
**Evaluierung von rekombinanten Ansätzen zur Entwicklung
artifizieller humaner Seren für eine diagnostische
Standardisierung**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Nadine Offermann

Hamburg, 2016

Gutachter der Dissertation

Prof. Dr. Bernd Meyer
Prof. Dr. Edzard Spillner

Gutachter der Disputation

Prof. Dr. Bernd Meyer
Prof. Dr. Markus Fischer
Prof. Dr. Edzard Spillner
Dr. Angelika Paschke-Kratzin
Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation

24.02.2017

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Mai 2013 bis November 2016 in der Abteilung „Forschung und Entwicklung“ der Dr. Fooke Laboratorien GmbH unter der Leitung von Frau Dr. Margrit Fooke durchgeführt.

Publikationsliste

Artikel

Offermann N, Plum M, Hubner U, Rathloff K, Braren I, Fooke M, Spillner E
Human serum substitution by artificial sera of scalable allergen reactivity based on polyclonal antibodies and chimeras of human FcγRI and IgE domains.
Allergy 2016, 71(12):1794-1799.

Feyzkhanova GU, Filippova MA, Talibov VO, Dementieva EI, Maslennikov VV, Reznikov YP, Offermann N, Zasedatelev AS, Rubina AY, Fooke-Achterrath M
Development of hydrogel biochip for in vitro allergy diagnostics.
J Immunol Methods 2014 Apr [Epub 2014 Mar 12].

Offermann N, Conrad K, Fritzler MJ, Fooke-Achterrath M
Development and validation of a lateral flow assay (LFA) for the determination of IgG-antibodies to Pr3 (cANCA) and MPO (pANCA).
J Immunol Methods 2013 Nov 27 [Epub ahead of print].

Pfender N, Lucassen R, Offermann N, Schulte-Pelkum J, Fooke M, Jakob T
Evaluation of a novel rapid test system for the detection of specific IgE to hymenoptera venoms.
Journal of Allergy 2012, 2012: 1-7.

Artikel in Vorbereitung

Plum M, Heinrich D, Offermann N, Fooke M, Rathloff K, Braren I, Spillner E
A modular platform of avian antibodies and chimeric adapter molecules for establishment of artificial sera.

Oral Presentations

Offermann N, Plum M, Rathloff K, Sundermann U, Fooke M, Spillner E
Establishment of Artificial Human Sera (ARTHUS) based on Chimeras of FcγRI and Human Immunoglobulin Domains.
35th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Barcelona, Spain 2015.

Offermann N, Petschinka M, Fooke M
Evaluation of a novel sensitive and specific Lateral Flow Assay (LFA) for the detection of anti-dsDNA antibodies - Anti-dsDNA LFA.
11th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany 2013.

Poster Presentations

Ay B, Offermann N, Horlitz M, Fooke M

Peptides as antigens for specific IgE detection in cow's milk allergy patients using a reversed enzyme immunoassay.

34th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Copenhagen, Denmark 2014.

Offermann N, Petschinka M, Fooke M

Evaluation of a novel sensitive and specific Lateral Flow Assay (LFA) for the detection of anti-dsDNA antibodies - Anti-dsDNA LFA.

11th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany 2013.

Plum M, Rathloff K, Offermann N, Jakob T, Fooke M, Spillner E.

Artificial Human Reference Sera established by CD64-IgE Fusion Proteins.

32th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Milano, Italy 2013.

Schulte-Pelkum J, Offermann N, Fooke M

New highly sensitive and specific Lateral Flow Tests for the detection of Proteinase 3, Myeloperoxidase and Glomerular Basement Membrane antibodies.

8th International Congress on Autoimmunity May 9-13th 2012, Granada, Spain 2012.

Pfender N, Mahler M, Offermann N, Lucassen R, Fooke M, Jakob T

Comparison between two systems for the detection of specific IgE to bee and wasp venom.

29th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, England 2010.

Pfender N, Mahler M, Offermann N, Lucassen R, Fooke M, Jakob T

Evaluation of a novel rapid test system for the detection of specific IgE to bee and wasp venom.

29th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, England 2010.

Lucassen R, Pfender N, Mahler M, Offermann N, Fooke M, Jacob T

Evaluation of a rapid test system for the detection of specific IgE to cross-reactive carbohydrates.

29th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, England 2010.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Allergie	2
1.1.1 Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I.....	2
1.1.2 Allergiediagnostik.....	4
1.2 Relevanz spezifischer IgG4-Antikörper während einer Immuntherapie	6
1.2.1 IgG4 Diagnostik.....	7
1.3 Autoimmunerkrankungen	8
1.3.1 Autoimmundiagnostik.....	9
1.4 Humane Immunglobuline in der Allergie- und Autoimmundiagnostik	10
1.4.1 Immunglobulin E	10
1.4.2 Immunglobulin G der Subklasse 4.....	11
1.4.3 Autoantikörper	13
1.5 Fc Rezeptoren	14
1.5.1 Fc γ Rezeptor I.....	14
2 ZIEL DER ARBEIT.....	17
3 MATERIAL.....	18
3.1 Chemikalien, Antigene und immunologische Reagenzien	18
3.2 Zelllinien und Bakterienstämme	22
3.3 Puffer, Gele und Lösungen	22
3.4 Expressionsvektoren und Oligonukleotide.....	23
3.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
3.6 Software.....	30

4	METHODEN	31
4.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	31
4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	31
4.1.2	Kolonie-PCR	32
4.1.3	DNA Aufreinigung von PCR-Produkten	33
4.1.4	Agarosegel-Elektrophorese	33
4.1.5	DNA-Isolierung aus einem Agarosegel	34
4.1.6	SLIC Methode	35
4.1.7	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	36
4.1.8	Plasmid-Isolation	37
4.2	Design der Expressionsvektoren zur Expression in HEK293-Zellen	38
4.2.1	Design von universellen Shuttle-Vektoren	38
4.2.2	Design der Expressionsvektoren verschiedener humaner Proteine	40
4.2.3	Site-directed mutagenesis mit Megaprimer PCR	42
4.3	Zellkultur Methoden	43
4.3.1	Zellkulturarbeiten mit HEK293-Zellen	43
4.3.2	Kultivierung von HEK293-Zellen	44
4.3.3	Passagieren von HEK293-Zellen	45
4.3.4	Expression in Rollerflaschen	45
4.3.5	Kryokonserven	46
4.3.6	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	46
4.3.7	Transfektion von HEK293-Zellen	47
4.4	Protein-biochemische Methoden	48
4.4.1	Kopplung von Penicilloyl G an Carrier-Proteine	48
4.4.2	Affinitätschromatografie	50
4.4.2.1	Aufreinigung von Proteinen mit Polyhistidin-Tag	51
4.4.2.2	Aufreinigung allergenspezifischer Kaninchen-Antikörper	52
4.4.3	Gelfiltrationschromatographie	54
4.4.4	Dialyse	55
4.4.5	Beschichtung von Mikrotiterplatten	55
4.4.6	SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	55
4.4.7	Coomassie Blau-Färbung	56
4.4.8	Silberfärbung	56
4.5	Immunologische Methoden	57
4.5.1	Kaninchen-Immunsierung	57
4.5.2	Hühner-Immunsierung	58
4.5.3	Immunoblot	58
4.5.4	Dot Blot	59
4.5.5	Nachweis von Antikörper-Interaktionen mit Fc γ RI	59
4.5.6	Total-IgE-HRP EIA	60
4.5.7	ImmunoCAP [®]	60
4.5.8	Spezifisches IgE, REAST	61
4.5.9	Weitere ELISA Systeme	62
4.5.10	Allergy Lateral Flow Assay	62
4.6	Statistik und analytische Methoden	63

5	ERGEBNISSE	66
5.1	Charakterisierung der zur Immunisierung eingesetzten Allergene.....	66
5.2	Analyse der Reaktivität spezifischer, tierischer Antikörper.....	69
5.2.1	α -Laktalbumin und β -Laktoglobulin.....	69
5.2.2	Casein	70
5.2.3	Bet v 1	72
5.2.4	Penicilloyl G	73
5.2.5	<i>Corylus avellana</i>	74
5.2.6	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	75
5.2.7	<i>Aspergillus fumigatus</i>	76
5.2.8	<i>Hevea brasiliensis</i>	76
5.2.9	Vergleichende Darstellung allergenspezifischer Antikörper	77
5.3	Ansätze zur Herstellung artifiziieller humaner Seren.....	80
5.4	Evaluierung der Expression humaner Proteine in HEK293-Zellen anhand des CD64-IgE Fc Konstrukts	83
5.5	Charakterisierung und Quantifizierung des CD64-IgE Fc Konstrukts	86
5.5.1	Analyse der humanen IgE Fc Region hinsichtlich der Eignung als Komponente in der Allergie <i>in vitro</i> Diagnostik	92
5.5.2	Charakterisierung der Spezifität der CD64 Region als Komponente des CD64-IgE Fc Konstrukts.....	95
5.5.3	Initiale Versuche zur Kopplung von allergenspezifischem Kaninchen-IgG mit CD64-IgE Fc.....	96
5.6	Herstellung artifiziieller humaner Seren zur Verwendung in der <i>in vitro</i> Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgE	99
5.6.1	Optimierung durch allergenspezifische Aufreinigung der Kaninchen-Antikörper	102
5.7	Evaluierung artifiziieller humaner Seren zur Verwendung in der <i>in vitro</i> Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgE	106
5.7.1	Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses von allergenspezifischen Antikörpern und CD64-IgE Fc.....	106
5.7.2	Stabilitätsstudie artifiziieller humaner Seren	112
5.7.3	Überprüfung der artifiziiellen humanen Seren in verschiedenen Testsystemen zum Nachweis von sIgE	114
5.8	Rekombinante Herstellung und Evaluierung der humanen IgG1 und IgG4 Fc Regionen und des humanen FcγRI Rezeptors	118
5.8.1	Etablierung des humanem Fc γ RI Rezeptors im ELISA zur Bindung der IgG1 Fc und IgG4 Fc Region.....	121
5.9	Rekombinante Herstellung und Evaluierung des humanen CD64-IgG4 Fc Moleküls.....	124
5.9.1	Initiale Versuche zur Kopplung von allergenspezifischen Kaninchen-IgG mit CD64-IgG4 Fc	127
5.9.2	Herstellung artifiziieller humaner Seren zur Verwendung in der <i>in vitro</i> -Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgG4	128
5.9.3	Evaluierung artifiziieller humaner Seren zur Verwendung in der <i>in vitro</i> -Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgG4	130

5.10	Mutationen der IgG1 Fc Region zur Reduktion der Affinität zu dem FcγRI Rezeptor	131
5.10.1	Affinitätsuntersuchung der mutierten IgG1 Fc Regionen zu dem humanem FcγRI Rezeptor	133
5.11	Rekombinante Herstellung und Evaluierung des humanen CD64-IgG1 Fc Moleküls.....	135
5.11.1	Initiale Versuche zur Kopplung von Kaninchen-IgG mit CD64-IgG1 M5.....	137
5.11.2	Herstellung und Evaluierung dsDNA-spezifischer, artifiziieller humaner Seren.....	139
6	DISKUSSION	142
6.1	Analyse der Antigenstrukturen zur Erzeugung spezifischer, tierischer Antikörper.....	142
6.2	CD64-IgE Fc Konstrukt: Fusionsprotein aus FcγRI und IgE Fc Domäne.....	148
6.3	Etablierung artifiziieller humaner IgG4-Seren	152
6.4	Etablierung artifiziieller humaner IgG1-Seren	154
6.5	Performance artifiziieller humaner Seren in der <i>in vitro</i> -Diagnostik	157
7	AUSBLICK.....	163
8	LITERATURVERZEICHNIS	I
9	ANHANG	IX
9.1	Gefahrstoffe nach GHS.....	IX
9.2	Danksagung.....	XI
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XII

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen

Abkürzung	Deklaration
AIT	<u>A</u> llergenspezifische <u>I</u> mmun <u>t</u> herapie
ALFA	<u>A</u> llergy <u>L</u> ateral <u>F</u> low <u>A</u> ssay
Allergencode c1	Penicillin G-HSA
Allergencode d1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> Extrakt
Allergencode d2	<i>Dermatophagoides farinae</i> Extrakt
Allergencode f17	<i>Corylus avellana</i> Extrakt
Allergencode f76	α -Lactalbumin
Allergencode f77	β -Lactoglobulin
Allergencode f78	Casein
Allergencode k82	<i>Hevea brasiliensis</i> Extrakt
Allergencode m3	<i>Aspergillus fumigatus</i> Extrakt
Allergencode t3	Birkenextrakt
Amp	<u>A</u> mpicillin
ANA	<u>A</u> nti- <u>n</u> ukleäre <u>A</u> ntikörper
ANCA	<u>A</u> ntineutrophile <u>C</u> ytoplasmatische <u>A</u> ntikörper
AS	<u>A</u> minosäure
BCR	<u>B</u> -cell receptor
BSA	<u>B</u> ovines serum albumin
CD4	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation <u>4</u>
CD64	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation <u>64</u>
CDC	<u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and <u>P</u> revention
CHIR	<u>C</u> hicken <u>I</u> g-like receptor
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
dNTP	<u>D</u> eoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	<u>D</u> oppelstrang <u>D</u> N <u>A</u>
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EASI	<u>E</u> uropean <u>A</u> utoimmunity <u>S</u> tandardisation <u>I</u> nitiative
ECD	<u>E</u> xtracellulär domain
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EIA	<u>E</u> nzyme- <u>I</u> mmuno- <u>A</u> ssay
ELISA	<u>E</u> nzyme-linked-immunosorbent-assay
EtOH	<u>E</u> thanol (C ₂ H ₅ OH)
F _{ab}	<u>A</u> ntigen <u>b</u> inding <u>f</u> ragment
F _c	<u>C</u> rystallisable <u>f</u> ragment

Abkürzungsverzeichnis

FKS	Fötale <u> K</u> älberserum
Fwd	<i>Foreward</i>
HEK Zellen	<i>H</i> uman <i>E</i> mbrionic <i>K</i> idney Zellen
HRP	<i>H</i> orse <i>r</i> adish <i>p</i> eroxidase, Meerrettichperoxidase
HSA	<i>H</i> umanes <i>S</i> erum <u>a</u> lbumin
Ig	<i>I</i> mmunglobulin
IgA	<i>I</i> mmunglobulin <u>A</u>
IgE	<i>I</i> mmunglobulin <u>E</u>
IgG	<i>I</i> mmunglobulin <u>G</u>
IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4	<i>I</i> mmunglobulin <u>G</u> der Subklassen 1, 2, 3 und 4
IgM	<i>I</i> mmunglobulin <u>M</u>
IgY	<i>I</i> mmunglobulin <u>Y</u>
IL-4	<i>I</i> nter <u>l</u> eukin 4
IMAC	<i>I</i> mmobilized <u>m</u> etal- <u>a</u> ffinity <u>c</u> hromatography
IU	<i>I</i> nternational <u>U</u> nit
IUIS	<i>I</i> nternational <u>U</u> nion of <u>I</u> mmunological <u>S</u> ocieties
IVD	<i>I</i> n <u>v</u> itro <u>D</u> iagnostik
kb	<u>K</u> ilobase
kU	<i>K</i> ilo <u>U</u> nit
LFA	<i>L</i> ateral <u>F</u> low <u>A</u> ssay
LPH	<i>H</i> emocyanin aus <i>L</i> imulus <i>p</i> oly <u>p</u> hemus
MG	Molekulargewicht
MHC	<u>M</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
NHS	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxysuccinimid
pa	<i>P</i> ro <u>a</u> nalysis
PBS	<i>P</i> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCMB	<i>P</i> ara- <u>C</u> hlor <u>m</u> ercuri <u>b</u> enzo <u>e</u> säure
PCR	<i>P</i> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
Pen/Strep	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
pTMB	<u>P</u> räcipitierendes <u>T</u> etra- <u>M</u> ethyl <u>B</u> enzidin
RA	<u>R</u> heumatoide <u>A</u> rthritis
RAG	<i>R</i> ecombination- <u>a</u> ctivating <u>g</u> ene
REAST	<i>R</i> eversed <u>e</u> nzyme <u>a</u> llergo <u>s</u> orbent <u>t</u> est
Rev	<i>R</i> everse
RU	<i>R</i> elative <u>U</u> nits
SDS-PAGE	<i>S</i> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
sIgE	<u>S</u> pezifisches <u>I</u> mmunglobulin <u>E</u>
sIgG4	<u>S</u> pezifisches <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u> der Subklasse 4
SIT	<u>S</u> pezifische <u>I</u> mmuntherapie
SLE	<u>S</u> ystemischer <u>L</u> upus <u>E</u> rythematosus

Abkürzungsverzeichnis

SLIC	<i>Sequence- and Ligation-Independent Cloning</i>
SPT	<i>Skin prick test</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TCR	<i>T-cell-receptor</i>
T _m	<i>Melting temperature</i>
TMB	<i>Tetra-Methyl Benzidin</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Zusammenfassung

Für die Entwicklung, Validierung, Standardisierung und die Qualitätskontrolle von *in vitro* Diagnostika ist die Verfügbarkeit von gut charakterisierten Seren unverzichtbar. Humane Kontrollseren sind jedoch nicht für jeden Parameter in ausreichender Menge verfügbar. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit rekombinante Ansätze zur Entwicklung artifizieller humaner Seren (ARTHUS) für eine diagnostische Standardisierung zum Nachweis von allergenspezifischem Immunglobulin E (IgE), allergenspezifischem Immunglobulin G der Subklasse 4 (IgG4) und Autoantikörpern der Subklasse 1 (IgG1) evaluiert. Grundprinzip dabei war die Verknüpfung von spezifischen, tierischen Antikörpern und rekombinanten Adapter-Molekülen, die geeignet sind, mit den spezifischen Antikörpern stabile Interaktionen einzugehen.

