spezifischen Rezeptoren, wurde die originäre Faltung der Fc-Domänen auch über Bindungsanalysen mit dem IgE-spezifischen Antikörper Omalizumab im ELISA nachgewiesen. Dieser therapeutische humanisierte Antikörper wird bei schwerem allergischen Asthma eingesetzt und verhindert die Bindung von IgE an den FcεRI auf Mastzellen und Basophilen und somit deren Aktivierung, sodass die allergietypischen Symptome verringert werden können, welche durch die Degranulation dieser Zellen ausgelöst werden. Auch im Immunoblot konnte der rekombinante IgE-Antikörper mit polyklonalem anti-IgE sowie polyklonalem anti-*kappa* light chain Antikörper detektiert werden, was die korrekte Faltung der IgE-Fc-Domänen zusätzlich unterstreicht. Zusammenfassend lässt sich also schließen, dass sowohl die Antigenbindungsstellen als auch der Fc-Teil des rekombinanten IgE aus Sf9-Insektenzellen korrekt prozessiert, gefaltet und assembliert sind, was die grundlegende Voraussetzung für die biologische Aktivität dieses Antikörpers ist.

Der vermutlich größte und relevanteste Unterschied in der posttranslationalen Modifikation bei der Verwendung von Sf9-Insektenzellen für die Expression von humanem IgE im Gegensatz zu Mammaliazell-exprimiertem bzw. nativen humanen IgE ist Ausmaß und Art der Glykosylierung. Die Etablierung der N-Glykane in Sf9-Zellen ist besonders in den frühen Schritten des Glykosylierungspfadens ähnlich zu der in Mammalia [175]. Dennoch fehlen ihnen

einige Glykosyltransferasen komplett oder sind nur in geringem Maße aktiv. Dieser Umstand sowie das Vorhandensein einer Golgi-assoziierten *N*-Acetylglukosaminidase [176] führen dazu, dass hauptsächlich die paucimannosidische Struktur Man₃(Fuc)GlcNAc₂ entsteht, welche für Mammaliazellen kaum beschrieben ist.

Dies ist besonders aufgrund der hochgradigen Glykosylierung von humanem IgE von Bedeutung. Die Glykosylierung von Antikörpern und von IgE im Speziellen spielt eine entscheidende Rolle für ihre Produktion, Sekretion und Funktion. So ist beispielsweise beschrieben, dass die Fukosylierung des *N*-Glykans an Position Asn₂₉₇ von humanem IgG1 signifikant die Bindung an FcγRIII beeinflusst und so die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verbessert [177]. Daher vermitteln Antikörper, welche in Insektenzellen exprimiert wurden, erwartungsgemäß eine effiziente ADCC *in vitro*, da diese α-1,6-fukosyliert vorliegen und Galaktose, Acetylglukosamin und Sialinsäure eine untergeordnete Rolle für die Interaktion mit FcγRIII spielen [178, 179]. Für den deutlich stärker glykosylierten Isotyp IgE liegen erheblich weniger Daten zur Modulation der biologischen Aktivität durch eine veränderte Glykosylierung vor. Jedoch wurde bereits in strukturellen Analysen eine Interaktion des in Insektenzellen exprimierten Fc-Teils mit dem FcεRI gezeigt [113]. Außerdem konnten Shade *et al.* zeigen, dass die selektive Entfernung des *N*-Glykans an Position Asn₂₇₅ des humanen IgE eine Änderung der Sekundärstruktur zur Folge hat, die mit einem kompletten Verlust der Bindung zum FcεRI einhergeht [137]. Dies führt zu einer Unfähigkeit des IgE, Mastzellen zu aktivieren und eine Degranulation und somit eine anaphylaktische Reaktion auszulösen. Bemerkenswerter Weise handelt es sich bei diesem *N*-Glykan, welches offensichtlich unerlässlich für die biologische Aktivität des IgE ist, um die einzige oligomannosidische Struktur unter den übrigen Komplextypglykanen.

Die Glykosylierung des rekombinanten CCD-spezifischen IgE wurde zunächst mit Lektinen im ELISA untersucht. Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, welche spezifisch jeweils bestimmte Monosaccharide in festgelegten Verknüpfungen oder Oligosaccharide binden und aufgrund dieser Spezifität auch in der Glykananalytik eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde zum einen das Lektin GNA eingesetzt, das terminale Mannose, welche an Mannose in einer Reihe von verschiedenen Verknüpfungen, einschließlich α-1,3, α-1,6 und α-1,2, gebunden ist, erkennt. Zum anderen wurde das Lektin AAL verwendet, welches spezifisch für Fukose in α-1,6 und α-1,3-Verknüpfung an GlcNAc ist. Die Lektinanalyse des in Sf9-Zellen exprimierten IgE ergab im Vergleich zu einem in HEK-293-Zellen exprimierten humanen IgE eine leicht erhöhte Reaktivität mit AAL und eine deutliche höhere Reaktivität mit GNA. Die etwas höhere Reaktivität von AAL mit dem Insektenzell-exprimierten IgE lässt auf ein

stärkeres Maß an Fukosylierung in Insektenzellen im Vergleich zu HEK-293-Zellen schließen. Da beschrieben ist, dass Sf9-Zellen keine oder nur in sehr geringem immunologisch nicht nachweisbarem Maße α -1,3-*core*-Fukosylierungen etablieren [148], ist davon auszugehen, dass es sich hierbei größtenteils oder ausschließlich um α -1,6-*core*-Fukose handelt. Die hohe Reaktivität mit GNA deutet auf einen höheren Anteil an Mannose-Resten in dem Sf9-Zell exprimierten IgE hin, was in Übereinstimmung mit den Erwartungen von größtenteils oligomannosidischen und paucimannosidischen Glykanen im Gegensatz zu dem großen Anteil von Komplextypglykanen steht welche in HEK-293-Zellen etabliert werden und auch auf nativen humanen IgE gefunden werden.

Eine detaillierte Betrachtung der Glykosylierung wurde durch MALDI-TOF Analyse von Glykopeptiden der schweren Kette des rekombinanten IgE möglich. Auch wenn die Analyse hauptsächlich auf die Position 3 (Asn218) beschränkt wurde, wurden eindeutige Ergebnisse erhalten. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte im Wesentlichen die Lektin-Analysen und zeigte überwiegend paucimannosidische Glykane, die partiell fukosyliert waren sowie oligomannosidische Strukturen.

Für die übrigen Glykosylierungsstellen konnten zwar insgesamt weniger Glykopeptide identifiziert werden und die Zuordnung war weniger eindeutig möglich, dennoch wurden auch für die Glykosylierungsstellen 2, 5 und bemerkenswerterweise 6, welche im nativen humanen IgE unbesetzt ist, ähnliche Strukturen gefunden. Insgesamt bestätigt die glykoproteomische Analyse mittels Massenspektrometrie also die Erwartungen und die Ergebnisse der Analyse mittels Lektinen, dass das Glykosylierungsmuster des rekombinanten humanen IgE bei der Expression in Sf9-Insektenzellen zu oligo- und paucimannosidischen Glykanen verschoben ist. Für die Position 7 (Asn275) konnten leider keine Daten erhalten werden, jedoch kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, dass diese auch glykosyliert ist, da dies wie zuvor diskutiert einer Bindung des Fc ϵ RI vorausgesetzt ist, welche hier eindeutig nachgewiesen wurde.

Trotz der Modulation der Glykosylierung im Vergleich zu originären humanen Antikörpern, konnte bereits gezeigt werden, dass der in Sf9-Zellen exprimierte IgE in der Lage war den hochaffinen Fc ϵ -Rezeptor zu binden. Dies ist die Grundvoraussetzung für die biologische Aktivität des Isotyps, welche durch die Bindung auf Mastzellen und Basophilen über den Fc ϵ RI und anschließende Quervernetzung durch multivalente Allergene vermittelt wird. Das Potential des rekombinanten IgE eben diese Effektorfunktion zu vermitteln wurde anhand eines Degranulationsassays nachgewiesen und verglichen mit einem in Mammaliazellen exprimiertem rekombinanten IgE sowie nativem humanem Myeloma-IgE. Die hier als Modell

für humane Basophile verwendete Zelllinie war eine basophile Leukämie-Zelllinie aus der Ratte, welche mit dem humanen FcεRI stabil transfiziert ist, sodass die Zellen diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen und humanen IgE binden können. Durch die Quervernetzung des IgE können die Zellen zur Degranulation gebracht werden, was durch die Freisetzung des Mediators β -Hexosaminidase nachgewiesen wird. Da die drei verwendeten Antikörper nicht dieselbe Spezifität aufwiesen und die Affinitäten und Antigensvalenz Einfluss auf die vermittelte Degranulation haben, wurde mit einem anti-human IgE Antikörper antigenunabhängig quervernetzt. Dies lässt eine Beurteilung der biologischen Aktivität dieses Antikörpers allein anhand des Expressionshintergrunds der Antikörper zu. Die Analyse zeigte, dass der rekombinante IgE aus Sf9-Zellen in gleichem Maße wie der Mammaliazell-exprimierte und der native humane Myeloma-IgE das intrinsische Potential zur Degranulation von Basophilen besitzt. Für alle untersuchten IgE-Antikörper reichten bereits kleinste Mengen des Quervernetzungsreagenzes aus, um eine effektive Degranulation zu induzieren. Die biologische Aktivität wird also, wenn überhaupt nur in geringem Maße durch den Expressionshintergrund und die damit zusammenhängende Verschiebung der N-Glykosylierung zu oligo- und paucimannosidischen Glykanen im Vergleich zu den in Mammalia überwiegend etablierten Komplextypglykanen beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die baculoviral medierte Expression in Sf9-Zellen einen leporid/humanen chimären IgE liefert, welcher trotz der Sf9-Zell-typischen Glykosylierung alle Charakteristika eines voll funktionalen humanen IgE aufweist und seine Antigene mit hohen Affinitäten bindet. Daher scheint es sich hierbei um ein sehr vielversprechendes Expressionssystem zu handeln, um große Mengen humaner Antikörper auch komplexerer Isotypen in relativ kurzer Zeit zu erhalten. Die Verwendung dieses Systems zur Expression von dem chimären murin/humanen HyHEL 10 IgE-Antikörper zeigte insgesamt jedoch deutlich niedrigere Expressionsraten. Trotzdem scheint das Baculovirus-expressionssystem zur IgE-Expression nach wie vor zumindest für einige Konstrukte der Mammaliazell-expression überlegen. Die Optimierung der jeweils individuellen Expressionsbedingungen bzw. die Verwendung von für die Insektenzellexpression codonoptimierten Expressionsvektoren könnte hier in Zukunft außerdem noch zu besseren Ausbeuten führen.

Der molekulare Zugang zu größeren Mengen an humanen IgE-Antikörpern kann in Zukunft nicht nur zur Verbesserung und Standardisierung bestehender Assays verwendet werden, sondern auch zum Verständnis der T_H2-basierten Immunantwort beitragen und zu neuen Therapieansätzen für allergische Erkrankungen und parasitäre Infektionen führen. Bei

leporid/humanen IgE-Antikörpern könnte es sich um wertvolle neuartige artifizielle Antikörper mit vielseitigen Einsatzmöglichkeiten handeln, da sie sowohl humane Effektorfunktionen vermitteln können als auch die hohen Affinitäten bieten, die durch die Besonderheiten des leporiden Immunsystems ermöglicht werden [147].

Auch die Expression von humanen IgG-Antikörpern und Fab-Fragmenten ist in der Arbeitsgruppe mit mittleren bis hohen Expressionsraten in Sf9-Zellen gelungen. Die Möglichkeit zur Expression von IgA und IgM bleibt offen und wäre sicherlich interessant, da auch diese Isotypen durch rekombinante Expression in Mammaliazellen schwer zu erhalten sind. Da die in Sf9-Zellen exprimierten Proteine keine immunogenen Glykane, wie das α -1,3-Fukose-Epitop, aufweisen, könnten die so erhaltenen Antikörper unter Umständen auch als Therapeutika eingesetzt werden.