Als Quelle polyklonaler, spezifischer Antikörper gegen rekombinant hergestellte und native Allergene als auch Allergenextrakte wurden primär Seren immunisierter Kaninchen verwendet. Die Proteinzusammensetzung der hierfür eingesetzten Allergenextrakte wurde vor Immunisierung analysiert und die resultierenden Immunreaktivitäten der allergenspezifischen Antikörper nach Immunisierung mittels biochemischer und immunologischer Methoden evaluiert.

Parallel wurden rekombinante Fusionsproteine, welche aus den konstanten Regionen des humanen IgEs und dem humanen Fc γ RI Rezeptor (CD64) bzw. einem avianen IgY Rezeptor bestehen, entwickelt und in humanen Zelllinien exprimiert. Nach Optimierung der Immunreaktivität durch antigenspezifische Reinigung und der Konzentrationsverhältnisse von allergenspezifisch gereinigten Antikörpern und rekombinanten Adapter-Molekülen konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die artifiziellen humanen Seren in drei unterschiedlichen Testsystemen sehr gute Übereinstimmungen mit humanen Seren aufweisen.

Weiterhin konnten allergenspezifische, artifizielle humane Seren für die Verwendung in einem Testsystem zum Nachweis von spezifischem IgG4 (sIgG4), einem wichtigen Parameter für die allergenspezifische Immuntherapie, dargestellt werden.

Darüber hinaus wurden artifizielle Seren zum Nachweis von IgG1 entwickelt. Hierbei wurde durch gezielte Mutation eine Variante des IgG1 Fc konstruiert, die keine Interaktion mit dem humanen Fc γ RI Rezeptor zeigte. Eine mögliche Bindung zwischen dem CD64 Rezeptor eines Moleküls mit dem IgG1 Fc eines zweiten Fusionsmoleküls wurde dadurch unterdrückt. Ein auf dieser Variante beruhendes Konstrukt konnte erfolgreich als Komponente artifizieller humaner IgG1 Seren zur Standardisierung von Testsystemen zum Nachweis von anti-Doppelstrang DNA (dsDNA)-spezifischen Antikörpern verwendet werden. Hierbei konnte der Nachweis geführt werden, dass auch monoklonale murine Antikörper für die Darstellung artifizieller humaner Seren genutzt werden können, was die hohe Flexibilität des verfolgten Ansatzes zusätzlich erweitert.

Zudem führte ein alternativer Ansatz, unter Verwendung eines CHIR-IgE Fc Konstrukts, ebenfalls zu funktionellen ARTHUS für die *in vitro* Allergie-Diagnostik. Der verwendete CHIR Rezeptor ermöglicht, im Gegensatz zum CD64 Rezeptor, den Einsatz von spezifischen-IgY Antikörpern zur Realisierung artifiziieller Kontrollen und erweitert somit das Spektrum der möglichen antigenspezifischen Antikörper-Isotypen.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass ARTHUS zur Entwicklung, Validierung, Standardisierung und Qualitätskontrolle von *in vitro* Diagnostika beitragen können. Prinzipiell sind ARTHUS mit unterschiedlichen Spezifitäten gegen nahezu jede Struktur, inklusive Proteine, Peptide und Kohlenhydrate, denkbar. Der Einsatz monoklonaler Antikörper ergänzend zu polyklonalen Antikörpern, bietet zudem die Möglichkeit mittels ARTHUS gezielte Epitope und deren Zugänglichkeit in den verschiedenen Testsystemen zu analysieren. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und evaluierten Möglichkeiten zur Etablierung von artifiziiellen Seren werden zu einer verbesserten Diagnostik und damit auch zu verbesserten Therapieentscheidungen sowie einem verlässlicheren Verlaufsmonitoring beitragen und damit helfen, einer Vielzahl von Erkrankungen adäquat zu begegnen.

Abstract

The availability of well-defined quality controls is essential required for the development, validation, standardization and quality control of *in vitro* diagnostics. However, the availability of human control sera is limited regarding different parameters and sufficient amounts. Therefore the aim of the present thesis was to evaluate recombinant approaches for the development of artificial human sera (ARTHUS). ARTHUS should contribute to diagnostical standardization for the determination of allergen-specific immunoglobulin E (IgE), allergen-specific immunoglobulin G of subclass 4 (IgG4) and autoantibodies of subclass 1 (IgG1). The basic principle was the fusion of specific animal antibodies and recombinant adaptor molecules, which are able to assume stable interactions with the specific antibodies.

Polyclonal, specific antibodies were produced in rabbits by immunization with purified recombinant and native allergens as well as whole allergen extracts. The protein composition of the used allergen extracts were analyzed before immunization. After immunization, resulting immunoreactivities of allergen-specific antibodies were evaluated by biochemical and immunological methods.

In parallel recombinant fusion proteins were designed and expressed in human cell lines. These fusion proteins comprising the constant domains of human IgE and the human Fc γ RI receptor (CD64) or an avian IgY receptor, respectively. After optimization of the immunoreactivities by antigen-specific purification and adjustment of the ratio between allergen-specific antibodies und recombinant adaptor molecules, artificial human sera showed comparable results with human sera obtained in three different test systems.

Furthermore allergen-specific, artificial human sera could be realized for the use in a test system for the determination of specific IgG4 (sIgG4), an important parameter for the allergen-specific immunotherapy.

In addition artificial human sera for the determination of IgG1 were developed. For that purpose an IgG1 Fc variant with a specific mutation was designed, which was unable to interact with the human Fc γ RI receptor. Thereby an imaginable binding between the CD64 receptor of one molecule with the IgG1 Fc domains of a second fusion protein was prevented. Such a construct could successfully used as component of artificial human IgG1 sera for standardization of test systems for the determination of dsDNA-specific antibodies. Moreover these results demonstrated that monoclonal murine antibodies can be used for production of artificial human sera. This fact expands the high flexibility of the traced approach.

Additionally an alternative preparation using a CHIR-IgE Fc construct also led to functional ARTHUS for the allergy *in vitro* diagnostic. Contrary to the CD64 receptor the CHIR receptor

offers the use of specific-IgY antibodies for the implementation of artificial controls. Consequently the spectrum of potential antigen-specific antibody isotypes is extended.

The present results demonstrate that ARTHUS are able to contribute to the development, validation, standardization and quality control of *in vitro* diagnostics. Generally ARTHUS with specificity for virtually any target structure of interest including proteins, peptides and carbohydrates are feasible. Additional to polyclonal antibodies the use of monoclonal antibodies provides the potential to analyze specific epitopes and their accessibility in different test systems by ARTHUS. The developed and evaluated options in the present thesis allows for an improved diagnostic. Thereby ARTHUS are also able to improve therapy decisions as well as monitoring and finally help to face huge variety of diseases adequately.

1 Einleitung

In vitro Testsysteme zum Nachweis von spezifischem Immunglobulin E (sIgE) werden in der Regel anhand des aktuellen Standards der World Health Organisation (WHO) kalibriert. Es handelte sich dabei um ein kommerziell verfügbares Serum mit bekannter Total-IgE-Konzentration. 1970 wurde erstmals eine humane IgE Präparation (68/341) vom UK Medical Research Council etabliert (1). Ab 1973 war die erste internationale Referenz-Präparation von der WHO verfügbar. 1980 folgte bereits die zweite Präparation (75/502), die bis 2012 als internationales Standardmaterial zur Kalibrierung von Testsystemen zum Nachweis von sIgE eingesetzt wurde (2). Mittlerweile ist die dritte internationale Referenz-Präparation (11/234) verfügbar (3). *In vitro* Diagnostik-Hersteller nutzen das WHO kalibrierte Kontrollmaterial zur Validierung von Standardkurven, sodass die gemessenen Werte in der international gebräuchlichen Einheit „IU/mL“ angegeben werden können, wobei 1 IU/mL 2,4 ng/mL IgE entsprechen. Diese Standardisierung berücksichtigt jedoch nicht die Zusammensetzung und Qualität der Allergenextrakte. Diese unterscheiden sich oftmals zwischen den Testsystemen verschiedener *in vitro* Diagnostik-Hersteller aufgrund unterschiedlicher Rohmaterialien, verschiedener Herstellungsprozesse, Lagerungsbedingungen und Freigabekriterien (4). Assays zum Nachweis von sIgE werden zwar durch Ringversuche miteinander verglichen, jedoch stehen lediglich Proben für einige Allergene zur Verfügung (5). Zudem wird nicht ausreichend Material bereitgestellt, um bei abweichenden Resultaten die Testsysteme zu optimieren.

Der Anstieg allergenspezifischer IgG4-Antikörper wird oftmals als Parameter im Rahmen einer Immuntherapiekontrolle gemessen (6). Auch für diesen Nachweis existieren keine standardisierten, allergenspezifischen Kontrollmaterialien. Zudem ist kein internationaler IgG4 Standard für die Diagnostik verfügbar, sodass weder ein einheitlicher Cut-off, noch eine vergleichbare Einheit der gemessenen Werte zwischen den Testsystemen vorliegt.

Für die Autoimmundiagnostik ist Standardmaterial für nur wenige Parameter und nur in geringen Mengen kommerziell erhältlich. Die meisten Ergebnisse von Autoantikörperbestimmungen werden in relativen Einheiten angegeben, welche auf interne Standards der einzelnen Diagnostikhersteller zurück zu führen sind. Dadurch wird eine Vergleichbarkeit der Testsysteme erschwert. EASI (European Autoimmunity Standardisation Initiative) wurde 2002 von Klinikern und Wissenschaftlern aus Europa gegründet, um die Diagnostik von rheumatischen Erkrankungen in Europa zu verbessern. Das Ziel der EASI ist es, Leitlinien für eine kosteneffektive, zuverlässige und international gültige Standardisierung der Autoimmundiagnostik zu definieren (7). Die ersten Empfehlungen für die Detektion von Autoantikörpern gegen zelluläre Komponenten, auch ANAs (anti-nukleäre Antikörper) genannt, veröffentlichte die EASI im Jahr 2014. Von den insgesamt

25 Empfehlungen besagt eine, dass Testsysteme zum Nachweis von ANAs und dsDNA-Antikörper anhand von internationalen Standards (z.B. WHO, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), IUIS (International Union of Immunological Societies)) kalibriert werden sollen (8).

1.1 Allergie

Der Begriff „Allergie“ wurde ursprünglich von Clemens von Pirquet als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“, definiert (9). Heute wird eine Allergie als eine Erkrankung definiert, die durch Immunreaktionen gegen harmlose Stoffe wie beispielsweise Pollen, Lebensmittelbestandteile, das Gift von Insekten oder chemische Substanzen ausgelöst wird (10).

Allgemein wird eine Allergie auch als Hypersensitivität oder Überempfindlichkeit des Immunsystems definiert. Personen, die von einer Allergie betroffen sind, werden als Allergiker oder Atopiker bezeichnet. Die klinische und pathologische Ausprägung einer Allergie ist abhängig von der Art und Stärke und dem zugrunde liegenden Mechanismus der Immunantwort. Daher teilten Gell und Coombs die Hypersensitivitätsreaktionen in vier verschiedene Typen der Allergie (Typ I bis IV) ein (11).

Da in der vorliegenden Studie die Standardisierung von Testsystemen zum Nachweis von sIgE-Antikörpern, welche für die Soforttyp-Reaktion (Typ I Reaktion) verantwortlich sind, etabliert werden soll, wird ausschließlich diese Hypersensitivitätsreaktion weiter beschrieben.

1.1.1 Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I

Gewöhnlich wird der Begriff „Allergie“ mit der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I oder Überempfindlichkeit vom Soforttyp, die durch IgE vermittelt wird, gleichgesetzt (12).

Zur Bildung von IgE-Antikörpern werden von speziellen T-Lymphozyten, den sogenannten T-Helferzellen, freigesetzte Cytokine, vor allem Interleukin 4 (IL-4) benötigt. Fresszellen, z.B. Makrophagen nehmen einen Fremdstoff wie beispielsweise ein Allergen auf, zerlegen dieses und präsentieren anschließend die Bruchstücke des Allergens auf ihrer Oberfläche. Solche allergenpräsentierenden Zellen können nun in Kontakt mit T-Lymphozyten treten, wodurch diese aktiviert werden und bestimmte Botenstoffe ausschütten (Interleukine und andere Zytokine). Die aktivierten T-Lymphozyten interagieren mit allergenspezifischen B-Lymphozyten, die in Gegenwart des Allergens zu Plasmazellen reifen und dabei den Isotypwechsel zu IgE vollziehen. Von den Plasmazellen freigesetztes IgE bindet unter anderem an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI-Rezeptor) auf basophilen und eosinophilen Granulozyten und Mastzellen, die unterhalb der Schleimhäute, im Blut und im Bindegewebe lokalisiert sind (siehe Abbildung 1). Die

Produktion von IgE als Antwort auf ein Allergen löst jedoch noch keine allergische Reaktion aus (13). Man spricht von einer Sensibilisierung der betroffenen Person für ein Allergen.