Die rekombinante Verfügbarkeit von humanem IgE ermöglicht die Nutzung dieser Antikörper in einer Reihe von Anwendungen. Hier wurde der CCD-spezifische humane IgE, welcher in Sf9-Zellen exprimiert wurde und voll funktional war, für die Evaluation einer potentiellen Standardisierung des ELIFAB-Assays verwendet. Der ELIFAB-Assay stellt die ELISA-basierte Weiterentwicklung des IgE-FAB-Assays dar und bietet durch die zellfreie Methodik entscheidende Vorteile [142]. So ist der Assay unabhängig von EBV-transformierten (Ebstein-Barr-Virus) B-Zellen, was die zeitintensive Zellkultur und instrumentell aufwändigen durchflusszytometrischen Messungen obsolet macht. Der Assay basiert auf dem Prinzip, dass blockierende IgG₄-Antikörper die Bildung von IgE-Allergen-Immunkomplexen und so deren Bindung an CD23 verhindern und wird eingesetzt, um den Erfolg einer SIT zu beurteilen. Die SIT ist bislang die einzige kurative Behandlung für Allergien und strebt die Toleranz des Patienten gegenüber einem Allergen nach wiederholter Gabe steigender Dosen dieses Allergens an [180]. Jedoch sind die der Therapie zugrundeliegenden Mechanismen bis heute nicht vollständig verstanden und der Erfolg stellt sich bei einigen Patienten u.a. in Abhängigkeit von dem Allergie-verursachenden Antigen erst nach Jahren oder gar nicht ein [181, 182]. Außerdem wird nicht zwangsläufig eine lebenslange Toleranz erreicht [183]. Es ist somit notwendig während und nach der SIT das Maß der Desensibilisierung zu überprüfen ohne den Patienten erneut dem Allergen aussetzen zu müssen. Dies könnte besonders in der Hymenoptereingiftallergie bei nicht ausreichendem Schutz zu lebensbedrohlichen Reaktionen führen. Es gilt als erwiesen, dass während einer SIT eine Verschiebung von der allergenspezifischen T_H2- zu einer T_H1-Antwort auftritt und allergenspezifische blockierende IgG₄-Antikörper gebildet werden [184]. Durch Analyse der blockierenden Eigenschaften der

Diskussion

Seren von Patienten, die eine SIT erhalten haben, mittels ELIFAB kann häufig auf den Erfolg der Therapie zurückgeschlossen werden.

Dazu wird ein Indikatorserum mit hohen allergenspezifischen IgE-Titern benötigt. Das Indikatorserum wird mit dem Allergen inkubiert, sodass sich IgE-Antigen-Komplexe bilden, deren Bindung an CD23 gemessen wird. Durch Vermessung von Proben mit und ohne das Patientenserum kann der durch spezifische IgG-Antikörper vermittelte blockierende Effekt gemessen werden. Es wurde bislang davon ausgegangen, dass dieser blockierende Effekt durch Antikörper der Subklasse IgG₄ vermittelt wird. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass alle IgG-Subklassen mit entsprechender Antigen-spezifität die IgE-Aktivität in *in vitro* Assays inhibieren [185]. Inwieweit andere Subklassen für die SIT relevant sind, ist jedoch unklar. Als Indikatorseren werden bislang humane Seren von atopischen Patienten verwendet, welche hohe Titer des IgE mit Spezifität für das jeweilige Allergen von Interesse aufweisen. Der Nachteil hierbei ist, dass diese Seren natürlichen Schwankungen bezüglich der IgE-Titer und der Gesamtzusammensetzung anderer Isotypen unterliegen. Dadurch wird eine Standardisierung der Methode unmöglich, da es nicht möglich ist über einen längeren Zeitraum dasselbe Indikatorserum zu verwenden. Außerdem ist es notwendig die Seren von humanen Spendern zu entnehmen, was die Verfügbarkeit erheblich einschränkt. Für eine bessere Reproduzierbarkeit des Assays wurde hier die Möglichkeit, rekombinanten IgE als Ersatz für das Indikatorserum zu verwenden, untersucht.

Der verwendete humane IgE hat eine Spezifität für CCDs vom MMXF³-Typ, weshalb als Antigen in diesem Testsystem HRP verwendet wurde, welches solche Glykane trägt. Drei humane Spenderseren mit verschiedenen hohen CCD-spezifischen IgG-Titern wurden im ELIFAB vermessen, um die generelle Machbarkeit der Methodik zu untersuchen und zu demonstrieren. Es konnte hier zunächst gezeigt werden, dass für die drei verwendeten Patientenseren eine deutliche Verringerung des ELIFAB-Signals erreicht werden konnte, wenn die Patientenseren während der Komplexbildung zugesetzt wurden. Außerdem stieg das Ausmaß dieser Verringerung des Signals mit zunehmenden CCD-spezifischen IgG-Titern im Patientenserum. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erwartungen und den üblicherweise im ELIFAB beobachteten Tendenzen überein und beweisen, dass der eingesetzte rekombinante humane IgE aus Sf9-Insektenzellen in der Lage ist, Komplexe mit seinem Antigen HRP zu bilden und dass diese Komplexe von CD23 effizient gebunden werden. Außerdem wird diese Komplexbildung, ebenso wie bei der Verwendung von nativen humanen IgE-Antikörpern, in Anwesenheit von antigenspezifischen humanen IgG₄-Antikörpern blockiert. Diese als *proof of concept* zu verstehende Analyse zeigt, dass alle Voraussetzungen für den

Einsatz rekombinanter monoklonaler IgE Antikörper als Ersatz für humane Indikatorseren prinzipiell erfüllt sind.

Die rekombinante Expression macht humane IgE-Antikörper definierter Spezifität zugänglich und so können in Zukunft für allergierelevante Antigene spezifische monoklonale IgE-Antikörper gleichbleibender Qualität produziert und im ELIFAB-Assay sowie vermutlich auch in vielen weiteren immunologischen Assays, eingesetzt werden. Die Verwendung monoklonaler Antikörper erlaubt neben besserer Reproduzierbarkeit auch die komponentenaufgelöste Betrachtung der Patientenseren und könnte so in der Zukunft zu erheblich besseren Therapiemöglichkeiten beitragen.

5.3 Strukturelle Analysen des CCD-spezifischen humanen IgE mittels *small angle X ray scattering* (SAXS)

Strukturelle Analysen von IgE-Antikörpern wurden bislang durch die limitierte Verfügbarkeit dieses Isotyps erschwert, weshalb Daten zu humanem IgE nur für Fc-Fragmente (C_H3-4 oder C_H2-4) vorlagen. Durch die Expression des chimären IgE mit humanen konstanten Domänen in großem Maßstab war nun erstmal die strukturelle Analysen des humanen Vollängen-IgE mittels SAXS möglich. SAXS ist eine bewährte Methode für die niedrigauflösende strukturelle Charakterisierung von biologischen Makromolekülen in Lösung und ergänzt hochauflösende Methoden wie Röntgenstrukturkristallographie und NMR-Spektroskopie [186]. Bereits 1990 wurde mittels SAXS ein Modell des Ratten-IgE von Davis *et al.* erstellt [187], was das Potential der Methode verdeutlicht.

Das physikalische Prinzip, welches der Methode zugrunde liegt, beruht auf der Streuung von Röntgenstrahlung an den in Lösung befindlichen Partikeln. Die Wellen der gestreuten Strahlung interferieren sowohl konstruktiv als auch destruktiv, sodass sich ein individuelles Streumuster ergibt, das detektiert wird. Dieses Muster ist abhängig von Größe und Form der streuenden Partikel, weshalb aus den erhaltenen Streudaten auf diese Parameter zurückgeschlossen werden kann [188]. Da die Partikel allerdings nicht wie in einem Proteinkristall geordnet sind, sondern in zufälliger Anordnung vorliegen, hat die Methode eine geringere Auflösung als die Röntgenkristallographie. Es kann so also nicht die Platzierung einzelner Aminosäuren bestimmt werden, jedoch können große Strukturen (wenige kDa bis hin zu GDa) wie etwa die Ausrichtung einzelner Proteindomänen mit hoher Präzision beschrieben werden [189].

Diskussion

Für eine akkurate Interpretation der Streudaten muss die vermessene Probe monodisperse identische Partikel enthalten, weshalb der Proteinreinigung eine große Bedeutung zukommt. Der hier analysierte humane IgE wurde daher über drei chromatographische Schritte gereinigt. Der Isolation aus dem Sf9-Kulturüberstand mittels IMAC wurden eine Kationenaustauschchromatographie sowie eine Gelfiltration angeschlossen. Die so erhaltene Probe enthielt neben dem intakten IgE zusätzlich einen geringen Anteil eines etwa 80 kDa schweren Fragments des Antikörpers, welcher ebenfalls Teile der schweren Kette enthielt. Da sich diese Verunreinigung zwar bis zu einem gewissen Grad abreichern aber nicht ganz entfernen ließ, kann davon ausgegangen werden, dass der intakte IgE in geringem Maße degradiert und dieses Fragment abspaltet. Die Analyse mittels Coomassie-gefärbtem Polyacrylamidgel ergab außerdem, dass es sich lediglich, um einen geringen Prozentsatz der Gesamtproteinmenge handelte, weshalb die Probe ohne weitere Reinigungsschritte mittels SAXS vermessen wurde. Da der zugrundeliegende physikalische Effekt relativ schwach ist, müssen die verwendeten Proben hoch konzentriert mit üblicherweise mehr als 1 mg/mL vorliegen, wobei die Probenaggregation dennoch ausgeschlossen werden muss. Außerdem muss die Probe ausreichend verdünnt sein, um interpartikuläre Interaktionen zu vermeiden [190]. Daher wurden drei serielle Verdünnungen des IgE vermessen, wobei sich zeigte, dass lediglich die höchste Konzentration von 5.4 mg/mL eine zur Auswertung ausreichende Signalintensität erzeugte.

Die Monodispersität der Probe sowie verdünnungsbedingte Interaktionen lassen sich am einfachsten anhand des Guinier-Plots bewerten. Die Auswertung der erhaltenen Daten für den CCD-spezifischen rekombinanten IgE zeigte die Linearität des Guinier-Plots. Dies demonstriert in der Regel bereits eine gute Probenqualität, da aggregierte Proteine oder starke Wechselwirkungen zwischen den Partikeln zu einer Abweichung von dieser Geraden führen würden [144, 191]. Aus der Steigung der Guinier-Geraden kann zusätzlich direkt der Streumasseradius berechnet werden. Dieser gibt den Effektivwert der Distanzen zu dem Mittelpunkt der Dichte des Moleküls an und ist eine Maß für die Gesamtgröße des Partikels [190]. Für den vermessenen IgE ergab sich aus dem Guinier-Plot ein Streumasseradius von 52.7 Å. Im Vergleich dazu sind die Radien verschiedener humanisierter IgG-Antikörper, welche ebenfalls mittels SAXS bestimmt wurden, etwas niedriger im Bereich zwischen 47.6 und 49.4 Å [192]. Die Differenz von etwa 3-5 Å entspricht allerdings weniger als für die zusätzliche Domäne des IgE angenommen werden müsste, wenn der Fc-Teil in gestreckter Konformation vorliegen würde. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass der rekombinante IgE in kompakter Form vorliegt.

Die indirekte Fourier Transformation der Streudaten ergibt die Paar-Abstands-Verteilungsfunktion und ist in einer verdünnten monodispersen Lösung ein Histogramm der Entfernungen zwischen Paaren von Punkten innerhalb des vermessenen Partikels. Die Form der erhaltenen Kurve gibt Aufschluss über die Form des Proteins und die hier beobachtete Glockenform, indiziert stark, dass es sich bei dem vermessenen IgE um ein globuläres Protein handelt. Da die Kurve leicht in Richtung höherer Abstände ausläuft, kann eine leicht elongierte Struktur des IgE angenommen werden, jedoch ist dieser Effekt nicht deutlich ausgeprägt und es scheint sich insgesamt um ein eher kompaktes Molekül zu handeln. Ein flacher Kurvenverlauf ohne deutlich sichtbares Maximum würde ungeordnete und stark flexible Molekülbereiche andeuten [190]. Das hier sehr deutlich ausgeprägte Maximum hingegen zeigt einen großen Teil an geordneten Bereichen im IgE an. Dies stimmt mit der Domänenstruktur von Antikörpern überein, die lediglich über kurze etwas flexiblere Bereiche verbunden sind. Das für den IgE erhaltene Maximum der IFT-Kurve liegt etwa bei einem Abstand von 50 Å, was in guter Übereinstimmung mit dem aus dem Guinier-Plot erhaltenen Streumasseradius von 52.7 Å ist. Die maximale Dimension des IgE ist gegeben als D_{\max} und wurde aus dem x-Achsen-Abschnitt als 190 Å ermittelt. Damit liegt der Wert sinnvollerweise über dem angenommen doppelten hydrodynamischen Radius des IgE-Antikörper.

Obwohl diese Daten bereits auf ein geordnetes kompaktes Molekül hinweisen, kann die Flexibilität eines Proteins am besten durch Auftragung des Kratky-Plots beurteilt werden. Hier gilt, dass die Kurve für flexible Strukturen bei mittleren und hohen s -Werten ansteigt, während kompakte, rigide Strukturen einen flachen Kurvenverlauf bei mittleren und hohen s -Werten zeigen und stetig gegen Null gehen [188]. Der Kratky-Plot, welcher aus den Streudaten des IgE erhalten wurde, zeigt eindeutig keinen Kurvenanstieg bei hohen s -Werten, sondern ein Plateau und einen leichten Abfall gegen Null. Der Kurvenverlauf zeigt damit eindeutig, dass es sich bei dem rekombinanten humanen IgE trotz seiner Größe um ein kompaktes wenig flexibles Molekül handelt. Im Vergleich zu den Kratky-Plots von IgG-Antikörpern scheint IgE sogar der deutlich unflexiblere Isotyp zu sein [192, 193]. Dies kann zum Teil durch das Fehlen der *hinge*-Region und die geringere Flexibilität der C_H2 -Domäne, welche diese strukturell ersetzt, erklärt werden.

Insgesamt legen die aus den SAXS-Daten extrahierten Ergebnisse nahe, dass es sich bei dem untersuchten rekombinanten humanen IgE um ein kompaktes Molekül mit einem hydrodynamischen Radius von etwa 53 Å handelt, welches kaum strukturelle Flexibilität zeigt. Die erhaltenen Daten bezüglich Form und Größe des IgE bestätigen damit, die Theorie, dass humaner IgE in Lösung eine kompakte *bent*-Konformation einnimmt, was bereits in

kristallographischen Untersuchungen des IgE-Fc gezeigt wurde [110, 111], da die Daten mit einer gestreckten Konformation des IgE nicht in Einklang zu bringen sind. Ein ineinander gefalteter Fc-Teil kann aufgrund der zahlreicheren intramolekularen Wechselwirkungen auch die eingeschränkte Flexibilität erklären.

Außerdem lieferte das gewählte Protokoll zur Expression, Reinigung und Vorbereitung des rekombinanten IgE eine Probe guter Qualität mit hoher Monodispersität und nicht nachweisbarer Aggregation. Dies scheinen gute Bedingungen für folgende SAXS-Messungen mit höherer Auflösung unter Nutzung einer Synchrotronröntgenquelle zu sein. Dadurch werden auch zuverlässige Strukturmodelle des IgE mit atomarer Auflösung zugänglich. Des Weiteren legt die Rigidität des IgE röntgenkristallographische Ansätze zur Strukturaufklärung nahe.

5.4 Ausblick

Der Einsatz von rekombinanten CCD-freien Allergenen aus dem Gift von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* verbessert die diagnostische Differenzierung zwischen Allergien gegen diese eng verwandten Spezies. In vielen Fällen konnte bereits durch die Analyse der sIgE-Reaktivitäten *in vitro* die für die genuine Sensibilisierung verantwortliche Spezies bestimmt werden. In Zukunft könnte die Verwendung der hier eingesetzten Allergene in einem Format wie dem hier vorgestellten EUROLIne Assays routinemäßig in der Allergiediagnostik für Patienten mit möglicher Feldwespenallergie eingesetzt werden. Die Interpretation der Daten ist allerdings nicht einfach und eine eindeutige Aussage nur bedingt möglich. Alternative diagnostische Verfahren, z.B. Hauttests oder BAT Analysen unter Verwendung der rekombinanten Moleküle sind sicherlich geeignet, hier eine größere Klarheit zu schaffen. Allerdings sind genau das die Ansätze, deren Realisierung aufwändig und deren Interpretation schwierig ist. Die Entwicklung verbesserter serologischer Verfahren wäre für Diagnostik sicherlich der beste Ansatz. Die Identifizierung neuer Allergene aus dem Gift von *Polistes dominula* und *Vespula vulgaris* könnte hierbei entscheidend sein, da es erstrebenswert ist ein Markerallergen für diese Spezies zu ermitteln, welches keine oder nur geringe Kreuzreaktivität zu Wespengiftkomponenten und hohe sIgE-Reaktivitäten innerhalb der Gruppe von Feldwespengiftallergikern aufweist. Neben den hier verwendeten bereits als Allergene klassifizierten Proteinen aus dem Gift von *Polistes dominula*, könnte z.B. eine Hyaluronidase eine Rolle spielen, da ein entsprechendes Allergen bereits für *Polistes gallicus* und *Polistes annularis* beschrieben ist [194]. Jedoch wären auch hier vermutlich Kreuzreaktivitäten mit den

Wespen giftthyaluronidasen Ves v 2A und B zu erwarten, wobei die Sensibilisierung von Wespen giftallergikern auf diese Allergene deutlich seltener als für Ves v 1 und Ves v 5 ist. Umfangreiche Proteom-Analysen sind aber sicherlich der vielversprechendste Weg um eine Differentialdiagnostik zu erzielen. Neben den hier adressierten Allergenen aus dem Gift von *Polistes dominula* ist eine zukünftige Analyse der Gifte verschiedenster Spezies und eine umfassende IgE-Analytik entscheidend, um therapeutische Optionen und damit die Sicherheit der Patienten gewährleisten zu können.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass das Baculovirusexpressionssystem geeignet ist substantielle Mengen voll funktionalen biologisch aktiven humanen IgE zu produzieren. Die Verfügbarkeit eines solchen Systems kann zur breiten Verfügbarkeit rekombinanter IgE Antikörper und damit zum Einsatz rekombinanter Verfahren in der Allergologie beitragen. Die variante Glykosylierung und ihre Manipulation werden zunehmend Einblicke in die Bedeutung für die biologische Funktion erlauben.

Weiterhin konnte dargelegt werden, dass durch Einsatz von rekombinantem IgE als Indikatorserum im ELIFAB-Assay eine potentielle Standardisierung des Assays möglich wäre. Die Verifizierung dieser These unter Verwendung weiterer rekombinanter humaner IgE-Antikörper mit Spezifität für relevante Protein-Allergene könnte diesen Ansatz flächendeckend zugänglich machen. Hierfür wären IgE-Antikörper, die bedeutsame Majorallergene aus Bereichen, in denen üblicherweise SIT eingesetzt werden, von gesteigertem Interesse. Dazu gehören neben den Hymenoptergiften auch verschiedene Pollen. Inwieweit eine Notwendigkeit von zwei oder sogar mehreren IgE erforderlich wird, muss in weiterführenden Analysen geklärt werden. Außerdem könnte die Analyse von Patientenseren nach SIT unter Verwendung monoklonaler Allergen-spezifischer Antikörper eine komponentenaufgelöste Evaluation blockierender IgG₄-Titer erlauben. Dies könnte zu der Identifizierung von Profilen führen, welche das Versagen einer SIT begünstigen und somit helfen die Therapiemöglichkeiten für solche Risiko-Patienten zu verbessern. Die SAXS-Analyse des rekombinanten IgE hat ergeben, dass dieser auch im Vergleich zu IgG-Antikörpern inflexibel ist, was es eventuell möglich machen könnte, IgE-Proteinkristalle zu erhalten, welche erstmals die Lösung einer Röntgenstruktur dieses Isotyps zulassen würde. Daher werden derzeit Versuche zur Kristallisation dieses Antikörpers durchgeführt. Auch durch die Modell-basierte Auswertung von SAXS-Daten können strukturelle Modelle mit atomarer Auflösung erhalten werden. Erste Versuche ergaben allerdings eine pseudo-C3-Symmetrie des untersuchten IgE-Antikörpers, was eine zuverlässige Auswertung erschwert. Die SAXS-Messung eines IgE im Komplex mit seinem Antigen würde dieses Problem lösen, da diese pseudo-Symmetrie

dadurch aufgehoben würde. Der in dieser Arbeit verwendete IgE hat eine Spezifität für CCDs und α -1,3-fukosylierte Proteine könnten daher als Antigen verwendet werden. Jedoch würde ein Antigen mit exakt einer Glykosylierung in hoher Reinheit benötigt, um Aggregation zu vermeiden. Zudem müsste die Affinität des Antikörpers hoch genug sein, um eine Dissoziation des Antigens während der Messung weitestgehend zu reduzieren. Da diese Bedingungen für den HMM5 IgE schwer zu gewährleisten sind, sollen diese Experimente mit dem häufig als Modellantikörper verwendeten HyHEL 10 wiederholt werden. Dieser bindet sein Antigen Hühnereilysozym mit hoher Affinität und das Antigen steht in ausreichender Reinheit zur Verfügung. Durch Durchführung der SAXS-Messungen an einer Synchrotronröntgenquelle könnte beitragen, die Auflösung deutlich zu steigern.

Die Verwendung des HyHEL 10 Antikörpers hat außerdem den Vorteil, dass er unter Umständen besser für eine röntgenkristallographische Analyse geeignet ist, da Lysozym bekannter Weise äußerst gut kristallisiert. Ein Komplex aus Antikörper und Antigen könnte somit besser für eine Kristallisation geeignet sein als der IgE alleine. Erste Expressionsversuche des HyHEL 10 IgE zeigten zwar eine geringere Expressionsrate in Sf9-Zellen, durch Optimierung der Expressionsbedingungen könnten unter Umständen aber ausreichende Mengen des HyHEL 10 IgE zur Verfügung gestellt werden.

Eine hochauflösende Struktur des intakten humanen IgE würde entscheidend zum Verständnis von Allergien, parasitären Infektionen und der Immunüberwachung bei Tumorerkrankungen beisteuern und einen wertvollen Beitrag zu der Therapieentwicklung IgE-vermittelter Erkrankungen liefern.

.

6. Zusammenfassung

Allergien betreffen etwa ein Viertel aller Individuen in Industrienationen und die Prävalenz steigt stetig. Bis zu 5% der Bevölkerung reagieren auf Stiche von Insekten mit systemischen Reaktionen bis hin zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock [60]. Besonders häufig unter den allergieverursachenden Insekten sind Spezies der Hymenopteren vertreten, wie die Honigbiene *Apis mellifera*, die gemeine Wespe *Vespula vulgaris* und im südlichen Europa auch die Feldwespe *Polistes dominula*. Als einzige kurative Therapie von Allergien steht bislang ausschließlich eine spezifische Immuntherapie (SIT) zur Verfügung, welcher eine sorgfältige Diagnostik vorausgehen muss. Aufgrund von CCD- und proteinbasierten Kreuzreaktivitäten zwischen Giften verschiedener Spezies gestaltet sich dies besonders in der Hymenopterengiftallergie häufig als schwierig. Die Differenzierung zwischen Bienen- und Wespengiftallergie konnte durch die Verwendung von rekombinanten CCD-freien Allergenen bereits erheblich verbessert werden. Da es sich bei gemeinen Wespen und Feldwespen um eng verwandte Spezies handelt, und sich *Polistes dominula* als invasive Spezies weiter von Südeuropa her ausbreitet, wird eine bislang kaum verfügbare differentielle Diagnostik auch hier dringend gebraucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür rekombinante Allergene aus dem Gift der Feldwespe *Polistes dominula* und der gemeinen Wespe *Vespula vulgaris* etabliert, charakterisiert und in einem Assay-Prototypen eingesetzt, um sIgE-Reaktivitäten von insgesamt 106 Patientenseren auf die Phospholipasen A1 Pol d 1 und Ves v 1, die Antigene 5 Pol d 5 und Ves v 5, die Serinprotease Pol d 4, sowie die Giftextrakte und einen CCD-Marker zu messen und zu analysieren. Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass in vielen Fällen durch molekulare Diagnostik die genuine Sensibilisierung auf eines der Gifte von einer kreuzreaktiven Reaktivität unterschieden werden kann. Die Ergebnisse illustrieren die Notwendigkeit der Verwendung eines möglichst breiten Spektrums rekombinanter CCD-freier Allergene in der *in vitro* Diagnostik.

Die T_H2-getriebene Immunantwort gegen Parasiten und Allergene ist in der Regel mit einem erhöhten Serumtiter von hochaffinen antigenspezifischen IgE-Antikörpern verbunden. Die Fähigkeit auf kleinste Mengen Antigen mit der Auslösung von schweren anaphylaktischen Reaktionen zu reagieren, macht IgE zu einem mechanistisch herausragenden Isotypen, der einzigartige Effektorfunktionen vermittelt. Trotz ihrer Relevanz für die Allergie, in der Immunüberwachung und bei der Bekämpfung von parasitären Infektionen ist über ihre Struktur sowie die hochspezifische Interaktion mit ihren Antigenen noch vieles unbekannt.