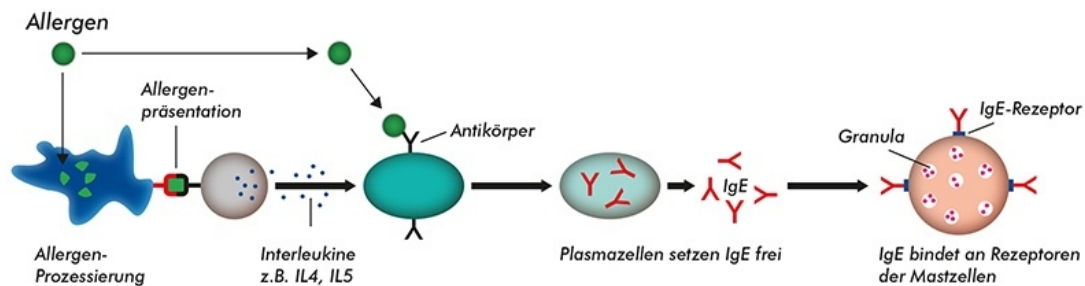


Abbildung 1: Mechanismus der IgE Sensibilisierung gegen ein Allergen. Makrophagen nehmen ein Allergen auf, zerlegen dieses und präsentieren die Bruchstücke des Allergens auf der Oberfläche. Allergen-präsentierende Zellen treten in Kontakt mit T-Lymphozyten, wodurch diese verschiedene Interleukine ausschütten. B-Lymphozyten reifen in Gegenwart des Allergens zu Plasmazellen und setzen IgE frei, welches an den IgE-Rezeptoren auf Mastzellen bindet [entnommen aus (14)].

Findet ein zweiter Kontakt mit dem Allergen statt, werden über dieses die Antikörper auf den Mastzellen quervernetzt. Dieses so genannte *Bridging* führt zur Freisetzung von den in Granula gespeicherten vasoaktiven Substanzen wie Histamin, wodurch eine allergische Soforttyp-Reaktion verursacht wird (siehe Abbildung 2). Diese Exozytose bezeichnet man als Degranulation der Mastzellen. Zusätzlich synthetisieren die Mastzellen andere Entzündungsmediatoren, z.B. Leukotriene und Cytokine, die eine so genannte Spätreaktion hervorrufen können (15-17).

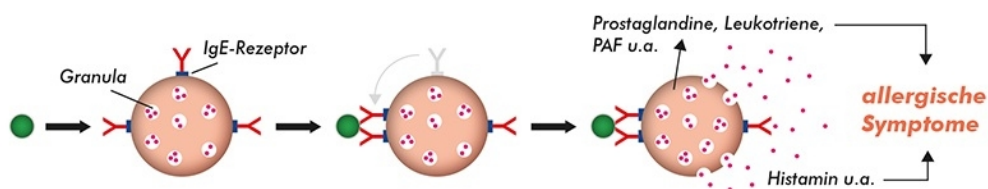


Abbildung 2: Mechanismus der Soforttyp-Reaktion sensibilisierter Personen bei erneutem Allergenkontakt. Nach erneutem Kontakt mit dem Allergen, werden über dieses die Antikörper auf den Mastzellen quervernetzt. Diese Vernetzung führt zur Freisetzung von den in Granula gespeicherten vasoaktiven Substanzen wie Histamin u.a. [entnommen aus (14)].

Die Soforttypreaktion kommt durch die Freisetzung von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren zustande und kann innerhalb von Sekunden eintreten. Die Ausprägung der klinischen Symptome ist vom Ausmaß der freigesetzten Entzündungsmediatoren abhängig. Diese verursachen eine schnelle Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit, Kontraktion der glatten Muskulatur und eine vermehrte Schleimproduktion an den Schleimhäuten. Die stärkste Reaktion ist der anaphylaktische Schock. Unter einem anaphylaktischen Schock versteht man eine allergiebedingte, lebensbedrohliche systemische Akutreaktion, welche aufgrund des Risikos eines Herz-Kreislaufversagens sofort behandelt werden muss (13).

Die Symptome der einzelnen Atopiker werden nach Ring und Messmer in vier Schweregrade eingeteilt (Tabelle 2), wobei eine lokale Schwellung über 10 cm und einer Dauer von über 24 Stunden als schwächste Reaktion einer Allergie definiert wird (18).

Tabelle 2: Klassifizierung der allergischen Reaktion nach Ring und Messmer. Die Symptome werden in vier Schweregrade eingeteilt, wobei lokale Reaktionen als schwächste Symptome und Herz- und Atemstillstand als die stärksten Symptome bezeichnet werden (18).

Grad	Symptome
I	Lokale Reaktionen [Juckreiz, Angioödem, Urtikaria (Nesselsucht)]
II	Schwache bis mäßige pulmonale, kardiovaskuläre, und/oder gastrointestinale Symptome
III	Anaphylaktischer Schock, Bewusstlosigkeit
IV	Herzstillstand, Atemstillstand

Acht bis zwölf Stunden nach der Sofortreaktion kann sich eine Spätreaktion anschließen, die durch freigesetzte Leukotriene und Cytokine der Mastzellen vermittelt wird. Die Spätreaktion ist mit weniger schweren Symptomen verbunden, kann jedoch zu tagelang anhaltenden Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen führen. Sie ist die Hauptursache für viele langfristige Krankheitsbilder, wie zum Beispiel allergisches Asthma (13, 16).

1.1.2 Allergiediagnostik

Bei der Allergiediagnostik unterscheidet man zwischen *in vivo* und *in vitro* Testverfahren. Bei den *in vivo* Testverfahren handelt sich um Hauttests, die eine zelluläre Immunantwort nachweisen. Die *in vitro* Methoden nutzen die frei zirkulierenden Antikörper im Blut, um eine Sensibilisierung nachweisen zu können.

***In vivo* Testverfahren**

Der *Skin Prick Test* (SPT) und der Intrakutantest sind Hauttests zur Feststellung einer IgE-vermittelten Sensibilisierung vom Soforttyp.

Beim SPT wird eine Allergenlösung auf den Unterarm der Testperson getropft und anschließend die Haut mittels einer Lanzette durch den Tropfen hindurch leicht beschädigt bzw. „geprickt“. Dabei dringen die Allergene in die Epidermis ein und reagieren bei Allergikern mit den mastzellgebundenen IgEs. Das Testprinzip des Intrakutantests ist ähnlich dem SPT, mit dem Unterschied, dass bei diesem Test die Allergenlösung unter die Haut gespritzt wird. Dabei wird eine wesentlich größere Menge (30 bis 50 µL) der Allergenlösung unter die Haut gegeben, sodass eine geringere Konzentration als beim SPT verwendet werden muss (19).

Durch die Ausschüttung von Histamin kommt es bei beiden Verfahren innerhalb von 15 bis 30 Minuten zur Quaddel-Bildung, wobei der Durchmesser der Quaddel auf den Grad der Überempfindlichkeit schließen lässt. Entstehen keine Quaddeln oder Ödeme, ist das Vorliegen einer Allergie unwahrscheinlich. Jeder Patient wird zusätzlich mit einer Negativkontrolle (Lösungsmittel) sowie einer Positivkontrolle (verdünntes Histamin) getestet (16, 19).

***In vitro* Testverfahren**

Das Prinzip der *in vitro* Testverfahren basiert auf der Bindung zwischen allergenspezifischen IgE Antikörpern und einem Allergen. Im Gegensatz zu den *in vivo* Methoden wird bei diesen Testsystemen eine Antikörperreaktion anstatt einer zelluläre Reaktion gemessen.

Der *enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA) ist das am häufigsten genutzte immunologische Nachweisverfahren, das in Mikrotiterplatten (meist 96 Kavitäten) durchgeführt wird. In der Allergie-Diagnostik wird zwischen direkten und reversen Testsystemen unterschieden. Ein Beispiel für einen reversen ELISA zur Bestimmung von spezifischem IgE und Gesamt-IgE ist das ALLERG-O-LIQ System, welches ausführlich in Kapitel 4.5.8 beschrieben wird. Der ImmunoCAP® der Firma ThermoScientific ist ein direkter ELISA zum Nachweis von IgE (siehe Kapitel 4.5.7).

Des Weiteren können Antikörper-Allergen-Wechselwirkungen in „Lateral Flow Assays“ wie z.B. im ALFA (Allergie Lateral Flow Assay) System der Firma Dr. Fooke-Achterrath Laboratorien nachgewiesen werden (20, 21). Dieses System wird ausführlich in Kapitel 4.5.10 beschrieben. Eine weitere Technologie ist der Microarray, bei dem die Antigene auf einer Festphase (z.B. auf einer Glasplatte) immobilisiert sind. Der Microarray wird häufig für eine *component-resolved diagnostic* (CRD) eingesetzt, bei der nachgewiesen wird, gegen welche Proteine eines Allergenextraktes die IgE-Antikörper gerichtet sind (22, 23).

Alle beschriebenen Testsysteme unterliegen zur Zeit keiner allgemein gültigen Standardisierung, sodass Abweichungen aufgrund unterschiedlicher Methoden und unterschiedlicher Reagenzien, wie z.B. Allergenextrakte oder anti-IgE-Antikörper, nicht auszuschließen sind (24).

1.2 Relevanz spezifischer IgG4-Antikörper während einer Immuntherapie

In der Literatur werden spezifische IgG4 (sIgG4)-Antikörper häufig als „blockierende“ Antikörper bezeichnet, deren Konzentration oftmals nach allergenspezifischen Immuntherapien (AIT oder SIT) ansteigt (25). Ziel der Immuntherapie ist es, die Überempfindlichkeit gegen ein bestimmtes Allergen zu lindern was erreicht werden soll indem einem Patienten die Allergie auslösenden Allergene subkutan oder sublingual verabreicht werden. Bei beiden Methoden wird die Dosis des entsprechenden Allergens im Laufe der Therapie gesteigert. Die Behandlung wird mit einer geringen Allergenkonzentration gestartet, damit die Immunreaktion möglichst gering gehalten wird. Zurzeit stehen Immuntherapiepräparate gegen Gräser- und Baumpollen, Hausstaubmilben, Tierhaare, Schimmelpilze und Insektengifte zur Verfügung. Die Wirksamkeit der Therapie ist sowohl Patienten- als auch Allergen-abhängig (26). Vielversprechend verlaufen in der Regel die SITs mit Gräserpollen (27) und Insektengiften (28), wobei diese AITs aufgrund von hoher Prävalenz und erhöhter Risikowahrscheinlichkeit intensiver studiert wurden als andere Immuntherapien.

Es konnte gezeigt werden, dass positiv verlaufende SITs mit der sIgG4 Konzentration im Blut korrelieren (6). Eine Erfolgskontrolle anhand der sIgE Konzentration ist nicht möglich, da der Titer an sIgE erst zum Ende der SIT messbar abnimmt. Der Grund dafür sind die jahrelang persistierenden Mastzellen in den Schleimhäuten und im Bindegewebe (29). Zu Beginn einer AIT wird in der Regel sogar ein Anstieg des sIgEs verzeichnet (26). Dennoch sinkt zu Beginn einer Immuntherapie die Aktivität der basophilen Granulozyten und Mastzellen, wodurch bereits in den ersten Stunden nach einer SIT die Immunreaktion gehemmt wird. Der Grund für den rapiden Abfall der Aktivität ist bislang nicht geklärt (26). Zudem steigt innerhalb kürzester Zeit das Verhältnis von den Zytokinen der an der zellulären Immunantwort beteiligten T-Helferzellen (T_H1), zu den Zytokinen der T_H2 Zellen, welche an der humoralen Immunantwort beteiligt sind. Währenddessen werden regulatorische T-Zellen (T_{Reg}), die die Aktivierung des Immunsystems unterdrücken, induziert (30).

Es wird vermehrt IL-10 von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen produziert. IL-10 bewirkt vermutlich zusammen mit dem $TGF\beta$ (Transforming growth factor beta), welches ebenfalls ansteigt, die Vermehrung von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten (siehe Abbildung 3). Dabei handelt es sich in der Regel um IgG4 produzierende Zellen, wobei in manchen Studien auch von einem IgG1 und IgA Anstieg berichtet wird (6, 26, 29). Insgesamt ist der Zusammenhang zwischen der IL-10 Ausschüttung, dem Anstieg von allergenspezifischem IgG4 und folgend der Unterdrückung allergen-vermittelter Symptome weitgehend ungeklärt (29). Unbestritten ist jedoch, dass die resultierenden, blockierenden Antikörper mit dem IgE um das

Allergien konkurrieren. Dies führt zur Reduktion von Allergen-IgE Komplexen, welche durch hoch- oder niedrig-affine Rezeptoren (FcεRI oder FcεRII) auf der Oberfläche von basophilen und eosinophilen Granulozyten und Mastzellen gebunden sind. Auf Dauer soll die SIT die Anzahl der Mastzellen und die daraus resultierende Menge an Entzündungsmediatoren verringern (30). Obwohl viele verschiedene Mechanismen im menschlichen Immunsystem während einer SIT ablaufen, ist der Nachweis eines sIgG4 Anstieges die einfachste und schnellste Methode, den Verlauf einer SIT zu kontrollieren (25).

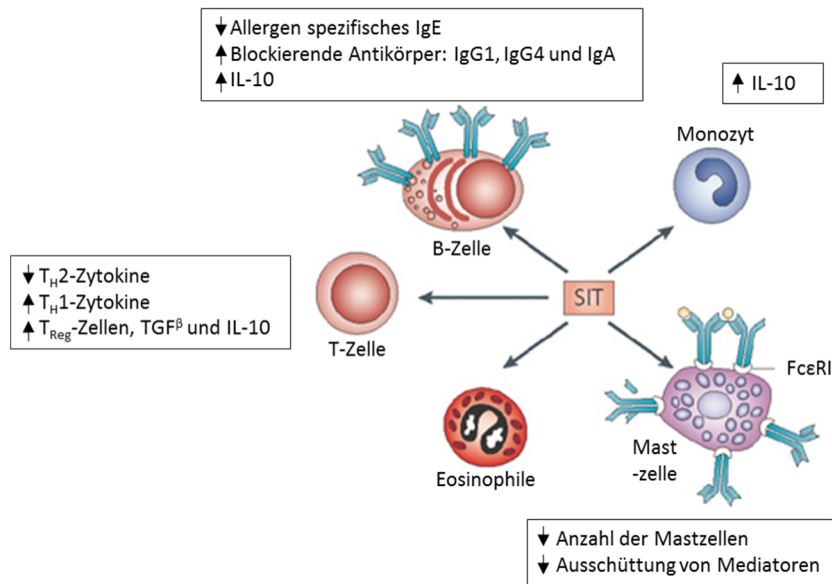


Abbildung 3: Modifikation der zellulären und humoralen Immunantwort nach SIT. Nach SIT ist das Verhältnis von T_H1 -Zytokinen zu T_H2 -Zytokinen erhöht und T_{Reg} -Zellen werden induziert. Die Produktion von $TGF\beta$ und IL-10 von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen ist erhöht. B-Zellen produzieren vermehrt blockierende IgG1, IgG4 und IgA Antikörper, während die Produktion von IgE abnimmt. Die Anzahl der Mastzellen und die Ausschüttung von Mediatoren nimmt ebenfalls ab [modifiziert aus (30)].

Des Weiteren werden erhöhte sIgG4 Titer mit Nahrungsmittelintoleranzen assoziiert. Jedoch wird die Diagnostik von sIgG4 gegen Nahrungsmittel, als Indikator für eine Unverträglichkeit, in der Literatur kontrovers diskutiert (31, 32).