Zusammenfassung

Bislang war die limitierte rekombinante Verfügbarkeit von humanen IgE-Antikörpern das Haupthemmnis in der funktionellen und strukturellen Charakterisierung dieses Isotyps. Im Rahmen dieser Arbeit wurde u.a. die Expression von einem chimären Ieporid/humanen IgE mit Spezifität für CCDs vorgestellt. Unter Verwendung des Baculovirusexpressionssystem konnte in Sf9-Insektenzellen voll funktionaler IgE in Ausbeuten von über 30 mg/L erhalten werden. Die anschließende funktionelle Charakterisierung dieses Antikörpers zeigte die spezifische Interaktion mit verschiedenen Antigenen, dem hochaffinen FcεRI und spezifischen Antikörpern. Eine Analyse der Glykosylierung mittels Massenspektrometrie sowie unter Verwendung von Lektinen offenbarte hauptsächlich oligo- und teilweise fukosylierte paucimannosidische Glykane, welche typischerweise von Sf9-Zellen etabliert werden. Diese Befunde in Kombination mit Resultaten von Effektorzell-Analysen belegen, dass eine Modifikation der Glykosylierung nicht mit einer Veränderung der biologischen Aktivität einhergeht.

Initiale Daten zeigen zudem, dass monoklonale IgE als Äquivalent zu humanen Seren und damit zur Standardisierung analytischer Verfahren wie des ELIFAB-Assays geeignet sind, welcher damit das Potential zur diagnostischen Erfolgskontrolle im Verlauf einer spezifischen Immuntherapie besitzt.

Erstmals war durch die guten Ausbeuten auch die strukturelle Charakterisierung eines intakten IgE-Antikörpers möglich. Dies wurde in SAXS-Messungen und der Dateninterpretation mittels Modell-unabhängigen *ab initio* Methoden durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der untersuchte IgE ein kompaktes Protein mit globulärer Struktur ist, welches offensichtlich nur geringe strukturelle Flexibilität aufweist. Dies sowie der erhaltene Molekülradius von etwa 53 Å legen nahe, dass humaner IgE in Lösung nicht in gestreckter, sondern in der sogenannten *bent*-Konformation vorliegt, was für den Fc-Teil des IgE bereits aufgrund kristallographischer Studien des IgE-Fc vermutet wurde.

Insgesamt werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sowohl zum Verständnis des IgE-Allergen-Netzwerks und von Allergien im Speziellen als auch zu der Verbesserung bestehender diagnostischer Testsysteme beitragen.

7. Abstract

Allergies affect about a quarter of all individuals in industrial nations and the prevalence is continuously rising. Up to 5% of the population reacts to stings from insects with systemic reactions that go as far as to life threatening anaphylactic shocks [60]. Species of the hymenoptera order such as the honey bee *Apis mellifera* and the yellow jacket *Vespula vulgaris* as well as the paper wasp *Polistes dominula* in southern Europe are particularly frequent provokers of allergic reactions. The only available curative therapy for allergies so far is the specific immunotherapy (SIT), which requires thorough prior diagnostics. CCD- and protein-based cross reactivity between venoms from different species render diagnostic approaches in hymenoptera venom allergy in the majority of cases especially difficult. The differentiation between honey bee and yellow jacket venom allergy could already be highly improved by use of recombinant CCD-free allergens. For yellow jackets and paper wasps are closely related species and *Polistes dominula* is an invasive species that spreads from the Mediterranean area throughout northern Europe, now barely available differential diagnostics are much-needed here, as well.

For this approach recombinant allergens from the venom of the paper wasp *Polistes dominula* and the yellow jacket *Vespula vulgaris* were established, characterized and used in an assay-prototype to measure and analyze sIgE reactivities from 106 patient sera against the phospholipases Ves v 1 and Pol d 1, the antigens 5 Ves v 5 and Pol d 5, the serine protease Pol d 4 as well as venom extracts and a CCD marker were determined and analyzed. This study could show that molecular diagnostics can in many cases distinguish genuine sensitization to only one of the hymenoptera venoms from cross reactivities. These findings illustrate the necessity of the application of the broadest possible spectrum of recombinant CCD-free allergens in *in vitro* diagnostics.

The T_H2-biased immune response against parasites and allergens is usually linked to elevated antigen specific high affinity IgE titers in patients' sera. The ability to react to minute amounts of antigen and thereby provoking severe anaphylactic reactions renders IgE mechanistically an outstanding isotype that mediates unique effector functions. Despite its relevance in allergy, immune surveillance and immune response to parasitic infections structural knowledge about human IgE and the antibodies interaction with antigens is scarce. To date the limited recombinant availability of human IgE antibodies hampered the functional and structural characterization of this isotype. Within this thesis the expression of a chimeric leporid/human IgE with specificity for CCDs among others was presented. Using the

Abstract

baculovirus expression system fully functional IgE could be obtained from Sf9 insect cells in yields of more than 30 mg/L. Subsequent functional characterization of this antibody proved specific interaction with different antigens, the high affinity FcεRI as well as specific antibodies. The analyses of the glycosylation via mass spectrometry and application of lectins in ELISA revealed predominantly oligo- and partially fucosylated paucimannosidic glycans, which are typically established by Sf9 insect cells. These findings in combination with results from effector cell analysis prove that the altered glycosylation does not go along with a change in biologic activity. Initial data furthermore demonstrate that monoclonal IgE is suitable as equivalent for human sera and therefore as standardization for analytic methods such as the ELIFAB assay, which thereby has the potential for diagnostic monitoring of success of specific immunotherapy.

For the first time the high yields allowed for the structural characterization of an intact IgE antibody. This was achieved by SAXS measurements and subsequent model independent *ab initio* interpretation of the obtained data. Thereby it could be shown that the analyzed IgE is a compact protein with a globular structure, which obviously showed little structural flexibility. This as well as the obtained radius of gyration of approximately 53 Å indicates that human IgE adopts a bent conformation in solution like already indicated for the IgE-Fc part by X-ray crystallographic analyses of the IgE-Fc part.

Altogether the results obtained from this work will contribute to the understanding of the IgE-allergen-network and allergies in particular as well as to the improvement of established diagnostic assays.

8. Literatur

1. Pirquet, v., *Allergie*. Munch Med Woch, 1906. **53**: p. 1547-48.
2. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
3. de Monchy, J.G., et al., *Allergology in Europe, the blueprint*. Allergy, 2013. **68**(10): p. 1211-8.
4. Valenta, R., *The future of antigen-specific immunotherapy of allergy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 446-53.
5. Ring, J., et al., *Global Allergy Forum and Second Davos Declaration 2013 Allergy: Barriers to cure--challenges and actions to be taken*. Allergy, 2014. **69**(8): p. 978-82.
6. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Advances in allergen immunotherapy: aiming for complete tolerance to allergens*. Sci Transl Med, 2015. **7**(280): p. 280ps6.
7. Gell, P. and R. Coombs, *The classification of allergic reactions underlying disease*. Clinical Aspects of immunology (chapter 13). 1963, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
8. Descotes, J. and G. Choquet-Kastylevsky, *Gell and Coombs's classification: is it still valid?* Toxicology, 2001. **158**(1-2): p. 43-9.
9. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med. **18**(5): p. 693-704.
10. Czarnobilska, E., K. Obtulowicz, and K. Wsolek, *[Type IV of hypersensitivity and its subtypes]*. Przegl Lek, 2007. **64**(7-8): p. 506-8.
11. Johansson, S.G., et al., *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force*. Allergy, 2001. **56**(9): p. 813-24.
12. Herrick, C.A. and K. Bottomly, *To respond or not to respond: T cells in allergic asthma*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 405-12.
13. Annunziato, F., C. Romagnani, and S. Romagnani, *The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(3): p. 626-35.
14. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
15. Glimcher, L.H., *Trawling for treasure: tales of T-bet*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 448-50.

16. Grant, C.R., et al., *Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions*. *Autoimmun Rev*, 2015. **14**(2): p. 105-16.
17. Pandiyan, P. and J. Zhu, *Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3 regulatory T cells*. *Cytokine*, 2015.
18. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
19. Wynn, T.A., *Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(5): p. 271-82.
20. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. *Science*, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
21. Kay, A.B., *Allergy and allergic diseases. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(1): p. 30-7.
22. Valenta, R., et al., *Food allergies: the basics*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(6): p. 1120-31.e4.
23. Wambre, E., E.A. James, and W.W. Kwok, *Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(6): p. 700-6.
24. Saenz, S.A., B.C. Taylor, and D. Artis, *Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites*. *Immunol Rev*, 2008. **226**: p. 172-90.
25. Soumelis, V., et al., *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 673-80.
26. Fort, M.M., et al., *IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo*. *Immunity*, 2001. **15**(6): p. 985-95.
27. Palm, N.W., R.K. Rosenstein, and R. Medzhitov, *Allergic host defences*. *Nature*, 2012. **484**(7395): p. 465-72.
28. Licona-Limon, P., et al., *TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(6): p. 536-42.
29. Kabata, H., et al., *Group 2 innate lymphoid cells and asthma*. *Allergol Int*, 2015. **64**(3): p. 227-34.
30. Pichery, M., et al., *Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain*. *J Immunol*, 2012. **188**(7): p. 3488-95.

31. Lefrancais, E. and C. Cayrol, *Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members*. Eur Cytokine Netw. **23**(4): p. 120-7.
32. Nakae, S., et al., *Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy*. Allergol Int. **62**(1): p. 13-20.
33. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1645-51.
34. Paul, W.E. and J. Zhu, *How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 225-35.
35. Yamane, H. and W.E. Paul, *Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets*. Immunol Rev. **252**(1): p. 12-23.
36. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 721-32.
37. de Vries, J.E., et al., *Regulation of the human IgE response by IL4 and IL13*. Res Immunol, 1993. **144**(8): p. 597-601.
38. Pate, M.B., et al., *Regulation and dysregulation of immunoglobulin E: a molecular and clinical perspective*. Clin Mol Allergy, 2010. **8**: p. 3.
39. Dullaers, M., et al., *The who, where, and when of IgE in allergic airway disease*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(3): p. 635-45.
40. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol. **125**(2 Suppl 2): p. S73-80.
41. Schroeder, J.T., *Basophils beyond effector cells of allergic inflammation*. Adv Immunol, 2009. **101**: p. 123-61.
42. Siracusa, M.C., et al., *Basophils and allergic inflammation*. J Allergy Clin Immunol. **132**(4): p. 789-801; quiz 788.
43. Ishizaka, T., et al., *Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release*. J Immunol, 1972. **108**(4): p. 1000-8.
44. Galli, S.J. and M. Tsai, *Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity*. Eur J Immunol. **40**(7): p. 1843-51.
45. Kawakami, T. and S.J. Galli, *Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 773-86.
46. He, S.H., et al., *IL-9(+) IL-10(+) T cells link immediate allergic response to late phase reaction*. Clin Exp Immunol. **165**(1): p. 29-37.

47. Caughey, G.H., *Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense*. Immunol Rev, 2007. **217**: p. 141-54.
48. Trivedi, N.N. and G.H. Caughey, *Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(3): p. 257-67.
49. Larche, M., D.S. Robinson, and A.B. Kay, *The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(3): p. 450-63; quiz 464.
50. Spillner, E., S. Blank, and T. Jakob, *Hymenoptera allergens: from venom to "venome"*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 77.
51. Bilo, B.M. and F. Bonifazi, *Epidemiology of insect-venom anaphylaxis*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(4): p. 330-7.
52. Golden, D.B., et al., *Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(6 Pt 1): p. 760-6.
53. Golden, D.B., et al., *Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update 2011*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(4): p. 852-4 e1-23.
54. Simons, F.E., et al., *Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1 Suppl): p. S2-24.
55. Hoffman, D.R., *Fatal reactions to hymenoptera stings*. Allergy Asthma Proc, 2003. **24**(2): p. 123-7.
56. Bilo, B.M., et al., *Diagnosis of Hymenoptera venom allergy*. Allergy, 2005. **60**(11): p. 1339-49.
57. Korosec, P., et al., *Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies*. Int Arch Allergy Immunol. **161**(4): p. 363-8.
58. Bonifazi, F., et al., *Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice*. Allergy, 2005. **60**(12): p. 1459-70.
59. Bilo, M.B. and F. Bonifazi, *The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(10): p. 1467-76.
60. Przybilla, B. and F. Rueff, *Hymenoptera venom allergy*. J Dtsch Dermatol Ges, 2009. **8**(2): p. 114-27; quiz 128-30.
61. Kohler, J., et al., *Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2014.
62. Monsalve, R.I., et al., *Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify Vespula or Polistes sensitization*. Allergy. **67**(4): p. 528-36.

63. Blank, S., et al., *Polistes species venom is devoid of carbohydrate-based cross-reactivity and allows interference-free diagnostics*. J Allergy Clin Immunol. **131**(4): p. 1239-42.
64. Eberlein, B., et al., *Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(1): p. 155-61.
65. Ebo, D.G., et al., *Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy*. Clin Exp Allergy, 2012. **43**(2): p. 255-61.
66. Hofmann, S.C., et al., *Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **127**(1): p. 265-7.
67. Korosec, P., et al., *High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of Vespula venom allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(5): p. 1406-8.
68. Korosec, P., et al., *Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **128**(3): p. 671-3.
69. Vos, B., et al., *Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to Vespula venom*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **131**(4): p. 1225-7, 1227 e1.
70. Frick, M., et al., *rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom*. Allergy, 2015.
71. Fernandez, J., *Distribution of vespidae species in Europe*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(4): p. 319-24.
72. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
73. Marino, K., et al., *A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(10): p. 713-23.
74. Moremen, K.W., M. Tiemeyer, and A.V. Nairn, *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 448-62.
75. Furmanek, A. and J. Hofsteenge, *Protein C-mannosylation: facts and questions*. Acta Biochim Pol, 2000. **47**(3): p. 781-9.
76. Cummings, R.D., *The repertoire of glycan determinants in the human glycome*. Mol Biosyst, 2009. **5**(10): p. 1087-104.

77. Landsteiner, K., *Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe*. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 1900. **27**: p. 357-362.
78. Mari, A., et al., *Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(6): p. 1005-11.
79. Platts-Mills, T.A., et al., *Delayed Anaphylaxis Involving IgE to Galactose-alpha-1,3-galactose*. Curr Allergy Asthma Rep, 2015. **15**(4): p. 512.
80. Al-Ghouleh, A., et al., *The glycosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent*. PLoS One. **7**(3): p. e33929.
81. Aalberse, R.C., V. Koshte, and J.G. Clemens, *Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom*. J Allergy Clin Immunol, 1981. **68**(5): p. 356-64.
82. Wilson, I.B., et al., *Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha1,3-linked fucose and xylose substitutions*. Glycobiology, 2001. **11**(4): p. 261-74.
83. Altmann, F., *The role of protein glycosylation in allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. **142**(2): p. 99-115.
84. Collot, M., et al., *Synthesis of cross-reactive carbohydrate determinants fragments as tools for in vitro allergy diagnosis*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(3): p. 1306-20.
85. Mari, A., *IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **129**(4): p. 286-95.
86. van der Veen, M.J., et al., *Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(3): p. 327-34.
87. Jappe, U., et al., *In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition*. Allergy, 2006. **61**(10): p. 1220-9.
88. Commins, S.P., et al., *Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(2): p. 426-33.

89. Commins, S.P., et al., *The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose*. J Allergy Clin Immunol.
90. Chung, C.H., et al., *Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1109-17.
91. Gronlund, H., et al., *The carbohydrate galactose-alpha-1,3-galactose is a major IgE-binding epitope on cat IgA*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1189-91.
92. Fagraeus, A., *The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro*. J Immunol, 1948. **58**(1): p. 1-13.
93. Edelman, G.M., *Dissociation of γ -globulin*. J Am Chem Soc, 1959. **81**: p. 3155.
94. Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, and J.V. Ravetch, *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation*. Science, 2006. **313**(5787): p. 670-3.
95. Kapur, R., H.K. Einarsdottir, and G. Vidarsson, *IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly"*. Immunol Lett, 2014. **160**(2): p. 139-44.
96. Irani, V., et al., *Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases*. Mol Immunol, 2015. **67**(2 Pt A): p. 171-82.
97. Bruhns, P., et al., *Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3716-25.
98. Kubagawa, H., et al., *The old but new IgM Fc receptor (FcmuR)*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **382**: p. 3-28.
99. Kaveri, S.V., G.J. Silverman, and J. Bayry, *Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 939-45.
100. Flajnik, M.F. and M. Kasahara, *Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 47-59.
101. Woof, J.M. and M.W. Russell, *Structure and function relationships in IgA*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(6): p. 590-7.
102. Gould, H.J. and B.J. Sutton, *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 205-17.
103. Xu, J.L. and M.M. Davis, *Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 37-45.
104. Davis, M.M., *The evolutionary and structural 'logic' of antigen receptor diversity*. Semin Immunol, 2004. **16**(4): p. 239-43.
105. Jerne, N.K., *THE NATURAL-SELECTION THEORY OF ANTIBODY FORMATION*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1955. **41**(11): p. 849-57.

106. Tonegawa, S., et al., *Evidence for somatic generation of antibody diversity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(10): p. 4027-31.
107. Stanworth, D.R., *The discovery of IgE*. Allergy, 1993. **48**(2): p. 67-71.
108. Harwood, N.E. and J.M. McDonnell, *The intrinsic flexibility of IgE and its role in binding FcepsilonRI*. Biomed Pharmacother, 2007. **61**(1): p. 61-7.
109. Marichal, T., et al., *A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 963-75.
110. Wurzburg, B.A., S.C. Garman, and T.S. Jardetzky, *Structure of the human IgE-Fc C epsilon 3-C epsilon 4 reveals conformational flexibility in the antibody effector domains*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 375-85.
111. Drinkwater, N., B.P. Cossins, and A.H. Keeble, *Human immunoglobulin E flexes between acutely bent and extended conformations*. 2014. **21**(4): p. 397-404.
112. Bevil, A.J., et al., *Bent domain structure of recombinant human IgE-Fc in solution by X-ray and neutron scattering in conjunction with an automated curve fitting procedure*. Biochemistry, 1995. **34**(44): p. 14449-61.
113. Garman, S.C., et al., *Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 259-66.
114. Wurzburg, B.A. and T.S. Jardetzky, *Structural insights into the interactions between human IgE and its high affinity receptor FcepsilonRI*. Mol Immunol, 2002. **38**(14): p. 1063-72.
115. Holdom, M.D., et al., *Conformational changes in IgE contribute to its uniquely slow dissociation rate from receptor Fcvar epsilonRI*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(5): p. 571-6.
116. Kinet, J.P., *The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 931-72.
117. Sayers, I. and B.A. Helm, *The structural basis of human IgE-Fc receptor interactions*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(5): p. 585-94.
118. Daeron, M., *Fc receptor biology*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 203-34.
119. Yano, K., et al., *Production of macrophage inflammatory protein-1alpha by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability*. Lab Invest, 1997. **77**(2): p. 185-93.
120. MacGlashan, D., Jr., et al., *In vitro regulation of FcepsilonRIalpha expression on human basophils by IgE antibody*. Blood, 1998. **91**(5): p. 1633-43.

121. Gould, H.J., et al., *The biology of IGE and the basis of allergic disease*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 579-628.
122. Weskamp, G., et al., *ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1293-8.
123. Lemieux, G.A., et al., *The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14836-44.
124. McCloskey, N., et al., *Soluble CD23 monomers inhibit and oligomers stimulate IGE synthesis in human B cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24083-91.
125. Yuan, D., et al., *Ca²⁺-dependent structural changes in the B-cell receptor CD23 increase its affinity for human immunoglobulin E*. J Biol Chem, 2013. **288**(30): p. 21667-77.
126. Bettler, B., et al., *Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fc epsilon receptor (Fc epsilon RII/CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(18): p. 7118-22.
127. Dhaliwal, B., et al., *Crystal structure of IgE bound to its B-cell receptor CD23 reveals a mechanism of reciprocal allosteric inhibition with high affinity receptor FcepsilonRI*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12686-91.
128. Dhaliwal, B., et al., *A range of C3-C4 interdomain angles in IgE Fc accommodate binding to its receptor CD23*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014. **70**(Pt 3): p. 305-9.
129. Hibbert, R.G., et al., *The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 751-60.
130. Pirron, U., et al., *IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE*. Eur J Immunol, 1990. **20**(7): p. 1547-51.
131. Lecoanet-Henchoz, S., et al., *Mouse CD23 regulates monocyte activation through an interaction with the adhesion molecule CD11b/CD18*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2290-4.
132. Arnold, J.N., et al., *The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 21-50.
133. Plomp, R., et al., *Site-specific N-glycosylation analysis of human immunoglobulin e*. J Proteome Res, 2014. **13**(2): p. 536-46.
134. Mimura, Y., et al., *The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms*. Mol Immunol, 2000. **37**(12-13): p. 697-706.

135. Gala, F.A. and S.L. Morrison, *The role of constant region carbohydrate in the assembly and secretion of human IgD and IgA1*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29005-11.
136. Mimura, Y., et al., *Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45539-47.
137. Shade, K.T., et al., *A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis*. J Exp Med, 2015. **212**(4): p. 457-67.
138. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001, NY: Cold Spring Harbor.
139. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
140. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
141. Dam, S., et al., *Combined N-glycome and N-glycoproteome analysis of the Lotus japonicus seed globulin fraction shows conservation of protein structure and glycosylation in legumes*. J Proteome Res, 2013. **12**(7): p. 3383-92.
142. Shamji, M.H., et al., *Cell-free detection of allergen-IgE cross-linking with immobilized phase CD23: inhibition by blocking antibody responses after immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(4): p. 1003-5.e1-4.
143. Pedersen, J.S., *A flux- an background-optimized version of the NanoSTAR small-angle X-ray scattering camera for solution scattering*. J. Appl. Cryst., 2004. **37**: p. 369-380.
144. Behrens, M.A., et al., *Structural analysis of RNA helicases with small-angle X-ray scattering*. Methods Enzymol, 2012. **511**: p. 191-212.
145. Glatter, O., *A new method for the evaluation of small-angle scattering data*. Journal of Applied Crystallography, 1977. **10**(5): p. 415-421.
146. Glatter, O. and O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*. 1982, London: Academic Press.
147. Mage, R.G., et al., *Gene-conversion in rabbit B-cell ontogeny and during immune responses in splenic germinal centers*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **72**(1-2): p. 7-15.
148. Seismann, H., et al., *Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation*. Mol Immunol, 2010. **47**(4): p. 799-808.
149. Reginald, K., et al., *Different modes of IgE binding to CD23 revealed with major birch allergen, Bet v 1-specific monoclonal IgE*. Immunol Cell Biol, 2013. **91**(2): p. 167-72.

150. Brehler, R., S. Grundmann, and B. Stocker, *Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013. **13**(4): p. 360-4.
151. Köhler, S.B., Sabine Müller, Marcel Frick, Frank Bantleon, Johannes Huss-Marp, Jonas Lidholm, Edzard Spillner, Thilo Jakob, *IgE reactivity to a broad panel of CCD free bee venom allergens reveals 1 diverse sensitisation profiles in bee venom allergic patients*. *The journal of allergy and clinical immunology*, 2013.
152. Blank, S., et al., *Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3*. *J Immunol*. **184**(9): p. 5403-13.
153. Blank, S., et al., *Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Api m 12 and Ves v 6) of Apis mellifera and Vespula vulgaris venom*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e62009.
154. Galindo-Bonilla, P.A., et al., *Component-resolved diagnosis in vespid venom-allergic individuals*. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2015. **43**(4): p. 398-402.
155. Winningham, K.M., et al., *Hymenoptera venom protease allergens*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(4): p. 928-33.
156. 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**(9-10): p. 1236-44.
157. Braren, I., et al., *Generation of human monoclonal allergen-specific IgE and IgG antibodies from synthetic antibody libraries*. *Clin Chem*, 2007. **53**(5): p. 837-44.
158. Steinberger, P., D. Kraft, and R. Valenta, *Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. Isolation and characterization of human IgE Fabs with specificity for the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(18): p. 10967-72.
159. Neuberger, M.S., et al., *A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function*. *Nature*, 1985. **314**(6008): p. 268-70.
160. 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**(1-2): p. 153-66.
161. Smith, G.E., M.D. Summers, and M.J. Fraser, *Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector*. *Mol Cell Biol*, 1983. **3**(12): p. 2156-65.