1.2.1 IgG4 Diagnostik

Der Nachweis von sIgG4-Antikörpern erfolgt in der Regel *in vitro* mittels ELISA Testverfahren. Die kommerziell erhältlichen Testsysteme von z.B. Dr. Fooke Laboratorien, ThermoScientific, Immunolab usw. weisen sIgG4 gegen verschiedene Antigene nach. Da kein internationaler Standard für die Diagnostik von IgG4 verfügbar ist, gibt es weder einen einheitlichen Cut-off noch eine vergleichbare Einheit der gemessenen Werte zwischen den Testsystemen. Daher soll in der vorliegenden Arbeit eine synthetische Kontrolle zur Standardisierung dieser Testsysteme hergestellt werden. Mit Hilfe der kommerziell erhältlichen ELISAs lässt sich momentan lediglich

ein sIgG4 Wert bestimmen, dessen Anstieg oder Abfall während einer Immuntherapie überwacht werden kann (Monitoring). Die Testsysteme geben jedoch keinen Aufschluss über das Verhältnis von sIgE zu „blockierendem“ sIgG4. Den Nachweis von blockierendem sIgG4 erhält man durch einen Inhibitions- oder Interferenz-ELISA (33).

1.3 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen werden durch Reaktionen des Immunsystems gegen körpereigene Antigene, sogenannte Selbstantigene, verursacht. Diese Erkrankungen haben Schädigungen einzelner Gewebestrukturen, welche diese Antigene exprimieren, zur Folge. Die Ursache von Autoimmunerkrankungen liegt in einer fehlerhaften Selektion von T-Zellen im Thymus sowie B-Zellen im Knochenmark. Dort wird in der Regel eine Immunantwort auf Selbstantigene unterdrückt (34).

Immunreaktive T-Zellen werden im Thymus gebildet und durchlaufen verschiedene Stadien der Differenzierung. In der letzten Phase werden heterodimere, transmembranständige T-Zell-Rezeptoren (TCR, T-cell-receptor) mit hoher Variabilität gebildet. Diese Rezeptoren interagieren mit speziellen Zelloberflächen-Molekülen (MHC, major histocompatibility complex) auf Epithelzellen. MHC der Klasse I wird von nahezu allen nuklearen Zellen exprimiert, wobei MHC der Klasse II nur auf Antigen-präsentierenden Zellen dargestellt wird. Je nach der Bindung zwischen TCR und MHC I bzw. MHC II reifen die sogenannten „Doppel-positiven (DP)“ T-Zellen zu CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen heran. Erkennen T-Zellen keinen der beiden MHC Komplexe, kommt es zur Apoptose. Die differenzierten Zellen, abhängig von der Affinität zu MHC I oder MHC II, gehen von der Rinde des Thymus in das Mark über. Dort werden Autoantigene, welche zuvor in Peptide prozessiert wurden, gebunden an MHC Komplexen den T-Zellen präsentiert. Binden die TCR Rezeptoren mit hoher Affinität körpereigene Antigene, werden diese Zellen selektiert (negative Selektion). Alle anderen T-Lymphozyten wandern über das Blut in die peripheren, lymphatischen Organe, wo sich die ausdifferenzierten Zellen bei Kontakt mit einem entsprechenden, fremden Antigen vermehren (35).

Die Selektion von B-Zellen, die mit Selbstantigenen reagieren, findet im Knochenmark statt. B-Zellen produzieren dort unterschiedliche Immunglobulinsequenzen, die als B-Zellrezeptoren (BCR, B-cell receptor) fungieren. Die ständige Rekombination von BCRs kann zur Bindung von Selbstantigenen führen. Diese Bindung resultiert entweder in dem Verlust des Rezeptors, sodass es zu einer Neubildung des BCRs kommt, oder zur Apoptose der B-Zelle. Bei erfolgreicher Generierung eines Immunglobulinrezeptors, der kein Epitop von Selbstantigenen erkennt, gelangen die Zellen in die Blutbahn. Bei diesen Zellen sind die Gene RAG (recombination-

activating gene) 1 und 2 für die Rekombination des Rezeptors inaktiviert. Werden die Immunglobulinrezeptoren später über ein Antigen verbunden (cross-linking), folgt die Ausschüttung von Zytokinen sowie die Vermehrung und Differenzierung von B-Zellen in Antikörpersezernierenden Plasmazellen (35, 36).

Warum es zur fehlerhaften Selektion kommt und daraus resultierend Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen entstehen, ist größtenteils ungeklärt (34). Hauptsächlich werden genetische und infektiöse Faktoren sowie Umweltbedingungen vermutet (37). Werden Selbstantigene nicht während der T-Zell Entwicklung im Thymus auf Epithelzellen präsentiert, erfolgt keine Selektion. Antigene mit einem niedrigen Zirkulationslevel sind jedoch in speziellen Geweben lokalisiert, wo vaskuläre und / oder zelluläre Basalmembranen eine Barriere gegen autoreaktive Zellen bilden (35).

Ungefähr 5 % der westlichen Bevölkerung sind von Autoimmunerkrankungen betroffen (38), wobei es sich bei den meisten Patienten um Frauen handelt (> 75 %) (35). Erhöhte Konzentrationen von Östrogen scheinen bei Immunreaktionen eine zentrale Rolle zu spielen, was eine erhöhte Prävalenz bei Frauen begünstigen würde (39). Es sind über 30 unterschiedliche Autoimmunerkrankungen bekannt (40), wobei Diabetes mellitus, Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis (RA) zu den Erkrankungen mit der höchste Prävalenz zählen (34).

Autoimmunerkrankungen werden in zwei Gruppen unterteilt. Bei „Organ-spezifischen“ Erkrankungen reagieren Autoantikörper und T-Zellen mit Selbstantigenen, welche ausschließlich in speziellen Geweben lokalisiert sind. Beispiele dafür sind der Insulin-abhängige Diabetes mellitus, die primäre biliäre Cholangitis oder der Morbus Basedow (7). Für systemische Erkrankungen sind Reaktionen gegen ein oder mehrere Antigene, die in unterschiedlichen Geweben im Körper verteilt sind, charakteristisch (35), wie z.B. Systemischer Lupus Erythematosus (SLE), Multiple Sklerose, oder RA (7).

1.3.1 Autoimmundiagnostik

Für die meisten Autoimmunerkrankungen ist eine humorale sowie zelluläre Immunantwort charakteristisch. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen ein Antigen findet in der Regel mittels der indirekten Immunfluoreszenz Methode (IIF) und / oder immunenzymatischen Testsystemen, wie ELISA, Western Blot oder Lateral Flow Assay statt. Die IIF gilt als eine besonders sensitive Methode zum Screening von Autoantikörpern. Immunenzymatische Testsysteme hingegen zeichnen sich durch eine einfache, Operator-unabhängige und reproduzierbare Durchführung aus (41). Zur Standardisierung dieser Testsysteme fehlen ebenfalls Kontrollseren.

1.4 Humane Immunglobuline in der Allergie- und Autoimmun- diagnostik

Im Menschen existieren fünf Klassen von Antikörpern, auch Immunglobuline (Ig) genannt, die jeweils als Grundstruktur zwei Typen von Polypeptidketten besitzen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur sowie ihres Molekulargewicht der Polypeptidketten wird zwischen Igs der Klasse M, G, A, E und D unterschieden, wobei IgA mit zwei Subklassen und IgG mit vier Subklassen im menschlichen Immunsystem vertreten sind (42).

Die beiden Polypeptidketten werden aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts (MG) als leichte und schwere Kette bezeichnet. Die Konformation aller Antikörperklassen erinnert an den Buchstaben Y, wobei der Stamm als konstantes Fragment (F_c , Crystallisable fragment) und die Arme als antigenbindendes Fragment (F_{ab} , antigen binding fragment) bezeichnet werden. Igs sind aus Immunglobulindomänen aufgebaut, wobei z.B. bei IgG jede leichte Kette aus zwei homologen Domänen und die schweren Ketten aus jeweils vier Immunglobulindomänen besteht. Die carboxyterminalen Immunglobulindomänen der beiden schweren Ketten bilden die konstante Region. Diese erlaubt einerseits die Bindung an spezifische Zellrezeptoren und andererseits ist dieser Bereich der Antikörper für die Aktivierung der Komplementkaskade verantwortlich. Jedes F_{ab} , bestehend aus den aminoterminalen Domänen der leichten und schweren Kette, enthält eine Antigenbindungsstruktur. Sowohl jede leichte Kette mit einer schweren Kette als auch die schweren Ketten untereinander sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die Anzahl der Disulfidbrücken innerhalb eines Moleküls ist von der Antikörperklasse anhängig. Zusätzlich sind die beiden Fragmente F_c und F_{ab} bei einigen Antikörperklassen über flexible Polypeptidketten (Hinge-Region) verbunden, die den Antikörper-Antigen-Komplex aufgrund der erhöhten Beweglichkeit begünstigen. Obwohl jedes F_{ab} Fragment nur eine einzelne Antigenbindungsstelle enthält, können Antikörper, vermittelt durch die flexible Hinge-Region, mit beiden Bindungsstellen homologe Epitope eines Antigens binden (34).

1.4.1 Immunglobulin E

Bei der allergischen Soforttyp-Reaktion bindet ein Antigen an die Antigenbindungsstellen zweier auf den Mastzellen gebundener IgEs (siehe Abbildung 2). Während Nichtatopiker einen geringen Anteil an IgE in ihrem Blut haben ($\approx 5 \cdot 10^{-5}$ mg/mL), steigt die Konzentration bei Allergikern stark an (13). IgEs liegen jedoch größtenteils in zellgebundenem Zustand in z.B. den Schleimhäuten vor. Der Mechanismus der Typ I Reaktion und dessen Folgen sind bereits in Kapitel 1.1.1 ausführlich erklärt.

IgE hat ein MG von ca. 200 kDa und insgesamt zwölf Kohlenhydratseitenketten. Das Molekül weist die bereits oben beschriebene, typische Antikörper-Grundstruktur aus zwei leichten und zwei schweren (ϵ) Polypeptidketten auf. Jedoch besitzt IgE in der ϵ -Kette eine zusätzliche Domäne im Vergleich zur γ -Kette des IgG Moleküls (siehe Abbildung 4).

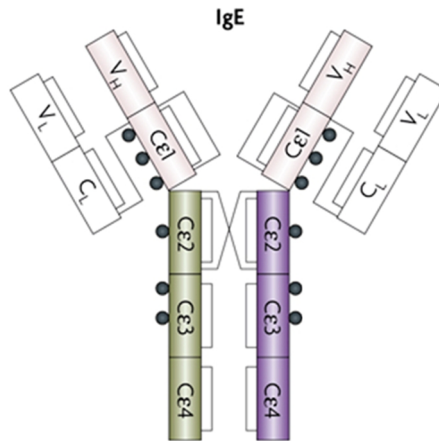


Abbildung 4: Schematische Darstellung der IgE-Domänen. Die leichte Kette besteht aus zwei homologen Domänen und die schweren Ketten aus jeweils fünf Immunglobulindomänen. Das Molekül besitzt 12 Kohlenhydratseitenketten (gekennzeichnet mit einem Punkt) und 16 Intra- und vier Inter-Domänen Disulfidbrücken (gekennzeichnet mit Linien) [entnommen aus (43)].

Der hoch affine $Fc\epsilon$ Rezeptor ($Fc\epsilon R1$) ist unter anderem an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten lokalisiert und bindet die $C\epsilon 3$ Domänen des Fc Fragments mit hoher Affinität ($K_a \approx 10^{10} M^{-1}$) (43). Die Fähigkeit, den hoch affinen $Fc\epsilon R1$ zu binden, ist die maßgeblichste Eigenschaft der IgE-Antikörper, eine Soforttyp-Reaktion auszulösen (44).

1.4.2 Immunglobulin G der Subklasse 4

Immunglobulin G (IgG) ist mit 10-20 % eines der häufigsten Proteine in humanem Plasma (45) mit folgender Subklassen-Verteilung im menschlichen Serum: 70 % IgG1, 20 % IgG2, 6 % IgG3 und 4 % IgG4 (6). Die Aminosäuresequenzen zeigen eine 90 %ige Übereinstimmung zwischen allen vier Subklassen, wobei die Unterschiede liegen in der Hinge-Region und den N-terminalen Bereich der CH_2 Domänen der konstanten Region. Da diese Regionen bei der Bindung an IgG-Rezeptoren ($Fc\gamma R$, siehe Kapitel 1.5.1) sowie C1q beteiligt sind, besitzen die verschiedenen Subklassen unterschiedliche Einflüsse auf Phagozytose, Ausschüttung von Antikörper-abhängigen Zellmediatoren und die Aktivierung des Komplementsystems (45). Beispielsweise besitzt IgG3 die stärkste Bindung zu C1q, einer Komponente des C1 Komplexes der Komplementaktivierung (46), gefolgt von IgG1 und IgG2, wobei IgG4 keinen Einfluss auf die

Komplementaktivierung hat. IgG1 und IgG3 zeigen eine hohe Affinität zu den meisten Fcγ Rezeptoren (siehe Kapitel 1.5.1).

IgG4-Antikörper weisen die übliche Immunglobulin-domänen-Struktur auf, wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben. Jedoch können „halbe“ IgG4 Moleküle mit anderen „halben“ IgG4 Molekülen zu einem neuen Antikörper rekombinieren. Der Austausch einer H- und L-Kette zweier IgG4-Antikörper hat einen neuen Antikörper mit zwei unterschiedlichen Antigenbindungsstellen zur Folge (45). Das unterscheidet IgG4 drastisch von allen anderen Antikörperklassen und Subklassen, die alle zwei identische Antigenbindungsstellen aufweisen und nach der Sekretion von Plasmazellen ihre Struktur beibehalten (47).

Die Basis für den Austausch einer H- und L-Kette zwischen zwei IgG4 Proteinen ist ein Aminosäureaustausch in der Hinge-Region. Im Gegensatz zum IgG1 ist in der Hinge-Region des IgG4s ein Prolin durch ein Serin ersetzt. Dieser Austausch führt zu einer zusätzlichen intra-molekularen Disulfidbrücke sowie ein zweiter Austausch eine negative Beeinflussung der Interaktion der beiden CH₃ Domänen bedingt. Durch die stabilisierende, zusätzliche intra-Ketten-Verbindung und die schwächere CH₃ inter-Ketten Interaktion wird der Kettenaustausch begünstigt (45). Aalberse und Schuurman postulieren, dass diese Reaktion durch eine Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) katalysiert wird, deren Epitop der IgG4 Hinge-Region ähnelt. PDI ist auf der Oberfläche von Thrombozyten, Endothelzellen, B- und T- Zellen lokalisiert (47). Der aus der Rekombination resultierende, bi-spezifische Antikörper ist nicht in der Lage große Immunkomplexe aufgrund von Antigen-Crosslinking zu bilden. Daher besitzen IgG4-Antikörper ein niedrigeres Potenzial, Immunreaktionen gegen ein bestimmtes Antigen hervorzurufen.