162. Hasemann, C.A. and J.D. Capra, *High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(10): p. 3942-6.
163. zu Putlitz, J., et al., *Antibody production in baculovirus-infected insect cells*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(7): p. 651-4.
164. Cerutti, M. and J. Golay, *Lepidopteran cells, an alternative for the production of recombinant antibodies?* MAbs, 2012. **4**(3): p. 294-309.
165. Carayannopoulos, L., E.E. Max, and J.D. Capra, *Recombinant human IgA expressed in insect cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8348-52.
166. Potter, K.N., et al., *Anti-idiotypic antibody D12 and superantigen SPA both interact with human VH3-encoded antibodies on the external face of the heavy chain involving FR1, CDR2 and FR3*. Mol Immunol, 1998. **35**(18): p. 1179-87.
167. Bjorklund, J.E., M. Schmidt, and C.G. Magnusson, *Characterisation of recombinant human IgE-Fc fragments expressed in baculovirus-infected insect cells*. Mol Immunol, 2000. **37**(3-4): p. 169-77.
168. Wilson, I.B. and F. Altmann, *Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core alpha1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined*. Glycoconj J, 1998. **15**(11): p. 1055-70.
169. Malandain, H., *IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact (2nd part)*. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2005. **37**(7): p. 247-56.
170. Commins, S.P. and T.A. Platts-Mills, *Delayed anaphylaxis to red meat in patients with IgE specific for galactose alpha-1,3-galactose (alpha-gal)*. Curr Allergy Asthma Rep. **13**(1): p. 72-7.
171. Brzezicka, K., et al., *Synthesis and microarray-assisted binding studies of core xylose and fucose containing N-glycans*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(5): p. 1290-302.
172. Thomas, R., et al., *Structure of an anti-blood group A Fv and improvement of its binding affinity without loss of specificity*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 2059-64.
173. Jin, C., et al., *Immunoglobulin G specifically binding plant N-glycans with high affinity could be generated in rabbits but not in mice*. Glycobiology, 2006. **16**(4): p. 349-57.
174. Weis, W.I., *Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(5): p. 624-30.
175. Marchal, I., et al., *Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line*. Glycobiology, 1999. **9**(7): p. 645-54.

176. Altmann, F., et al., *Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17344-9.
177. Shields, R.L., et al., *Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃RIII and antibody-dependent cellular toxicity*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 26733-40.
178. Edelman, L., et al., *Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system*. Immunology, 1997. **91**(1): p. 13-9.
179. Hu, P., et al., *A human-mouse chimeric Lym-1 monoclonal antibody with specificity for human lymphomas expressed in a baculovirus system*. Hum Antibodies Hybridomas, 1995. **6**(2): p. 57-67.
180. Akdis, M. and C.A. Akdis, *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(4): p. 780-91.
181. Bilo, M.B., L. Antonicelli, and F. Bonifazi, *Honeybee venom immunotherapy: certainties and pitfalls*. Immunotherapy. **4**(11): p. 1153-66.
182. Muller, U., A. Helbling, and E. Berchtold, *Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(2): p. 529-35.
183. Mobs, C., et al., *Decline of Ves v 5-specific blocking capacity in wasp venom-allergic patients after stopping allergen immunotherapy*. Allergy, 2015. **70**(6): p. 715-9.
184. Mobs, C., et al., *Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(5): p. 1108-1116.e6.
185. Dodev, T.S., et al., *Inhibition of allergen-dependent IgE activity by antibodies of the same specificity but different class*. Allergy, 2015. **70**(6): p. 720-4.
186. Mertens, H.D. and D.I. Svergun, *Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering*. J Struct Biol, 2010. **172**(1): p. 128-41.
187. Davis, K.G., et al., *A model for the solution conformation of rat IgE*. Biochem Soc Trans, 1990. **18**(5): p. 935-6.
188. Jacques, D.A. and J. Trehwella, *Small-angle scattering for structural biology--expanding the frontier while avoiding the pitfalls*. Protein Sci, 2010. **19**(4): p. 642-57.
189. Neylon, C., *Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: recent examples from the literature*. Eur Biophys J, 2008. **37**(5): p. 531-41.

190. Kikhney, A.G. and D.I. Svergun, *A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins*. FEBS Lett, 2015. **589**(19 Pt A): p. 2570-7.
191. Rice, S.A., *Small angle scattering of X-rays*. A. Guinier and G. Fournet. Translated by C. B. Wilson and with a bibliographical appendix by K. L. Yudowitch. Wiley, New York, 1955. 268 pp. \$7.50. Journal of Polymer Science, 1956. **19**(93): p. 594-594.
192. Tian, X., et al., *In-depth analysis of subclass-specific conformational preferences of IgG antibodies*. IUCrJ, 2015. **2**(Pt 1): p. 9-18.
193. Lilyestrom, W.G., S.J. Shire, and T.M. Scherer, *Influence of the cosolute environment on IgG solution structure analyzed by small-angle X-ray scattering*. J Phys Chem B, 2012. **116**(32): p. 9611-8.
194. Pantera, B., et al., *Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus**. Biochim Biophys Acta, 2003. **1623**(2-3): p. 72-81.

Anhang

Originaldaten des EUROLIne Assays

Tab. 7 IgE-Reaktivitäten der humanen Spenderseren aus der *Polistes* Gruppe auf verschiedene rekombinante Allergene, Giftextrakte und CCDs.

Dargestellt sind spezifische IgE-Reaktivitäten als RAST-Klassen. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLIne Assay bestimmt.

	CCD	Wespengift	Ves v 1	Ves v 5	Feldwespengift	Pol d 1	Pol d 5	Pol d 4
PG1	0	2	1	4	1	1	5	2
PG2	0	1	1	2	0	2	3	0
PG3	0	2	1	0	1	1	5	2
PG4	0	1	0	1	1	1	5	1
PG5	0	3	2	3	0	5	4	0
PG6	0	3	1	0	0	5	0	0
PG7	5	4	2	3	0	2	4	1
PG8	0	0	0	0	0	0	0	0
PG9	2	2	1	1	2	1	3	1
PG10	0	1	0	2	0	0	1	1
PG11	1	2	0	2	1	0	4	1
PG12	0	1	0	1	1	0	2	0
PG13	0	1	1	0	1	1	0	0
PG14	0	2	0	3	0	0	1	0
PG15	5	5	6	5	1	6	2	1
PG16	0	1	1	0	1	1	0	0
PG17	2	3	1	4	2	0	5	2
PG18	4	3	0	3	2	0	4	1
PG19	0	2	2	2	3	1	5	2
PG20	4	2	1	1	1	1	2	0
PG21	2	3	3	5	3	1	5	2
PG22	0	1	2	2	1	1	2	0
PG23	0	0	0	0	1	0	2	0
PG24	2	2	0	1	2	0	1	0
PG25	0	1	0	1	1	2	3	0
PG26	0	2	0	2	1	0	5	1
PG27	1	2	0	2	1	0	2	0
PG28	0	5	1	5	1	1	5	1
PG29	0	3	2	0	0	0	0	0
PG30	0	2	0	3	2	2	5	2
PG31	0	0	0	0	1	0	2	0
PG32	0	1	0	3	2	0	5	1
PG33	0	0	0	0	0	0	1	0
PG34	0	1	1	1	1	1	3	0

Anhang

	CCD	Wespengift	Ves v 1	Ves v 5	Feldwespengift	Pol d 1	Pol d 5	Pol d 4
PG35	0	2	1	2	1	1	2	0
PG36	0	1	0	0	0	0	0	0
PG37	0	1	0	2	0	0	0	0
PG38	1	2	0	4	1	0	3	0
PG39	0	0	2	1	1	1	2	0
PG40	1	1	0	1	0	0	0	0
PG41	0	1	0	1	1	0	3	0
PG42	0	2	3	1	2	2	1	0
PG43	0	0	0	0	0	0	1	0
PG44	1	1	0	0	1	0	2	0
PG45	0	1	1	2	3	1	2	0
PG46	0	1	0	0	0	0	0	0
PG47	0	3	1	3	2	0	5	1
PG48	0	1	0	1	0	0	0	0
PG49	0	3	1	1	1	0	2	0
PG50	0	2	2	2	0	0	1	0
PG51	0	1	0	0	0	0	0	0
PG52	2	1	0	1	3	2	4	1
PG53	1	2	2	3	2	2	4	0
PG54	0	1	0	0	0	0	0	0
PG55	1	1	0	0	3	1	0	0
PG56	0	0	0	0	1	0	2	0

Tab. 8 IgE-Reaktivitäten der humanen Spenderseren aus der *Vespula* Gruppe auf verschiedene rekombinante Allergene, Giftextrakte und CCDs.

Dargestellt sind spezifische IgE-Reaktivitäten als RAST-Klassen. Die IgE-Reaktivität wurde mittels EUROLIne Assay bestimmt.

	CCD	Wespengift	Ves v 1	Ves v 5	Feldwespengift	Pol d 1	Pol d 5	Pol d 4
VG1	0	2	0	4	0	0	3	0
VG2	0	2	0	2	0	0	1	0
VG3	1	4	4	5	1	1	2	0
VG4	1	1	1	0	0	1	0	0
VG5	1	3	3	3	0	2	1	0
VG6	0	2	0	2	0	0	3	0
VG7	3	3	1	3	0	0	4	1
VG8	0	1	0	2	0	0	0	0
VG9	0	1	1	2	0	0	4	1
VG10	3	5	2	5	2	1	6	3
VG11	4	4	2	3	0	1	2	0
VG12	5	4	0	4	1	0	0	0
VG13	3	4	3	3	0	0	1	0
VG14	0	2	0	3	0	0	1	0

	CCD	Wespengift	Ves v 1	Ves v 5	Feldwespengift	Pol d 1	Pol d 5	Pol d 4
VG15	0	4	0	5	1	0	4	0
VG16	0	2	1	3	0	0	1	0
VG17	1	5	3	5	1	1	4	1
VG18	4	3	4	3	0	0	4	0
VG19	4	3	3	3	0	0	4	0
VG20	0	3	2	3	0	0	2	0
VG21	0	4	3	4	0	1	2	0
VG22	0	0	1	0	0	0	0	0
VG23	3	5	4	6	2	2	4	1
VG24	2	4	2	5	1	1	3	0
VG25	1	0	1	0	0	1	0	0
VG26	4	5	2	5	1	1	5	1
VG27	0	3	2	2	0	1	1	0
VG28	0	4	2	4	1	1	4	0
VG29	5	4	1	4	0	0	2	0
VG30	3	1	1	0	0	1	0	0
VG31	5	3	1	4	0	0	4	1
VG32	4	3	2	3	0	1	4	1
VG33	1	5	3	5	1	1	3	1
VG34	5	3	0	2	0	0	3	0
VG35	5	6	4	6	2	1	5	2
VG36	0	2	1	1	0	0	2	0
VG37	5	2	1	0	0	1	1	0
VG38	5	4	3	1	0	2	1	1
VG39	0	3	3	3	0	0	1	0
VG40	0	1	1	1	0	0	0	0
VG41	2	2	1	2	0	0	1	0
VG42	1	5	4	5	1	3	4	1
VG43	2	5	4	5	1	1	4	0
VG44	2	3	3	1	0	1	1	0
VG45	2	2	1	0	0	0	0	0
VG46	4	5	4	5	1	2	2	1
VG47	0	4	1	5	1	1	4	1
VG48	1	5	3	5	2	1	4	1
VG49	0	4	3	5	0	1	2	0
VG50	1	2	1	0	0	0	0	0

Sequenzdaten

Pol d 4

gtaaattggtggttgaaacagaaatcaatgagtttcccatggtggcacgtttaatatatcca
V N G V E T E I N E F P M V A R L I Y P
tcaccaggaatgtattgtggtggtaccataataacaccgcaacatatagtaactgctgct
S P G M Y C G G T I I T P Q H I V T A A
cattgtcttcaaaaatataaaagaaccaattataaccggtatacatgtagttgtcggtgaa
H C L Q K Y K R T N Y T G I H V V V G E
cacgattatacgcagatagcgaacaaatgtgaccaaacgttataactattgcggaagta
H D Y T T D T E T N V T K R Y T I A E V
actatacatccgaattataattctcataataatgatattgcaattgtaaaacaaatgaa
T I H P N Y N S H N N D I A I V K T N E
agatttgaatattcgatgaaagttggaccagtttgccttccatttaattatgactcga
R F E Y S M K V G P V C L P F N Y M T R
aatttaactaacgagactgtaacagcattaggttggggtaaattaagggtataatggtcaa
N L T N E T V T A L G W G K L R Y N G Q
aattcaaaggttttaagaaaagttgattgcacgttattacaagggacaatgtgaaaca
N S K V L R K V D L H V I T R E Q C E T
cattatggagcagctattgcaaagcgaacttactttgtacgtttgatggtggaagggat
H Y G A A I A N A N L L C T F D V G R D
gcttgtcagaacgacagtggtggtccaatattatggagaagtccaactacagataattta
A C Q N D S G G P I L W R S P T T D N L
attctcgttgggtgtagttaattttggtagaacctgtgcagatgatgcacctggtggtaat
I L V G V V N F G R T C A D D A P G G N
gcaagggtcaccagttttatggaattttattcataacgctacaatcggagaaacatactgc
A R V T S F M E F I H N A T I G E T Y C
aaggcggat
K A D