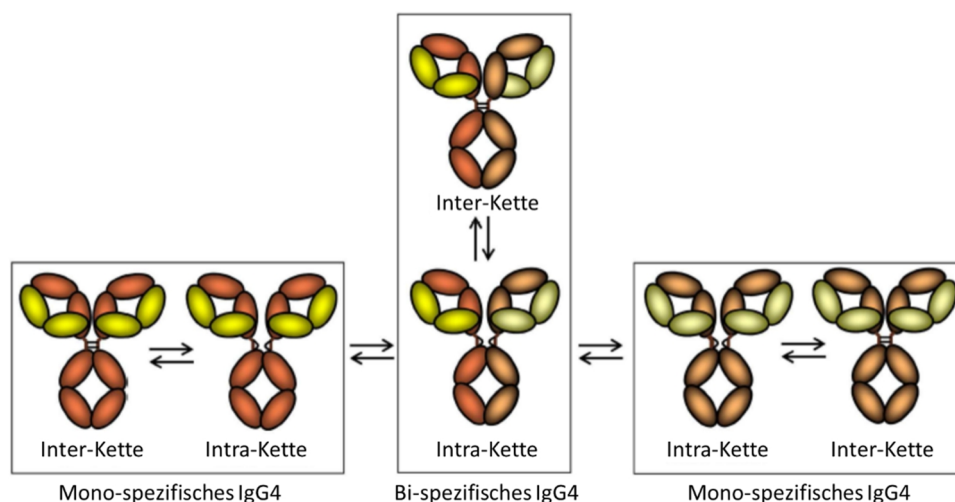


Abbildung 5: IgG4 Isomere als mono- und bi-spezifische Antikörper. Nach B-Zellsekretion sind die mono-spezifischen IgG4 Antikörper über eine inter- und eine intra-molekulare-Disulfidbrücke verbunden. Die reduzierte Isoform weist lediglich die Intra-Disulfidbrücke auf. Diese kann sich entweder zu der ursprünglichen, nicht-reduzierten Form zurückbilden oder einen Kettenaustausch mit einem anderen IgG4 Molekül eingehen, resultierend in einem bi-spezifischen Antikörper [entnommen aus (45)].

Die Bindung von Allergenen nach einer SIT, ohne Reaktionen des Immunsystems zu verursachen, verleiht dem sIgG4 die Bezeichnung „blockierender Antikörper“. Neben den bi-spezifischen IgG4-Antikörpern, liegen auch mono-spezifische Antikörper vor (siehe Abbildung 5). Die nach B-Zellsekretion nicht veränderten Antikörper sind über zwei Disulfidbrücken, einer inter- und einer intra-molekularen-Verbindung in der Hinge-Region, verbunden. Dieses Molekül steht im Gleichgewicht mit der reduzierten Isoform, welche lediglich die Intra-Disulfidbrücke aufweist. Die reduzierte Form kann sich entweder zu der ursprünglichen, nicht-reduzierten Form zurückbilden oder einen Kettenaustausch mit einem anderen IgG4 Molekül eingehen, resultierend in einem bi-spezifischen Antikörper (45). Diese Reaktionen laufen ausschließlich *in vivo* ab (29). Vidarsson und Kollegen zeigten, dass im menschlichen Immunsystem die meisten IgG4 Moleküle als monovalente, bi-spezifische Antikörper vorliegen (45).

1.4.3 Autoantikörper

Der Nachweis von spezifischen Autoantikörpern kann die Diagnose von unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen unterstützen. Zusätzlich dient die Überprüfung von Antikörperkonzentrationen im Serum als Verlaufskontrolle bei bereits diagnostizierten Patienten (7).

Bei Autoantikörpern handelt es sich, abhängig von der Erkrankung, um Antikörper der Klasse G, A oder M (10), wobei IgGs die höchste Prävalenz in Seren von Autoimmunpatienten zeigen (48). Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Identifizierung der an Autoimmunerkrankungen beteiligten IgG Subklassen (49, 50). In einer Studie über die IgG Subklassen-Verteilung in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten alle vier Subklassen nachgewiesen werden. Bei 72 Patienten mit RA (45 gesunde Probanden) wurde die Signifikanz jeder Subklasse ermittelt. Im Vergleich mit den anderen Subklassen zeigen IgG1 Autoantikörper die höchste Konzentration in Seren von RA Patienten. Die Konzentrationsunterschiede zwischen Patienten mit aktivem Schub und Remission sind hingegen für keine Subklasse signifikant (50). In einer weiteren Studie wurde die IgG Subklassen-Verteilung in verschiedenen Autoimmunerkrankungen untersucht. Es wurden insgesamt Seren von 363 Patienten mit Sjögren-Syndrom, systemischer Sklerodermie, SLE oder primärer biliärer Zirrhose und 40 gesunde Probanden untersucht. Auch in dieser Studie wurde IgG1 als Subklasse mit der besten Differenzierung zwischen gesunden Patienten und Autoimmunpatienten nachgewiesen (49).

1.5 Fc Rezeptoren

Zwei Klassen von humanen Rezeptoren, die Immunglobuline über ihre Fc Region binden, spielen eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr. Eine Klasse transportiert Igs durch das Epithel zu dem Ort der Reaktion im Körper. Dazu zählen unter anderem der neonatale Fc Rezeptor (FcRn), der IgG transportiert, und der polymere Fc Rezeptor (pIgR), der IgA und IgM zu ihrem Bestimmungsort befördert. Die zweite Klasse von Rezeptoren, präsentiert auf der Oberfläche von Effektor-Zellen, löst aufgrund der Bindung von Antikörper-Antigen Komplexen verschiedene Immunantworten aus. IgG und IgE bindende (Fc γ und Fc ϵ) Rezeptoren sind die von dieser Klasse am besten charakterisierten Rezeptoren (51).

Im menschlichen Immunsystem existieren verschiedene Fc γ Rezeptoren (Fc γ R), die das konstante Fragment verschiedener IgG Subklassen mit unterschiedlicher Affinität binden (52). Bei Fc γ Rs handelt es sich um transmembranständige Glykoproteine mit extrazellulären sowie cytoplasmatischen Regionen. IgG-Antikörper werden über die extrazellulären Domänen (ECD, Extracellular domain), welche einen hohen Grad an Sequenzübereinstimmungen zwischen den Rezeptoren zeigen, gebunden. Die signifikanten Abweichungen im cytoplasmatischen Bereich sorgen für unterschiedliche Funktionen der Rezeptoren, wie z.B. aktivierende oder inhibierende Effekte (53). Aktivierende Rezeptoren tragen ein ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) in ihrer Sequenz (Fc γ RI, Fc γ RIIA und Fc γ RIIC und Fc γ RIIIA), der inhibierende Fc γ RIIB Rezeptor weist ein ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) in der cytoplasmatischen Region auf (54). Fc γ Rs sind des Weiteren an der Phagozytose, der Antigen-Präsentation, der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen als auch an der Antikörper-abhängigen, zellulär-vermittelten Zytotoxizität (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) beteiligt (52).

1.5.1 Fc γ Rezeptor I

Der Fc γ RI (CD64, *Cluster of Differentiation 64*) besteht im Gegensatz zu allen anderen FcRs, die zwei Domänen aufweisen, aus drei ECDs (D1 - D3) mit insgesamt sechs Glykosylierungen. Der Fc γ RI bindet mit seiner D1 und D2 Domäne, analog zu den restlichen Fc γ Rezeptoren, die konstante Region der IgG-Antikörper (siehe Abbildung 6). Die einzigartige dritte ECD im Fc γ RI interagiert nicht direkt mit der IgG-Fc Region, begünstigt aber vermutlich die Rezeptor-Konformation und -Stabilität (55).

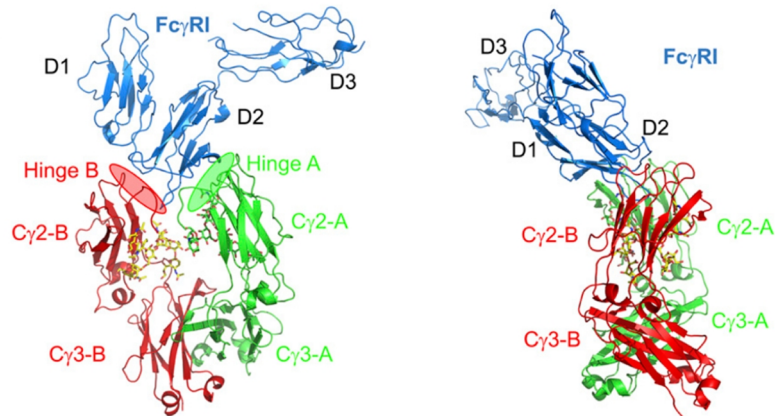


Abbildung 6: Struktur des Fc γ RI / IgG1 Fc Komplex in zwei orthogonalen Ansichten. Der Fc γ RI ist in blau und die IgG1 Fc Regionen sind in grün (Kette A) und in rot (Kette B) dargestellt. Die Hinge-Regionen beider Ketten sind jeweils in grün und rot schattiert. Die Kohlenhydratseitenketten der Kette A und B der Fc Regionen (Asn-297) sind gelb gekennzeichnet. [entnommen aus (55)].

Die Hinge-Regionen zwischen D1 und D2 weist einen Winkel von 35° auf, wobei der Winkel zwischen den Domänen bei niedriger affinen Fc γ Rs deutlich größer ist und von 55° bis 60° reicht. Der signifikant kleinere Winkel bei Fc γ RI wird durch extensive Interaktionen zwischen beiden Domänen stabilisiert. Dazu zählen Salzbrücken, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen. Einen ähnlich kleinen Abstand zwischen zwei Domänen zeigt auch der hochaffine Fc ϵ RI (39°), dessen strukturelle Homologie zu dem Fc γ RI zudem durch drei konservierte Aminosäuren (AS) in den Hinge-Regionen bekräftigt wird (56).

Es ist bekannt, dass der FG-loop der D2 Domäne des Fc ϵ RI sowie des Fc γ RIII für die Bindung an Fc Regionen verantwortlich ist. Wird die FG-loop-Sequenz des Fc γ RII Rezeptors durch den FG-loop des Fc ϵ RI ausgetauscht, resultiert der mutierte IgG Rezeptor zu einem IgE bindenden Rezeptor. Vergleicht man die Sequenzen der FG-loops der D2 Domänen aller Fc γ Rs, wird deutlich, dass lediglich der hochaffine Fc γ RI eine AS weniger aufweist ($^{171}\text{MGKHRY}^{176}$, siehe Abbildung 7). Lu *et al.* untersuchten diesen Bereich dahingehend, die ausschlaggebende Sequenz für die höher affine Bindung zwischen IgG und dem Fc γ RI im Vergleich zu den übrigen Fc γ Rs zu identifizieren. Sie mutierten unter anderem den FG-loop in der D2 Domäne des Fc γ RIII entsprechend der Sequenz des hoch-affinen Rezeptors. Dieser Austausch resultierte in einer 15-fach erhöhten Bindungsaffinität des mutierten Fc γ RIII Rezeptors zu IgG1 im Vergleich zu dem Wildtyp Fc γ RIII Rezeptor. Die Affinität des Fc γ RI zu dem humanen IgG1 ist dennoch 5-fach höher gegenüber der mutierten Variante. Dieser Austausch verdeutlicht die Relevanz dieser Sequenz an der IgG Bindung, da lediglich vier von insgesamt 14 potenziellen Bindungsstellen durch diese Mutation verändert wurden (siehe Abbildung 7) (56).

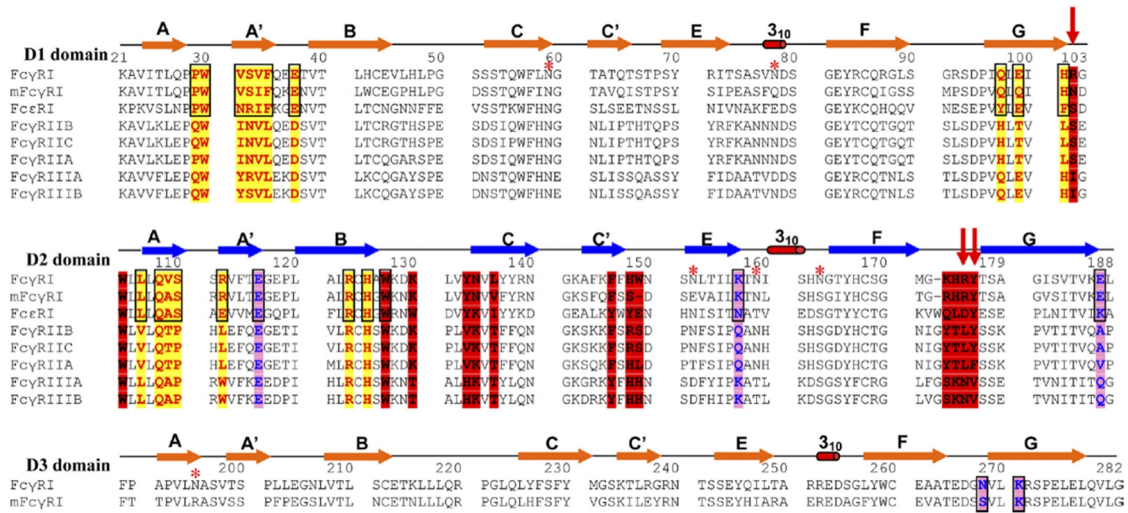


Abbildung 7: Sequenzvergleich der ECDs der Fcγ Rezeptoren und FcεRI. Die Sekundärstruktur ist oberhalb der Sequenzen abgebildet (Pfeile: β-Faltblatt, Zylinder: α-Helices). Glykosylierte AS sind durch * gekennzeichnet. An der D1 - D2 Verbindung beteiligte Bereiche sind in Gelb und an der D2 - D3 Verbindung beteiligte Bereiche in violett dargestellt. Konservierte Bereiche zwischen FcγRI und FcεRI sind durch eine schwarze Box markiert. Sequenzen, die an der Fc-Immunglobulin Bindung beteiligt sind, sind rot hinterlegt [entnommen aus (56)].

Aufgrund von homologen Sequenzen können auch IgG-Antikörper anderer Spezies von humanen Fc Rezeptoren gebunden werden (57). Kaninchen beispielsweise besitzen nur eine IgG Subklasse, deren Fc Region zu 69 % mit der Fc Region von humanem IgG1 übereinstimmt.

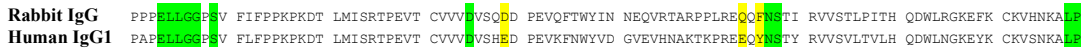


Abbildung 8: Vergleich der FcγRs bindenden Bereiche in humanem IgG1 und rabbit IgG. Homologe Bereiche, die an der Bindung involviert sind, sind in Grün und abweichende AS in Gelb dargestellt.

Auch die relevanten Sequenzen zur Interaktion mit FcγRs zeigen zwischen humanem IgG1 und leporidem IgG deutliche Homologien. Diese übereinstimmenden und abweichenden Bereiche sind in Abbildung 8 dargestellt (53).

2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung, Herstellung und Evaluierung artifizieller humaner Seren (ARTHUS), die für die Entwicklung und Standardisierung diagnostischer Testsysteme in der *in vitro* Allergie- und Autoimmun-Diagnostik genutzt werden können. Grundansatz dabei ist die Verknüpfung von spezifischen, tierischen Antikörpern und entsprechenden rekombinanten Adapter-Molekülen, die geeignet sind, mit den spezifischen Antikörpern stabile Interaktionen einzugehen.

Zur Gewinnung von antigenspezifischen Immunglobulinen sollen rekombinant hergestellte oder nativ aufgereinigte Allergene und ein dsDNA Plasmid, welches als Marker-Antigen für den *Lupus erythematoses* gilt, sowie Allergenextrakte für Hühner- und Kaninchen-Immunisierungen eingesetzt werden. Diese tierischen Immunglobuline sollen in Kombination mit Adapter-Molekülen, die aus einer Immunglobulin-bindenden Struktur und einer Immunglobulin-Domäne bestehen, in kommerziellen *in vitro* Methoden analysiert und auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Ziel ist zu analysieren, ob die hergestellten artifiziellen humanen Seren zu einer verbesserten Standardisierung diagnostischer Testsysteme beitragen können.

3 Material

3.1 Chemikalien, Antigene und immunologische Reagenzien

Tabelle 3: Übersicht der Chemikalien

Name	Abkürzung / Strukturformel	Hersteller / Lieferant	Artikelnummer
2(β)-Mercaptoethanol (zur Synthese)	-	Merck Millipore	8.05740.0005
4-Chlormercuribenzoessäure	PCMB	Sigma-Aldrich	55540-5G
Agarose	-	Biozym	840000
Ampicillin Natriumsalz [≥ 97 %]	Amp	Carl Roth	K029.1
Betain Lösung 5 M, PCR Reagent	-	Sigma-Aldrich	B0300
Bovines serum albumin [99 %]	BSA	Sigma-Aldrich	A3059
Bovines serum albumin, 10 mg/mL (100x) [Molecular Biology Grade]	BSA	New England Biolabs	B9001S
Coomassie Brillant Blue G-250	-	Serva	35051
Cycle-Pure Kit (classic line)	-	VWR	732-2864
D(+)-Glucose [≥ 99,5 %]	-	Carl Roth	HN06.1
dCTP Lösung (100 mM)	-	ThermoFisher Scientific	R0151
Diethanolamin [pA]	-	Merck Millipore	1.16205.1000
Dimethylsulfoxid, steril-filtriert [≥ 99,7 %]	DMSO	Sigma Aldrich	D2650
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat [pA]	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck Millipore	1.06580.5000
DMEM, high glucose, GlutaMAX™, pyruvate	DMEM	ThermoFisher Scientific	31966
DNA Marker (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use)	-	ThermoFisher Scientific	SM1333
dNTP Mix (jeweils 2 mM)	-	ThermoFisher Scientific	R0242
DpnI, FastDigest	-	ThermoFisher Scientific	FD1703
EcoRV, FastDigest	-	ThermoFisher Scientific	FD0304
Essigsäure [pA]	-	Merck Millipore	1.00063.1000
Ethanol [99,8 %]	EtOH	Carl Roth	K928.5
Ethylendiamintetraessigsäure [> 99 %]	EDTA	Sigma-Aldrich	EDS
Fast Digest Puffer (10x)	-	ThermoFisher Scientific	B64
Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated	FKS	ThermoFisher Scientific	10500064
Gel Extraction Kit (classic line)	-	VWR	732-2776
GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (10000x)	-	Lonza	50535
Glycin [analytical grade]	-	Serva	23390
Hemocyanin aus <i>Limulus polyphemus</i> [≥ 85 %]	LPH	Sigma-Aldrich	H1757
Humanes Serumalbumin [≥ 97 %]	HSA	Sigma-Aldrich	A9511
Imidazol [≥ 99,5 %]	-	Applichem	A3635
Isopropanol [≥ 99,5 %]	-	Merck Millipore	100995
Jetpei	-	Polyplus	101-01N

Material

Laemmli Sample Buffer	-	Biorad	161-0737
LB-Agar	-	ThermoFisher Scientific	22700025
LB-Medium	-	ThermoFisher Scientific	12780052
Lipofectamine® LTX, Plus™ Reagenz	-	ThermoFisher Scientific	15338030
Lithiumchlorid [≥ 99 %]	LiCl	Carl Roth	3739.1
Magnesiumchlorid, 50 mM, [Molecular Biology Grade]1	MgCl ₂	ThermoFisher Scientific	F-510MG
Meliseptol®, New Formula	-	Braun	19758
Methanol [≥ 99,8 %]	-	Merck Millipore	1.06009.2511
Milli-Q H ₂ O	ddH ₂ O	Millipore	-
Natriumacetat [> 98,5 %]	C ₂ H ₃ NaO ₂	Carl Roth	X891.1
Natriumazid [reinst]	NaN ₃	Merck Millipore	1.06688
Natriumchlorid [> 99,5 %]	NaCl	Merck Millipore	1.06400.5000
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat [pA]	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Merck Millipore	1.06345.5000
Natriumdodecylsulfat (analytical grade)	SDS	Serva	20763
Natriumhydrogencarbonat [pA]	NaHCO ₃	Merck Millipore	1.06329.5000
Natriumhydroxid pellets [pA]	NaOH	Sigma-Aldrich	30620
Orange DNA Loading Dye (6X)	-	ThermoFisher Scientific	R0631
pcDNA™3.1/Zeo ⁽⁺⁾ Mammalian Expression Vector	pcDNA™3.1/Zeo	ThermoFisher Scientific	V86020
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Pen/Strep	ThermoFisher Scientific	15140122
Phosphate buffered saline tablets	PBS	Medikago	09-9400-100
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (2x)	-	ThermoFisher Scientific	F-548
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	pNPP	Sigma-Aldrich	N9389
Präcipitierendes Tetra-Methyl Benzidin	pTMB	Seramun	TMB_828
Protein Standard, PAGE Ruler prestained	-	ThermoFisher Scientific	26619
Protein Standard, PAGE Ruler unstained	-	ThermoFisher Scientific	26630
Protein Standard, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ prestained	-	BIO-RAD	1610375
Rekombinase A	-	New England Biolabs	M0249S
Ribonuklease A	RNase	Carl Roth	7156.1
Roti-Blot A	-	Carl Roth	L510.1
Roti-Blot K	-	Carl Roth	L511.1
S.O.C. Medium, gebrauchsfertig	SOC	Siehe One Shot® OmniMax™ 2T1 ^R Zellen	
Salzsäure [25 %] (pA)	HCl	Th Geyer	8252511
SfoI	-	ThermoFisher Scientific	ER0441
Silver Staining Kit	-	ThermoFisher Scientific	LC6070
Sucrose	-	Sigma-Aldrich	16104
T4-DNA Ligase Puffer (10x)	-	ThermoFisher Scientific	B69
T4-DNA Polymerase, T4-DNA Polymerase Puffer (10x)	-	New England Biolabs	M02492
Tango Puffer (10x)	-	ThermoFisher Scientific	BY5
Taq Polymerase, Taq Polymerase Puffer (10x)	-	ThermoFisher Scientific	EP0401

Material

Thimerosal [$\geq 97\%$]	-	Sigma-Aldrich	T5125
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	TAE Puffer	AppliChem	A1691
Tris-Base [$\geq 99,9\%$]	Tris	Sigma-Aldrich	T1503
Trypanblau-Lösung	-	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin/EDTA-Lösung	-	Sigma-Aldrich	T4049
Tween 20 (zur Synthese)	-	Merck Millipore	8.22184.2500
Zeocin™ Selection Reagent (100 mg/ml)	-	ThermoFisher Scientific	R250-01

Tabelle 4: Übersicht der Antigene

Name	Hersteller	Artikelnummer
<i>Aspergillus fumigatus</i> Extrakt (m3)	Dr. Fooke Laboratorien	-
Bet v 1 (> 98 % Reinheit)	Biomay	Bet v 1.0101
Birkenextrakt (t3)	Dr. Fooke Laboratorien	-
Cor a 1 (> 98 % Reinheit)	Biomay	Cor a 1.0103
Cor a 11 (> 90 % Reinheit)	Dr. Fooke Laboratorien	-
Cor a 8 (> 90 % Reinheit)	Dr. Fooke Laboratorien	-
Cor a 9 (> 90 % Reinheit)	Dr. Fooke Laboratorien	-
<i>Corylus avellana</i> Extrakt (f17)	Dr. Fooke Laboratorien	-
<i>Dermatophagoides farinae</i> Extrakt (d2)	Dr. Fooke Laboratorien	-
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> Extrakt (d1)	Dr. Fooke Laboratorien	-
dsDNA Plasmid (> 95 % Reinheit)	Diarect	12300
Hev b 5 (> 98 % Reinheit)	Biomay	Hev b 5.0101
Hev b 6 (> 98 % Reinheit)	Biomay	Hev b 6.02
Hev b 7 (> 98 % Reinheit)	Biomay	Hev b7.02
Hev b 8 (> 98 % Reinheit)	Biomay	Hev b 8.0204
<i>Hevea brasiliensis</i> Extrakt (k82)	Dr. Fooke Laboratorien	-
Penicillin G sodium salt (≥ 98 % Reinheit)	Sigma-Aldrich	13752
α -Casein (≥ 70 % Reinheit)	Sigma-Aldrich	C6780
α -Lactalbumin (≥ 85 % Reinheit)	Sigma-Aldrich	L5385
β -Casein (≥ 98 % Reinheit)	Sigma-Aldrich	C6905
β -Lactoglobulin (≥ 90 % Reinheit)	Sigma-Aldrich	L3908
κ -Casein (≥ 70 % Reinheit)	Sigma-Aldrich	C0406

Tabelle 5: Übersicht der immunologischen Reagenzien

Name	Hersteller	Artikelnummer
ALFA Basis Set	Dr. Fooke Laboratorien	1800010
CHIR-IgE Fc	PLS Design	-
Bovine IgG	Sigma-Aldrich	I5506
Chicken anti-soy IgY	Gallus immunotech inc.	AsoyP
Chicken IgY	Universität Aarhus	-
Conj/HRP/Strep	Dr. Fooke Laboratorien	-
Donkey Anti-Goat IgG	Jackson Immunoresearch	705-001-003
dsDNA ELISA	Dr. Fooke Laboratorien	25005
Goat anti-human IgE (Epsilon) HRP	KPL	074-1004
Goat anti-human IgE AP	Sigma-Aldrich	A3525
Goat anti-human IgG HRP	KPL	474-1002
Goat anti-rabbit IgG HRP	KPL	214-1516
Human IgA	Sigma-Aldrich	I4036
Human IgG	Sigma-Aldrich	I4506
Human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4	Universität Aarhus	-
Human IgM	Sigma-Aldrich	I8260
Mouse IgGsa Anti-ds DNA	Abcam	ab27156
Mouse IgA	SouthernBiotech	0106-01
Mouse IgE	BD Biosciences	557079
Mouse IgG1	SouthernBiotech	0102-01
Mouse IgG2a	SouthernBiotech	0103-01
Mouse IgG2b	SouthernBiotech	0104-01
Mouse IgG3	SouthernBiotech	0105-01
Mouse IgM	SouthernBiotech	0101-01
Mouse-anti-6x-His Epitope Tag Antibody, HRP	ThermoFisher Scientific	MA1-21315-HRP
Rabbit anti-chicken IgY HRP	Sigma-Aldrich	A9046
Rabbit anti-human IgG HRP	Jackson Immunoresearch	309-035-003
Rabbit IgG	Sigma-Aldrich	I5006
Referenzsatz für den spezifischen IgE REAST	Dr. Fooke Laboratorien	07050FL
Sheep IgG	Biomedicals	0859722
Spezifischer IgG - ELISA	Dr. Fooke Laboratorien	10100PG
Spezifischer IgG4-ELISA	Dr. Fooke Laboratorien	10104PG
Spezifisches IgE REAST Kit	Dr. Fooke Laboratorien	0520960FL
Total-IgE-HRP EIA	Dr. Fooke Laboratorien	08102CP

3.2 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 6: Verwendeter Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Quelle
One Shot® OmniMax™ 2T1 ^R	F' {proAB lacIq lacΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) Φ80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD	ThermoFisher Scientific

Tabelle 7: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	ATCC Bezeichnung	Quelle
HEK293	ATCC® CRL-1573™	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

3.3 Puffer, Gele und Lösungen

Tabelle 8: Zusammensetzung von Puffern, Lösungen, Medien und Gelen

Anwendung	Bezeichnung Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
Allgemein	PBS, aus PBS Tablette	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄	140 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM	pH 7,4 Steril filtriert
	PBS mit NaN ₃	PBS NaN ₃	1x, siehe oben 0,05 % (w/v)	pH 7,4 Steril filtriert
	Ampicillin Stammlösung	Ampicillin	100 mg/mL	1000x
Agarose-Gelelektrophorese	TAE Stammlösung (50x)	Tris-HCl Essigsäure EDTA	2 M 1 M 50 mM	pH 8,5 ± 0,2
	Agarose-Gel	Agarose GelStar™	0,8 - 1,5 % (w/v) 0,1 % (v/v)	Verdünt in 1x TAE Puffer
Kopplung von Proteinen an HiTrap™ NHS-activated HP Säule	Waschpuffer A	Diethanolamin NaCl	0,25 M 0,5 M	pH 8,3 Steril filtriert
	Waschpuffer B	C ₂ H ₃ NaO ₂ NaCl	0,1 M 0,5 M	pH 4,0 Steril filtriert
	Kopplungspuffer	NaHCO ₃ NaCl	0,2 M 0,5 M	pH 8,3 Steril filtriert
	Elutionspuffer	Glycin	0,1 M	pH 2,5 Steril filtriert
Aufreinigung von allergenspezifischen Kaninchen Antikörpern	Waschpuffer	PBS BSA	Siehe PBS 0,001 % (w/v)	pH 7,4 Steril filtriert
	Elutionspuffer	Glycin	100 mM	pH 2,5 Steril filtriert
	Neutralisierungspuffer	Tris	1 M	pH > 10 Steril filtriert
IMAC	Waschpuffer	PBS NaCl	1x 500 mM	pH 8,0 Steril filtriert
	Elutionspuffer	PBS NaCl Imidazol	1x 100 mM 300 mM	pH 8,0 Steril filtriert
Gelfiltrations-chromatographie	Gelfiltrationspuffer	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O NaCl	50 mM 300 mM	pH 7,2 Steril filtriert
<i>E. coli</i> Kultivierung	LB-Ampicillin Medium	LB-Medium Ampicillin	20 g/L 100 µg/mL	-

Kultivierung von HEK293-Zellen	Kultivierungs-medium HEK293-Zellen	DMEM FKS Pen/Strep	89 % (v/v) 10 % (v/v) 1 % (v/v)	-
Plasmid Isolation	Puffer 1	Tris-HCl EDTA Glucose RNAse	25 mM 10 mM 50 mM 200 µg/mL	pH 8,0
	Puffer 2	NaOH SDS	0,2 M 1 %	-
	Puffer 3	C ₂ H ₃ NaO ₂	3 M	pH 4,8 - 5,2
	Puffer 4	LiCl	5 M	-
Transformation von <i>E. coli</i>	LB-Ampicillin Agarplatten	LB-Agar Ampicillin	20 g/L 100 µg/mL	-
Bestimmung Zellzahl und Vitalität von HEK293-Zellen	Trypanblaulösung	Trypanblau NaCl	0,5 % (w/v) 0,9 % (w/v)	In PBS
Kopplung von Penicilloyl G an Proteine	Carbonatpuffer	NaHCO ₃	0,1 M	pH 8,4
	PCMB Lösung	PCMB NaOH	0,54 g/100mL 0,1 M	In PBS
Beschichtung von Mikrotiterplatten	Waschpuffer	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl Tween 20 Thimerosal	4 mM 1 mM 20 mM 0,05 % (w/v) 0,0015 % (w/v)	pH 6,8
	Nachbeschichtungs-lösung	Sucrose NaCl BSA	58 mM 154 mM 1,0 % (w/v)	pH 6,8
SDS-PAGE	Laufpuffer	Tris-HCl Glycin SDS	25 mM 200 mM 0,1 % (w/v)	pH 8,3
Coomassie Blau-Färbung	Färbelösung	Coomassie Brillant Blue G-250 Isopropanol Essigsäure	0,25 % (w/v) 25 % (v/v) 10 % (v/v)	-
	Entfärberlösung	Essigsäure Ethanol	10 % (v/v) 45 % (v/v)	-
Immunoblot und Dot Blot	TBST	Tris-HCl NaCl Tween 20	50 mM 150 mM 0,1 % (w/v)	pH 7,3
	Blockierungslösung	TBST BSA	1x, siehe oben 5 % (w/v)	pH 7,3
Nachweis von Antikörper-Interaktionen mit FcγRI	Waschpuffer	Siehe Beschichtung von Mikrotiterplatten		

3.4 Expressionsvektoren und Oligonukleotide

Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde der Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo von Invitrogen verwendet. Dieser Shuttlevektor besitzt einerseits die Elemente, die für die Vermehrung in Bakterien nötig sind (bakterieller Replikationsstart (Ori) und Resistenzgen (Ampicillin)) und andererseits einen eukaryotischen Promotor für die Expression in Säugerzellen (58). Zur Selektion von transfizierten HEK293-Zellen enthält das Plasmid zusätzlich ein Zeocin Resistenzgen (siehe Abbildung 9).