Pol d 5

aatgattattgtaaaaataaagtgttcacggtggttcatacggctctgccaatatggagaa
N D Y C K I K C S S G V H T V C Q Y G E
tcaacaaaaccaagtaaaaattgtgccggtaaatcaaatcggttggtccaacggaa
S T K P S K N C A G K L I K S V G P T E
gaagagaagaaattaattgtagaggagcataatcgatttaggcaaaaagttgcaaaggt
E E K K L I V E E H N R F R Q K V A K G
ttggaaacgagaggtaatcctggaccacaaccagctgcttcgaacatgaataatttggt
L E T R G N P G P Q P A A S N M N N L V
tggaacgatgaattagcaaaagatcgcacaagtatgggccagtcaatgtcaaattcttgt
W N D E L A K I A Q V W A S Q C Q I L V
cacgacaaatgtagaaatacagaaaaatatcaagttggacaaaacatagcgtatgcaggt
H D K C R N T E K Y Q V G Q N I A Y A G
tcttctaatacatttcccaagtgtaaccaaatcaactttgggaaaacgaagtgaaa
S S N H F P S V T K L I Q L W E N E V K
gattttaattacaatacaggaataacaaataaaaactttggtaaagttggtcattatact
D F N Y N T G I T N K N F G K V G H Y T
caaagtttggggtaataactaaggaagttggttgggttctttaaataatggtgaaaag
Q M V W G N T K E V G C G S L K Y V E K
aatatgcaaattcattatctcatttgtaattatggaccagctggaattacttgggtcaa

N M Q I H Y L I C N Y G P A G N Y L G Q
 ccaatttatacaaagaaa
 P I Y T K K

Ves v 5

aacaattattgtaaaataaaatgtttgaaaggaggtgtccatactgcctgcaaatatgga
 N N Y C K I K C L K G G V H T A C K Y G
 agtcttaaaccgaattgcggttaataaggtagtggtatcctatggtctaacgaaacaagag
 S L K P N C G N K V V V S Y G L T K Q E
 aaacaagacatcttaaaggagcacaatgacttttagacaaaaaattgcacgaggattggag
 K Q D I L K E H N D F R Q K I A R G L E
 actagaggtaatcctggaccacagcctccagcgaagaatatgaaaaatttggtatggaac
 T R G N P G P Q P P A K N M K N L V W N
 gacgagttagcttatgtcgcccaagtgtgggctaataatgtcaatatggtcaccgatact
 D E L A Y V A Q V W A N Q C Q Y G H D T
 tgcagggatgtagcaaaatatcaggttgacaaaacgtagccttaacaggtagcaccggt
 C R D V A K Y Q V G Q N V A L T G S T A
 gctaaatac gatgatccagttaaactagttaaaatgtgggaagatgaagtgaagattat
 A K Y D D P V K L V K M W E D E V K D Y
 aatcctaagaaaaagttttcgggaaacgacttttctgaaaaccggccattactcaaatg
 N P K K K F S G N D F L K T G H Y T Q M
 gtttgggctaacaccaaggaagttgggttggaagtataaaatacattcaagagaaatgg
 V W A N T K E V G C G S I K Y I Q E K W
 cacaaacattaccttgtatgtaattatggaccagcgggaactttatgaatgaggaactt
 H K H Y L V C N Y G P S G N F M N E E L
 tatcaaacaag
 Y Q T K

HMM5 V_H

cagtcggttgaggagtcgccccgggctgcctggtcagccccgggacaccctgacactcacc
 Q S L E E S G G R L V T P G T P L T L T
 tgcacagtctctggattctccctcagtacttacaacatacattgggtccgcccagggtcca
 C T V S G F S L S T Y N I H W V R Q A P
 gggaaaggggctggaatggatcggagtcattgatactggtggtggcacatacttcgcgagc
 G K G L E W I G V I D T G G G T Y F A S
 tgggcgaaaggccgattcgccatctccaaaacctcgtcgaccacgggtgatctgaaaatg
 W A K G R F A I S K T S S T T V D L K M
 accagcctgacagccgagcagcggccacctatttctgtgcaaagggttttgattatagt
 T S L T A A D T A T Y F C A K G F D Y S
 gcgtctaccaacttgtggggcccaggcacccctggtcacaatc
 A S T N L W G P G T L V T I

HMM5 V_L

atggagctcgatatgaccagactccatcctccgtgtctgcacctgtgggaggctcagtc
 M E L D M T Q T P S S V S A P V G G S V
 accatcaattgtcagtcagtcagagtggttatggtaacaactacttagcctggtatcag
 T I N C Q S S Q S V Y G N N Y L A W Y Q
 cagaaagcagggcagcctcccaagctccttatctaccgggcatccactctggcatctggt
 Q K A G Q P P K L L I Y R A S T L A S G

Anhang

gccccatcgcggttcaaaggcagtgatctgggacacagttcactctcaccatcagcgac
A P S R F K G S G S G T Q F T L T I S D
ctggagtgtgacgatgctgccacttactactgtctaggctattataatggtggtataaat
L E C D D A A T Y Y C L G Y Y N G V I N
gttttcggcggaggcaccaatgtggaaatcaaa
V F G G G T N V E I K

425 V_H

gagggtgcagctgctcagagtctggggctgaactggtgaagcctggggcttcagtgaagttg
E V Q L L E S G A E L V K P G A S V K L
tcctgcaaggcttccggctacaccttcaccagccactggatgcactgggtgaagcagagg
S C K A S G Y T F T S H W M H W V K Q R
gctggacaaggccttgagtggatcggagagtttaatcccagcaacggccgtactaactac
A G Q G L E W I G E F N P S N G R T N Y
aatgagaaattcaagagcaaggccaccctgactgtagacaaatcctccagcacagcctac
N E K F K S K A T L T V D K S S S T A Y
atgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgccagtcgggac
M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A S R D
tatgattacgacggacgggtactttgactactggggccaagggaccacgggtcaccgtctcc
Y D Y D G R Y F D Y W G Q G T T V T V S

425 V_L

accagttctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggctcactatgacctgcagt
T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S
gccagctcaagtgtacttacatgtattggtaccagcagaagccaggatcctccccaga
A S S S V T Y M Y W Y Q Q K P G S S P R
ctcctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtccctgttcgtttcagtggcagt
L L I Y D T S N L A S G V P V R F S G S
gggtctgggaccttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccact
G S G T S Y S L T I S R M E A E D A A T
tattactgccagcagtgaggtagtcacatattcacgttcggctcggggaca
Y Y C Q Q W S S H I F T F G S G T

Human IgE C_H1-4

gcctccacacagagcccattccgtcttccccttgaccgctgctgcaaaaacattccctccaat
A S T Q S P S V F P L T R C C K N I P S N
gccacctccgtgactctgggtgcctggccacgggctacttcccggagccggtgatgggtg
A T S V T L G C L A T G Y F P E P V M V
acctgggacacaggctccctcaacgggacaactatgaccttaccagccaccacctcacg
T W D T G S L N G T T M T L P A T T L T
ctctctgggtcactatgccaccatcagcttgcctgaccgtctcgggtgcgtgggccaagcag
L S G H Y A T I S L L T V S G A W A K Q
atgttcacctgccgtgtggcacacactccatcgctccacagactgggtcgacaacaaaacc
M F T C R V A H T P S S T D W V D N K T
ttcagcgtctgctccagggacttcccccgcccacgtgaagatcttacagtcgtcctcgc
F S V C S R D F T P P T V K I L Q S S C
gacggcggcgggcaacttcccccgaccatccagctcctgtgcctcgtctctgggtacacc

D G G G H F P P T I Q L L C L V S G Y T
 ccagggactatcaacatcacctggctggaggacgggcaggtcatggacgtggacttgtcc
 P G T I N I T W L E D G Q V M D V D L S
 accgcctctaccacgcaggaggggtgagctggcctccacacaaagcgagctcacctcagc
 T A S T T Q E G E L A S T Q S E L T L S
 cagaagcactggctgtcagaccgcacctacacctgccaggtcacctatcaaggtcacacc
 Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y Q G H T
 tttgaggacagcaccaagaagtgtgcagattccaacccgagaggggtgagcgcctaccta
 F E D S T K K C A D S N P R G V S A Y L
 agccggcccagcccgttcgacctgttcacccgaagtgcggccacgatcacctgtctgggtg
 S R P S P F D L F I R K S P T I T C L V
 gtggacctggcaccagcaaggggaccgtgaacctgacctgggtcccggggcagtggggaag
 V D L A P S K G T V N L T W S R A S G K
 cctgtgaaccactccaccagaaaggaggagaagcagcgaatggcacgttaaccgtcagc
 P V N H S T R K E E K Q R N G T L T V T
 tccaccctgccggtgggcaccggagactggatcgagggggagacctaccagtgcaggggtg
 S T L P V G T R D W I E G E T Y Q C R V
 acccacccccacctgcccagggccctcatgcggtccacgaccaagaccagcggcccgcgt
 T H P H L P R A L M R S T T K T S G P R
 gctgccccggaagtctatgcgtttgacgacccggagtgccgggggagccgggacaagcgc
 A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K R
 accctcgcctgcctgatccagaacttcatgcctgaggacatctcgggtgcagtggtgcac
 T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H
 aacgaggtgcagctcccggacgcccggcacagcacgacgacgacccccgaagaccaagggc
 N E V Q L P D A R H S T T Q P R K T K G
 tccggcttcttcgtcttcagccgcctggaggtgaccagggccgaatgggagcagaaagat
 S G F F V F S R L E V T R A E W E Q K D
 gagttcatctgccgtgcagtccatgaggcagcagcccctcacagaccgtccagcgcagc
 E F I C R A V H E A A S P S Q T V Q R A
 gtgtctgtaaatacccggtaaa
 V S V N P G K

Human *kappa-C_L*

gaaattgtgttgacgcagctctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
 ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaa
 L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K
 cctggccaggtcccaggctcctcatctatggtgcatccagcagggccactggcatccca
 P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
 gacaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagactggag
 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
 cctgaagatgttgagtgattactgtcagcagtatggttagctcaccgggttcaacttcc
 P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P G F T F
 ggccctgggaccaaagtggatatcaaacgaactgtgggcgcg
 G P G T K V D I K R T V G A

Vektorkarten

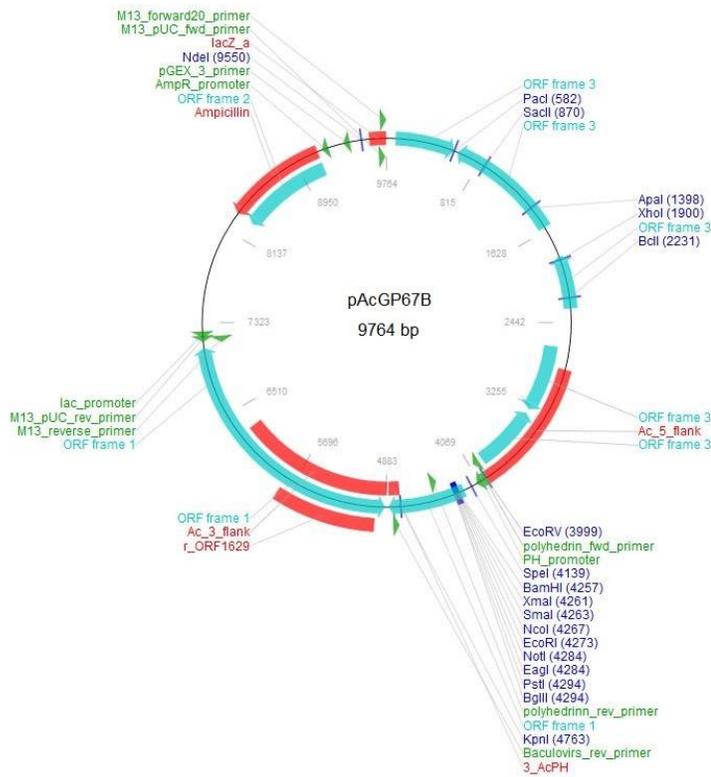


Abb. 43 pAcGP67B.

Der Vektor pAcGP67B (BD Bioscience) wurde für die Baculovirus-medierte Expression der Hymenoptereingiftallergene in Insektenzellen verwendet.