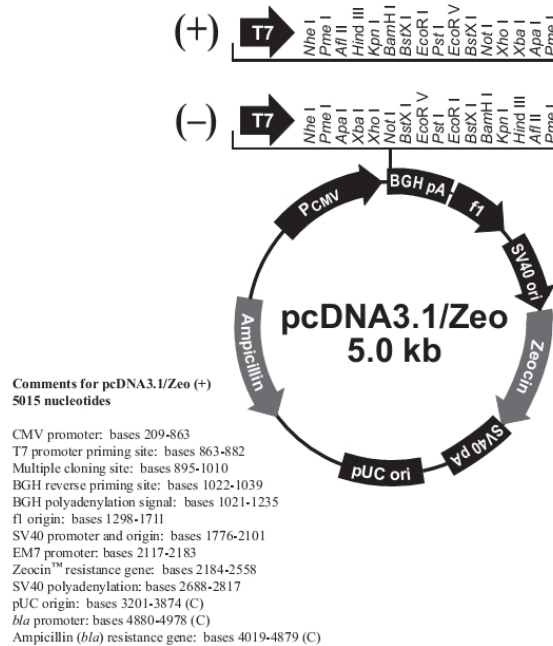


Abbildung 9: Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo von Invitrogen

Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis

In den Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo wurde eine Signalsequenz, eine Restriktionsschnittstelle, die der ursprüngliche Vektor nicht enthält, eine Sequenz, die für einen 4er Polyhistidin-Tag kodiert, und ein Stopcodon kloniert. Anhand der neuen Schnittstelle zwischen Signalsequenz und His-Tag-Sequenz wurden alle Zielsequenzen in den pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis kloniert (Klonierung siehe Kapitel 4.2.1).

Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis

Der Shuttlevektor pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis unterscheidet sich vom pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis dadurch, dass dieser Vektor eine Sequenz besitzt, die für 6 Histidine kodiert (Klonierung siehe Kapitel 4.2.1).

pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_CD64-IgE Fc

Die DNA-Sequenz des CD64-IgE Fc Moleküls wurde, bereits kloniert in den Shuttle Vektor pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis, von der Universität Hamburg bereitgestellt. Der Vektor beinhaltet die DNA-Sequenzen, die für die ECD des humanen FcγRI Rezeptors (CD64), für einen Peptidlinker und für die humane IgE Fc Region (CH₂-CH₄) codieren.


```

atggaattggggctgagctgggttttccttgttgctatatatttaaatgtgtccagtg
caagtggaaccacaaaggcagtgatcactttgacgctccatgggtcagcgtgttccaagaggaaccgtaacctgactgtga
ggtgctccatctgctgggacgctctacacagtggtttctcaatggcagccactcagacctcagccccagctacagaatca
cctctgccagtgcaatgacagtggtgaatacaggtgccagagaggtctctcagggcgaagtgacccatacagctggaaatccac
agaggctggctactactgaggtctccagcagagctcttcacggaaggagaacctctggccttgagggtgcatgctggaaggataa
gctggtgtacaatgtgcttactatcgaaatggcaaacgctttaaagttttccactggaattctaacctcaccattctgaaacca
acataagtcacaaaggcacctaccattgctcaggtatgggaaagcatcgctacacatcagcaggaatatctgtcactgtgaaagag
ctatttccagctccagtgctgaatgcatctgtgacatccccactcctggaggggaatctggtcacctgagctgtgaaacaaagt
gctcttgacagaggcctggtttgacgctttacttctccttctacatgggcagcaagacctcgcgagcaggaacacatcctctgaat
accaatactaactgctagaagagaagactctgggttatactggtgagcaggtgccacagaggatggaatgtccttaagcgcagc
cctgagttggagcttcaagtgttggcctccagttaccaactcctgtctggtttcat
ggaggcgggtcaggcgcg
cccacgtgaagatcttacagtcgtcctgcgacggcggcggcacttcccccgacatccagctcctgtgctctctctgggta
caccacaggactatcaacatcacctggctggaggacggcaggtcatggacgtggacttgtccacgcctctaccacgcaggagg
gtgagctccctccacacaaagcagctcacctcagccagaagcactggtgtcagaccgcacctacacctgccaggtcacctat
caaggtcacacctttgaggtcagcaccaagaagtgtgagattccaaccgagaggggtgagcctacctaagccggccagccc
gttcgacctgttcatccgcaagtcgcccacgatcacctgtctggtggtggacctggcaccagcaaggggaccgtgacctgacct
ggtcccggccagtgggaaagccctgaaccactccaccagaaaggaggagaagcagcgaatggcaggttaacctgacctccacc
ctgcccgtggcaccggagactggatcgagggggagacctaccagtcaggtgacccacccccactgcccagggccctcatgcg
gtccacgacaagaccagcggcccgcgtgctgcccggaaagtctatgcttggcagcggagtgcccggggagccgggacaagc
gcacctcgcctgctgatccagaacttcatgcctgaggacatctcgggtcagtggtgcaacaagaggtgagctcccggacgcc
cggcacagcagcagcagccccgcaagaccaaggctccggcttctcgtctcagccgctggaggtgacagggccggaatggga
gcagaaagatgagttcatctgcccgtgcagtcctatgaggcagcggacccctcagaccgtccagcagcgggtgtctgtaaatccc
gtaaa
catcaccaccat
tga

```

Abbildung 10: DNA-Sequenz des CD64-IgE Fc Fragments mit Stopcodon. Übersetzt aus der AS Sequenz aus Tabelle 9 und Codon Usage optimiert für HEK293-Zellen. Die erste Base eines neuen Fragments ist fett geschrieben.

Die Aminosäuresequenz dieses Adapter-Moleküls sowie das MG der einzelnen Fragmente ist in Tabelle 9 beschrieben. Insgesamt weist das Protein theoretisch ein MG von 67,3 kDa auf.

Tabelle 9: Aminosäuresequenz und MG der einzelnen Fragmente des CD64-IgE Fc Moleküls.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Anzahl der AS	Theoretisches MG (kDa)
Signalsequenz	MELGLSWVFLVAIFKCVQC	19	2,19
CD64, ECD	QVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPSSST QWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRS DPIQLEIHRGWLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLV YNVLYRNGKAFKFFHWNNSLILKTNISHNGTYHCSGM GKHRYTSAGISVTVKELFPAPVNLNASVTSPLLEGNLVTL SCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILT ARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTP VWFH	277	31,19
Peptidlinker	GGGSGA	6	0,40
Human IgE Fc (CH₂-CH₄)	PTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWL EDGQVMDVDLSTASTQEDELASTQSELTLSQKHWLSDR TYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSNPRGVSAYLSRPSFFD LFIRKSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWRSRSGKPVNHST RKEEKQRNGTLTVTSTLPGVTRDWIEGETYQCRVTHPHL PRALMRSTTKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLAC LIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGF FVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVS VNPVK	317	35,18
His-Tag (4 Histidine)	HHHH	4	0,57

pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_IgE Fc

Die DNA-Sequenz, die für die humane IgE Fc Region (CH₂ - CH₄ Domänen) codiert, wurde aus dem CD64-IgE Fc Konstrukt amplifiziert (siehe Abbildung 10) und in den Vektor pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis kloniert.

Die humane IgE Fc Region besteht aus 317 AS und weist ein theoretisches MG von 35,2 kDa auf (siehe Tabelle 9). Zudem enthalten die CH₂ - CH₄ Domänen drei Intra- und zwei Inter-Domänen Disulfidbrücken sowie drei Glykosylierungen (siehe Abbildung 4).

pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_ECD FcγRI

Die DNA-Sequenz, die für die ECD des humanen FcγRI Rezeptors (CD64) codiert, wurde zusammen mit dem Peptidlinker aus dem CD64-IgE Fc Konstrukt amplifiziert (siehe Abbildung 10) und in den Vektor pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis kloniert.

Die humane ECD des humanen FcγRI Rezeptors besteht aus 277 AS und weist zusammen mit dem Peptidlinker ein theoretisches MG von 31,6 kDa auf (siehe Tabelle 9). Zudem enthält dieser Bereich des CD64 Rezeptors drei Intra-Domänen Disulfidbrücken sowie sechs Glykosylierungen (siehe Abbildung 7).

pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_IgG1 Fc

Die DNA-Sequenz, die für die humane IgG1 Fc Region (CH₁ - CH₃ Domänen) codiert, wurde bei Eurofins Genomics bestellt und in den pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis kloniert.

```
GCCTCAACCAAGGACCAAGCGTGTTCCTCCCTGGCTCCCTCTAGCAAGTCCACATCAGGCGGGACTGCGGCTTTGGGTTGTCTCGT
AAAGGACTATTTCCCGGAACCTGTGACAGTGAGTTGGAATAGCGGTGCACTGACATCTGGAGTGACACATTTCCAGCCGTCTTGC
AGAGCTCTGGACTGTACAGCCTGTCTCAGTGGTTACTGTGCCCCCTCCAGTCTGGGCACTCAGACCTACATCTGCAATGTGAAC
CATAAGCCCTCCAACACTAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCCTGTGACAAAACCCACACTTGCCCTCCTTGTCCAGCTCC
CGAACTTCTGGGAGGACCCCTCTGTGTTCCCTCTTCCCTCCCAACCCAAGGACACACTGATGATATCACGGACTCCAGAGGTCACCT
GTGTTGTGGTTCGATGTGTCCCATGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTAGATGGCGTTGAAGTCCATAACGCCAAAACG
AAGCTCGAGAGGAGCAGTACAACAGTACATATCGCGTAGTTAGCGTTTTGACCGTCCCTTACCAGGATTGGCTCAATGGGAAAGA
GTACAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGCACCGATCGAAAAGACCATTAGCAAAGCCAAAGGGCAACCTAGAGAACCTC
AGGTGTATACGCTGCCACCTTCAAGGGACGAACTTACGAAGAACCAGGTCAGCCTGACATGCCCTGGTCAAGGGGTTCTATCCTAGC
GACATTGCTGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAACCAGAGAACAACATAAGACCACCCACCGGTGCTTGATTCGGATGGCAGCTT
CTTCTGTACTCAAAGCTGACTGTTGATAAGAGTCGTTGGCAACAGGGTAACGCTTTTTCTGTCCGTAATGCATGAGGCACCTCC
ACAATCACTATAACCCAGAAAAGTCTGAGTCTCTCTCCCGGCAAA
```

Abbildung 11: DNA-Sequenz der humanen IgG1 Fc Region (CH₁ - CH₃ Domänen). Übersetzt aus der AS Sequenz aus Tabelle 10 und Codon Usage optimiert für HEK293-Zellen.

Die Aminosäuresequenz der IgG1 CH₁ - CH₃ Domänen sowie das MG sind in Tabelle 10 beschrieben. Zudem enthält die IgG1 Fc Region jeweils drei Intra- und Inter-Domänen Disulfidbrücken sowie eine Glykosylierung.

Tabelle 10: Aminosäuresequenz und MG der humane IgG1 Fc Region (CH₁ - CH₃ Domänen).

Aminosäuresequenz	Anzahl der AS	MG (kDa)
ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330	36,11

pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_IgG4 Fc

Die DNA-Sequenz, die für die humane IgG4 Fc Region (CH₁ - CH₃ Domänen) codiert, wurde bei Eurofins Genomics bestellt und in den pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis kloniert.

GCCTCAACCAAGGGACCTTCAGTCTTCCCTCTTGCTCCTTGAGTAGGTCACCTCCGAGAGTACCGCAGCTCTTGGATGTCTTGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCTGTGACCGTCTCTTGGAACTCCGGAGCATTGACCTCTGGAGTGACACCTTCCCGAGCCGTCTTGC AATCAAGCGGCTTGTACTCCCTGTCAAGCGTGGTGACCGTCCCTAGTTCTTCTCTGGGGACAAAGACCTACACCTGCAACGTCGAC CACAAGCCTAGCAACACAAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGAGCAAGTACGGGCCTCCTTGTCCAAGTGGCCAGCCCCAGAATTTCT CGGGGGGCCAAGCGTGTGTTTTGTTCCCAAGCCAAAGGACACACTGATGATCAGCCGGACACCCGAGGTGACATGCGTGGTGG TCGATGTGAGCCAGGAAGACCCGAAGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACAAAGCCAGA GAGGAGCAGTTCAACAGCACATACCGGGTCTGTCCGTGCTCACTGTGCTCCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTG CAAGGTGAGCAACAAGGGCCTCCCTCCTCCATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCCAAGGGGCAGCCAGGGAGCCCCAGGTCTATA CACTCCCCCTCCAGGAGGAGATGACAAAGAATCAGGTCAGCCTGACTTGCCCTCGTGAAGGCTTTTACCCAGCGATATTGCC GTGGAGTGGGAGTCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAACTACTCCCCCGTCTGGATTCCGATGGCTCCTTTTCTCTGTA CTCCAGGCTGACTGTGGATAAAAAGCCGCTGGCAGGAGGGCAACGCTTTAGCTGCAGCGTCATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ATACACAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCTGGGCAAA

Abbildung 12: DNA-Sequenz der humanen IgG4 Fc Region (CH₁ - CH₃ Domänen). Übersetzt aus der AS Sequenz aus Tabelle 11 und Codon Usage optimiert für HEK293-Zellen.

Die Aminosäuresequenz der IgG4 CH₁ - CH₃ Domänen sowie das MG sind in Tabelle 9 beschrieben. Zudem enthält die IgG4 Fc Region jeweils drei Intra- und Inter-Domänen Disulfidbrücken sowie eine Glykosylierung (siehe Abbildung 56).

Tabelle 11: Aminosäuresequenz und MG der humane IgG4 Fc Region (CH₁ - CH₃ Domänen).