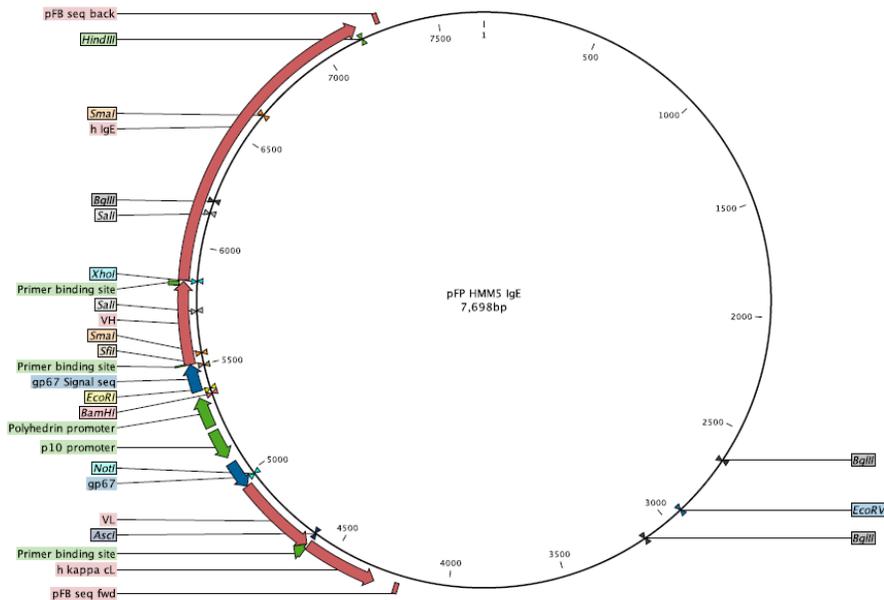


Abb. 44 pFastBac Dual

Der Vektor pFastBac Dual (Thermo Fischer Scientific) wurde für die Baculovirus-medierte Expression des humanen HMM5 IgE in Insektenzellen verwendet.

Oligonukleotide

Pol d 4 Xba Xa for	GAT CTC TAG AGG GAT CGA GGG AAG GAG GGA AGA AAA TTG TAA ATG TGG G
Pol d 4 Not Stop rev	GAT CGC GGC CGC TTA ATC CGC CTT GCA GTA TGT TTC
Pol d 5 Xba Xa for	GAT CTC TAG AGG GAT CGA GGG AAG GAA TGA TTA TTG TAA AAT AAA GTG
Pol d 5 Not Stop rev	GAT CGC GGC CGC TTA TTT CTT TGT ATA AAT TGG
IgE HC Xho for	GAT CCT CGA GCG CCT CCA CAC AGA GCC CAT C
IgEHC5xHisHindIII rev	GAT CAA GCT TTC AAT GGT GGT GAT GGT GTT TAC CGG GAT TTA CAG ACA CC
IgEHCreMutP/S+V/D for	CAC TGG CTG TCA GAC CGC ACC TAC ACC TGC CAG GTC ACC TAT CAA GGT CAC ACC TTT GAG GAC AGC ACC AAG
IgEHCreMutP/S+V/D rev	CTT GGT GCT GTC CTC AAA GGT GTG ACC TTG ATA GGT GAC CTG GCA GGT GTA GGT GCG GTC TGA CAG CCA GTG
HyHEL VL Not I for	GAT CGC GGC CGC GGC TCA CTC TGC TTT CGC GGA CAT TGT GCT GAC CCA GTC TC
HyHEL VL Ascl rev	GAT CGG CGC GCC TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC CCC TCC GAA C
HyHEL VH Sfil for	GAT CGG CCC ATT CGG CCT TTG CGG ACG TGC AGC TTC AGG AGT CAG
HyHEL VH Sall rev	GAT CGT CGA CAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC

Sicherheit und Entsorgung

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen gemäß §6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol		H225-H319-H336	P210-P261-P305 + P351 + P338
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
ABTS		H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338
Acrylamid		301-312-315-317-319-332-340-350-361f.-372	201-280-301+352-305+351+338
Agar	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Ammoniumpersulfat		H272-H302-H315-H317-H319-H334-H335	P220-P261-P280-P305 + P351 + P338-P342 + P311
Ampicillin		315-317-319-334-335	261-280-305+351+338-342+311
Anhydrotetrazyklin Hydrochlorid Bovines Serumalbumin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Bromphenolblau	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Calciumchlorid Dihydrat		H319	P305 + P351 + P338
Chloroform		302-315-351-373	302+352-314

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Diethylpyrocarbonat		H302-H315-H319- H335	P261-P305 + P351 + P338
Dimethylsulfoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dithiothreitol		302-315-319	302+350- 305+351+338
EDTA-Dinatriumsalz- Dihydrat		319	305+351+338
Essigsäure (100%)		226-314	280-301+330+331- 305+351+338
Ethanol		225	210
Ethidiumbromid		332-341	281-308+313
Glukose	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Glutardialdehyd, 25%		H302-H314-H317- H332-H334-H370- H400	P260-P273-P280- P305 + P351 + P338-P310
Glycerin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Imidazol	 	302-314-361d	280-301+330+331- 305+351+338
Kanamycin Sulfat		H360	P201-P308 + P313
Methanol		225-301+311+331- 370	210-280-302+352- 403+235

Anhang

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
NaOH		H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Natriumchlorid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
NBT	 	H302-H370	P260-P307 + P311
Ni-NTA-Agarose	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Nickel(II)-sulfat	  	H302-H315-H317- H332-H334-H341- H350i-H360D-H372- H410	P201-P261-P273- P280-P308 + P313- P501
Phenol (Tris-gesättigt)	  	H301-H312-H314- H330-H341-H351- H373	P260-P280-P284- P301 + P310-P305 + P351 + P338-P310
Salzsäure, konz.	 	H314-H335	P261-P280-P305 + P351 + P338-P310
SDS	 	H228-H302-H311- H315-H319-H335	P210-P261-P280- P305 + P351 + P338-P312
TEMED	  	H225-H302-H314- H332	P210-P280-P305 + P351 + P338-P310
Triethylamin	  	H225-H302-H312- H314-H332	P210-P280-P305 + P351 + P338-P310
Tris		H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338
Wasserstoffperoxid 30%	 	H302-H318	P280-P305 + P351 + P338

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Xylen Cyanol FF		H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338
Zitronensäure		H319	P305 + P351 + P338

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entsprechend ihrer H- und P-Sätzen gehandhabt und nach der Gefahrstoffverordnung entsorgt. Organische halogenfreie und halogenhaltige Lösungsmittel wurden getrennt in gekennzeichnete Behälter überführt. Kontaminierte Betriebsmittel wurden in dafür vorgesehenen Behältern gesammelt. Ethidiumbromid-Abfälle wurden in gesondert gekennzeichnete Behälter entsorgt. Der Umgang mit humanen Zellen wurde ausschließlich auf Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 nach §7 GenTG beschränkt. S1-kontaminierter Abfall wurde vor der Entsorgung in einem Autoklav durch unter Druck (5 bar) stehenden Wasserdampf 20 Minuten bei 120 °C hitzesterilisiert.

Liste der verwendeten KMR-Stoffe

Nachname: Wolf

Matrikelnummer: 5802028

Vorname: Sara Virginia

Studiengang: Promotion Chemie

Arbeitsbereich: Arbeitskreis Spillner, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg und Department of Engineering, University of Aarhus, Dänemark

Zeitraum: 1.10.2012 – 30.09.2015

Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen, Kategorie 1A und 1B

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie (I oder II)
67-66-3	Trichlormethan (Chloroform)	DNA-Extraktion aus Lösungen ca. 100 µL pro Ansatz	1B
79-06-1	Acrylamid	PAGE ca. 10 mL pro Ansatz	1B
68-12-2	N,N-Dimethylformamid	Detektion Immunprint 125 µL pro Ansatz	1B
1239-45-8	Ethidiumbromid	Agarosegel, DNA Interkalation	2
7786-81-4	Nickelsulfat	IMAC	1A
108-95-2	Phenol	DNA-Extraktion aus Lösungen ca. 100 µL pro Ansatz	2
288-32-4	Imidazol	IMAC Elution 300 mM Lösung, ca. 50 mL pro Reinigung	1B

Datum:

Unterschrift Doktorand

Curriculum vitae

Name: Sara Virginia Wolf

Geburtsdatum: 21.05.1986

Schulbildung

1992-1993 und 1996 Grundschule Grützmühlenweg

1993-1996 Grundschule Langenfort

1996-2005 Gymnasium Hummelsbüttel

Schulabschluss: Abitur 2005 am Gymnasium Hummelsbüttel

Studium

10/2005 – 07/2012 Diplomstudium Chemie an der Universität Hamburg

10/2011 – 07/2012 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Bredehorst mit dem Thema: „Generierung und Evaluierung leporider Antikörperbibliotheken und resultierender Immunglobuline“

10/2012 – 12/2015 Dissertation in der Arbeitsgruppe von Assoc. Prof. Dr. E. Spillner an der Universität Hamburg im Institut für Biochemie und Molekularbiologie mit dem Thema: Interaktion und strukturelle Aspekte humaner IgE Antikörper im Kontext der Allergie

03/2014 – 09/2015 Auslandsaufenthalt an der Universität Aarhus, Dänemark in der Gruppe von Assoc. Prof. E. Spillner am Department of Engineering

Stipendien

10/2012 – 12/2012 Promotionsstipendium durch Pro Exzellenzia

04/2013 – 08/2013 Promotionsstipendium nach dem Hamburger Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses (HmbNFG)

09/2013 – 10/2015 Graduiertenförderung der Friedrich Ebert Stiftung

Publikationen

“Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Apm 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* venom.”

Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, **Wolf S**, Bantleon FI, Spillner E.

PLoS One. 2013 Apr 23;8(4):e62009. doi: 10.1371/journal.pone.0062009. Print 2013.

“Human IgE is efficiently produced in biologically active form in lepidopteran cells.”

Bantleon FI, **Wolf S**, Seismann H, Dam S, Lorentzen A, Mieke M, Jabs F, Jakob T, Plum M, Spillner E.

submitted

Kongressbeiträge

EAACI 2014 in Kopenhagen

Oral Presentaion: “Recombinant *Polistes dominula* protease allergen Pol d 4 as candidate for dissection of sensitisation to vespid venoms.”

Mainzer Allergieworkshop 2014

Oral Presentation: Recombinant *Polistes dominula* protease allergen Pol d 4 as candidate for dissection of sensitisation to vespid venoms

Annual Meeting of the Danish Society for Allergology 2015:

Poster: “Component resolution for improved diagnostics of Hymenoptera venom allergy using a set of recombinant *Vespula* and *Polistes* venom allergens.”

Poster: “Human IgE is efficiently produced in biologically active form in lepidopteran cells.”

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt Assoc. Prof. Dr. Edzard Spillner für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen. Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie Prof. Dr. Wolfgang Maison und Dr. Thomas Hackl für die Begutachtung der Disputation.

Außerdem danke ich allen, die zur Finanzierung dieser Arbeit beigetragen haben, speziell der Friedrich Ebert Stiftung.

Im Besonderen danke ich Assoc. Prof. Dr. Edzard Spillner für die ausnahmslos gute Betreuung und die vielen Ratschläge. Ihm, Dr. Frank Bantleon und Dr. Simon Blank danke ich außerdem für die kritische Auseinandersetzung mit dieser Arbeit.

Für die Hilfestellungen aller Art und die vielen schönen Arbeitstage und Feierabende möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Spillner bedanken. Thorsten Mix und die Kaffeemaschine haben im zweiten Teil dieser Arbeit leider sehr gefehlt. Team M., ihr hab dafür vieles wieder gut gemacht.

Ich danke außerdem den Arbeitsgruppen von Peter Kristensen und Gregers Rom Andersen für die freundliche Aufnahme an der Universität Aarhus. Gregers danke ich für die Hilfe mit der Auswertung der SAXS-Daten, die Diskussionen und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Bei allen Kooperationspartnern in Deutschland und der Welt bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kommilitonen und Freunden, die mich durch mein Studium und meine Promotion begleitet haben, danke ich für den nötigen Ausgleich, die vielen lustigen Stunden und den Zuspruch. Im Besonderen möchte ich hier Katrin Seelhorst hervorheben, die vielleicht der zuverlässigste Mensch ist, den ich kenne.

Franky war im Labor wie zu Hause immer das Beste am Tag. Ich danke ihm für jeden einzelnen davon.

Meine Mutter Ria Wolf, meine Schwester Lea Wolf und meine Oma Gisela Körting habe ich die letzten Jahre im Ausland sehr vermisst, war aber immer glücklich und dankbar zu wissen, dass sie da sind.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe sowie nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen erstellt zu haben. Ergebnisse aus Bachelor- oder Schwerpunktarbeiten, die in diesem Arbeitskreis angefertigt wurden und die teilweise in diese Arbeit eingeflossen sind, wurden von mir initiiert und unter meiner Anleitung angefertigt.

Ebenfalls versichere ich, keinen weiteren Promotionsversuch an einer anderen Einrichtung unternommen zu haben.

Hamburg, den 3. November 2015

Sara Virginia Wolf