Aminosäuresequenz	Anzahl der AS	MG (kDa)
ASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAPAEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	327	35,94

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	T _m (spez) (°C)	T _m (gesamt) (°C)
41_pcDNAZeo_Signal_fwd	AGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATGGAATTGGGGCTGAGCTGGG	59	71
42_pcDNAZeo_His_rev	CGGCCGCCACTGTGCTGGATTCAATGGTGGTGTATGGGCGCC	56	76
43_CD64_fwd	TTAAATGTGTCCAGTGTGGCCAAGTGGACACCACAAAGGCAG	55	67
44_CD64_rev	GGATTCAATGGTGGTGTATGGGCGCGCCTGAACCGCCTCCAT	61	74
45_IgE_fwd	TTAAATGTGTCCAGTGTGGCCCCACCGTGAAGATCTTACAGTCG	56	67
46_IgE_rev	GGATTCAATGGTGGTGTATGGGCTTTACCGGGATTTACAGACACCG	53	69
47_IgG1_fwd	TTAAATGTGTCCAGTGTGGCGCCTCAACCAAAGGACCAAGCG	59	75
48_IgG1_rev	GGATTCAATGGTGGTGTATGGGCTTTGCCGGGAGAGAGACTCAG	55	71
61_IgG4_fwd	TTAAATGTGTCCAGTGTGGCGCCTCAACCAAGGGACCT	52	69
62_IgG4_rev	GGATTCAATGGTGGTGTATGGGCTTTGCCCAGGGACAGGGAC	56	73
80_IgG1_Mu1_rev	ACAGAGGGTCTCCAGAAGGGCGGGAGCTGGACAAGGAGGGC	63	79
81_IgG1_Mu2_fwd	CTCCTTGTCAGCTCCCGAAGCCCTGGGAGGACCCTCTGTGTT	59	77
82_IgG1_Mu2_rev	AACACAGAGGGTCTCCAGGGCTTCGGGAGCTGGACAAGGAG	60	77
83_IgG1_Mu3_fwd	CTGTCCAGCTCCCGAAGCTTGGCCGAGGACCCTCTGTGTTCTCT	59	76
84_IgG1_Mu3_rev	AGGAACACAGAGGGTCTCCGGCAAGTTCGGGAGCTGGACAAG	58	76
85_IgG1_Mu4_fwd	GTCCAGCTCCCGAAGCTTCTGGCCGAGCCTCTGTGTTCTCTCT	57	76
86_IgG1_Mu4_rev	AAGAGGAACACAGAGGGTCCGGCCAGAAGTTCGGGAGCTGGAC	58	76
87_IgG1_Mu5_fwd	CAGCTCCCGAAGCTTCTGGGAGCCCCCTCTGTGTTCTCTTTCC	56	75
88_IgG1_Mu5_rev	GGAAAGAGGAACACAGAGGGGGCTCCCGAAGTTCGGGAGCTG	60	75
89_IgG1_Mu6_fwd	CCTCCTTGTCAGCTCCCCCGTGGCCGAGCCTCTGTGTTCTCTCT TTTC	53	80
90_IgG1_Mu6_rev	GGAAAGAGGAACACAGAGGGTCCGGCCACGGGGGAGCTGGACAA GGAGG	58	80
91_IgG1_verlängert_fwd	TGCTATATTTAAATGTGTCCAGTGTGGCGCCTCAACCAAAGGACC AAGCG	66	73
92_IgG1_verlängert_rev	CTGTGCTGGATTCAATGGTGGTGTATGGGCTTTGCCGGGAGAGAGA CTCAG	62	76
97_IgG1_Mu6_fwd	ACCCACACTTGCCTCCTTGTCCAGCTCCCCCGTGGCCGGACCC TCTGTGTTCTCTTTCTCCCAA	63	84
98_IgG1_Mu5_fwd	ACCCACACTTGCCTCCTTGTCCAGCTCCCGAAGCTTCTGGGAGCC CCTCTGTGTTCTCTTTCTCCCAA	61	82
99_6His_pcDNA_rev	CGGCCGCCACTGTGCTGGATTCAATGGTGTATGGTGGTGTATGGGCG CCAC	64	77
107_IgG1_6xHis_rev	CAATGGTGTATGGTGGTGTATGGGCTTTGCCGGGAGAGAGACTCAG	55	72
108_IgG4_6xHis_rev	CAATGGTGTATGGTGGTGTATGGGCTTTGCCCAGGGACAGGGAC	56	73
111_CD64_IgG4_fwd	CATGGAGGCGGTTAGGCGCGCCTCAACCAAGGGACCTTCAGTC	60	76
112_CD64_IgG4_rev	GACTGAAGGTCCCTTGGTTGAGGCCGCGCCTGAACCGCCTCCATG	62	76
113_CD64_IgG1_fwd	TCATGGAGGCGGTTAGGCGCGCCTCAACCAAAGGACCAAGCG	58	76
114_CD64_IgG1_rev	CGCTTGGTCCCTTTGGTTGAGGCCGCGCCTGAACCGCCTCCATGA	63	76

3.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Übersicht der Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Artikelnummer
6 round wells	Nunc	140675
Agarose Gelkammer, Mini-Sub [®] Cell GT	BIO-RAD	1704406
ÄKTA [™] pure L	GE Healthcare	1744454
Blotpapier	Merck Millipore	CFSP223000
Bottle Top Filter	VWR	514-0030
CO ₂ Inkubator	Memmert	INC108med
Dialysierschlauch Membra-Cel [™] , MWCO 14 kDa	Carl Roth	0653.1
Gel Doc [™] EZ System	BIO-RAD	1708270
HisTrap [™] excel Säule	GE Healthcare	17-3712-05
HiTrap [™] NHS-activated HP Säule	GE Healthcare	17-0716-01
Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell and PowerPac [™] Basic Power Supply	BIO-RAD	1658025
NanoDrop 2000c	ThermoFisher Scientific	ND-2000c
Nitrozellulosemembran	BIO-RAD	14142
Piko [™] Thermal Zyklus	ThermoFisher Scientific	TCP0024
Rollerflasche	Nunc	141744
Semi-DryBlotting Apparatur	Pharmacia	EPS 3500 XL
T-Flasche (175 cm ²)	Nunc	159910
T-Flasche (25 cm ²)	Nunc	15637
T-Flasche (75 cm ²)	Nunc	156499
Mini-PROTEAN [®] TGX Stain-Free [™] Precast Gels	BIO-RAD	4568094 / 4568095
Mini-PROTEAN [®] TGX [™] Precast Gels	BIO-RAD	456-1094 / 456-1095

3.6 Software

Tabelle 14: Übersicht der Software

Software	Version	Hersteller / Lieferant
ÄKTA Software, Unicorn	6.3	GE Healthcare
ALLERG-O-WIN	6.4.8	Dr. Fooke Laboratorien GmbH
Analise-it® for Excel	2.03	Analise-it Software
APE - A Plasmid Editor	v.2.0.47	M. Wayne Davis
DNAClub	-	X. Chen
EndNote	17.4.0.8818.	Thomson Reuters
ImageLab (Gel Doc™ EZ System)	5.2.1	BIO-RAD
Microsoft Office Excel	2013	Microsoft
Microsoft Office Word	2013	Microsoft
NanoDrop Software	1.4.2	ThermoFisher Scientific

4 Methoden

4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1986 erstmals von Mullis und Kollegen als Oligonukleotid basierte, enzymatische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen beschrieben (59).

Ein PCR-Zyklus besteht i.d.R. aus drei Schritten, wobei im ersten Schritt (Denaturierung) die Template-DNA, welche die Zielsequenz enthält, thermisch bei 90-95 °C denaturiert wird. Im zweiten Schritt (Hybridisierung) erfolgt die Oligonukleotid-Hybridisierung an die komplementären Bereiche der einzelsträngigen Zielsequenz. Die optimale Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide. In einem dritten Schritt (Elongation) wird der von den Oligonukleotiden flankierende Bereich mittels einer hitzestabilen DNA Polymerase amplifiziert. Klassisch wird die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* zur PCR verwendet (60). Heutzutage werden Polymerasen mit höherer Hitzestabilität und Syntheserate verwendet. Mit der Anzahl der Zyklen steigt die Ausbeute der Zielsequenz, wobei es ab einer gewissen Produktmenge zu einem Plateaueffekt kommt (58).

Neben der Template DNA, den Oligonukleotiden und der Polymerase benötigt man für eine PCR noch einen geeigneten Puffer, Salze und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (60). Für die PCR in dieser Arbeit wurde ein „Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix“ von Thermo Scientific™ verwendet. Nach Herstellerangaben beinhaltet dieser einen 2x Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl₂ als Cofaktor für die Polymerase und eine Phusion Flash II DNA Polymerase aus einem rekombinant veränderten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm. Es handelt sich um eine modifizierte Hot Start II DNA Polymerase, die sowohl die Dauer der PCR verkürzt (15 s Elongation pro 1 kb) als auch komplexe Zielsequenzen mit geringer Fehlerrate (9.5×10^{-7}) amplifiziert. Der Master Mix beinhaltet zusätzlich ein Affibody Protein, welches die Enzymaktivität bei Raumtemperatur inhibiert und somit die Amplifikation von unspezifischen Produkten unterdrückt.

Bei der kombinierten 3-Schritt / 2-Schritt PCR wurden, nach einer initialen Denaturierung, zwei Zyklen bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt. Der erste Zyklus besteht aus drei Schritten, wobei die Annealing-Temperatur der spezifischen Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotiden entsprach. Bei dem zweiten Zyklus fand die Annealing und Elongation in einem Schritt statt, da nun die bereits amplifizierten Sequenzen als Template DNA genutzt

werden konnten. An dieses Template konnte die gesamte Sequenz der Oligonukleotide, inklusive der 3' bzw. 5' Überhänge, binden, deren Schmelztemperaturen (T_m gesamt) nah an der optimalen Elongationstemperatur der Polymerase (72 °C) liegen (siehe Tabelle 12). Bei der finalen Elongation wurden möglicherweise nicht vollständig amplifizierte DNA Stränge komplementiert. Standardmäßig wurde bei jeder PCR 1 M Betain eingesetzt, welches die Amplifikation von GC-reichen Sequenzen verbessern soll (61).

Tabelle 15: Pipettierschema der kombinierten 3-Schritt / 2-Schritt PCR

Komponente	Mengenangabe
DNA	50 ng
2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	20 μ L
Fwd Oligonukleotid (10 μ M)	4 μ L
Rev Oligonukleotid (10 μ M)	4 μ L
Betain (5 M)	8 μ L
ddH ₂ O	Ad 40 μ L

Tabelle 16: Temperaturprofil der kombinierten 3-Schritt / 2-Schritt PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	15 s	1x
Denaturierung	98 °C	5 s	5x
Annealing	T_m spezifisch	5 s	
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Denaturierung	98 °C	5 s	25x
Annealing + Elongation	72 °C	15 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	30 s	1x
Lagerung	4 °C		

4.1.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der ersten Identifizierung möglicher positiver *E. coli* Klone nach der Transformation. Mittels PCR kann überprüft werden, ob es sich um ein Insert-tragenden Klon handelt (62). Dazu wurde ein Teil einer Kolonie mit Hilfe einer 10 μ L Pipette von der Agarplatte gestrichen, in 5 μ L ddH₂O resuspendiert und für 15 min bei 99 °C erhitzt. Es wurde 1 μ L des jeweiligen Ansatzes für die PCR eingesetzt.

Tabelle 17: Pipettierschema und Temperaturprofil der Kolonie-PCR

Komponente	Volumen (µL)		Temperatur	Zeit	Zyklen
Taq Puffer (10x)	1	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1x
dNTP-Mix, jeweils 2 mM	1				
Fwd Oligonukleotid (10 µM)	1	Denaturierung	95 °C	30 s	25x
Rev Oligonukleotid (10 µM)	1				
Taq Polymerase	0,1				
Betain (5 M)	2	Annealing	X °C	30 s	
MgCl ₂ (50 M)	0,4				
ddH ₂ O	2,5	Elongation	72 °C	60 s/kb	
		Finale Elongation	72 °C	8 min	1x
		Lagerung	4 °C		

Es wurde für jede Kolonie-PCR ein Vektor-spezifisches und Insert-spezifisches Oligonukleotid (fwd und rev) eingesetzt. Die verwendete Annealing-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide (siehe Tabelle 12) und die Dauer der Elongation nach der Größe des Inserts (60 s/kb).

Die PCR Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Klone, die nach PCR eine Bande der erwarteten Größe zeigten, wurden über Nacht in LB-Ampicillin Medium (100 µg/mL Ampicillin) kultiviert und das Plasmid mittels Minipräparation isoliert.

4.1.3 DNA Aufreinigung von PCR-Produkten

DNA Fragmente aus PCR-Ansätzen wurden mit dem Cycle-Pure Kit (Classic-Line) von VWR gemäß Herstellervorschrift aufgereinigt. Mit dem Kit lassen sich DNA-Fragmente mit einer Größe von 50 bp bis 40 kbp aufreinigen, während Salze, freie Nukleotide, Oligonukleotide und Proteine durch zwei Waschschrte entfernt werden. Die gereinigten Proben wurden in 30 µL ddH₂O gelöst und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop bei 260 nm bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben ein Verhältnis von $A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 zeigten, sodass von einer Reinheit der DNA > 90 % ausgegangen werden konnte.

4.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Eine Agarosegel-Elektrophorese ist eine simple Methode, um 0,5 - 25 kb DNA-Fragmente zu separieren, zu identifizieren und zu isolieren (63). Agarose-Polymere bilden während der Aushärtung ein Netzwerk aus, dessen Grad der Vernetzung bzw. Porengröße die Trenneigenschaften des Gels bestimmt. Das Phosphatrückrat der DNA ist negativ geladen, wodurch bei Anlegen eines

elektrischen Felds die DNA-Fragmente zu der Anode wandern. Aufgrund des einheitlichen Masse- / Ladungsverhältnisses werden die DNA Fragmente lediglich aufgrund ihrer Größe getrennt, wobei kleinere Fragmente schneller durch das Agarosenetzwerk wandern. Die zurückgelegte Distanz ist invers proportional zum Logarithmus des MGs (64). Nach der Trennung und Größen-Identifizierung anhand eines Markers (DNA-Fragmente mit bekanntem MG) besteht die Möglichkeit, das Fragment von Interesse aus dem Gel zu isolieren. Die DNA-Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und mittels geeigneter Methode die DNA aus der Gelmatrix isoliert (siehe Kapitel 4.1.5).

Zur Trennung der DNA-Fragmente in der vorliegenden Arbeit wurde in der Regel ein 1 %-iges Agarosegel verwendet, da dieses 0,5 - 10 kb Fragmente auftrennt. Für die Identifizierung von Fragmenten < 0,5 kb wurde ein 1,5 %-iges Gel verwendet, welches DNA bis zu einer Größe von 0,2 kb trennt (63). Dementsprechend wurde 1 % oder 1,5 % (w/v) Agarose in TAE Puffer eingewogen und in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Agaroselösung wurde bis zu einer Temperatur von 50 - 60 °C auf einem Rührer abgekühlt und 1x (v/v) GelStar™ hinzu gegeben (64). GelStar™ bindet sowohl an Einzel- als auch an Doppelstrang-DNA (dsDNA), sodass die Banden bei der Anregung mit UV-Licht fluoreszieren. Die Detektionsgrenze beträgt 20 pg dsDNA (65). Das noch flüssige Gel wurde blasenfrei in eine Gelkammer überführt und ein Kamm zur Erzeugung der Taschen eingesetzt. Nach Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die mit TAE Puffer befüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Die Proben wurden in 6x Laufpuffer verdünnt und in die Taschen pipettiert. Ein DNA-Marker wurde zusätzlich in die äußeren Taschen pipettiert. Es wurde eine Spannung 5 V/cm Gel angelegt, bis die DNA-Fragmente ausreichend voneinander getrennt waren. Die Dauer war dabei abhängig von der Größendifferenz der einzelnen Fragmente (64).

4.1.5 DNA-Isolierung aus einem Agarosegel

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Classic-Line) von VWR gemäß Herstellervorschrift aufgereinigt. Mit dem Kit lassen sich DNA-Fragmente mit einer Größe von 50 bp bis 40 kbp aufreinigen, während die Agarose durch zwei Waschschriffe entfernt wird. Gel-gereinigte Proben wurden in 30 µL ddH₂O gelöst und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop bei 260 nm bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben ein Verhältnis von $A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 zeigten, sodass von einer Reinheit der DNA > 90 % ausgegangen werden konnte.

4.1.6 SLIC Methode

Sequence- and Ligation-Independent Cloning (SLIC) ist eine von Li und Elledge entwickelte Methode, die die standardisierte Restriktion / Ligation-Klonierung ersetzt. Vor der Verwendung dieser Methode muss das Insert mit speziellen Oligonukleotiden amplifiziert werden, welche am 3'- und 5'-Ende homologe Sequenzen zu dem eingesetzten Vektor aufweisen. Durch den Einsatz einer T4-DNA Polymerase werden kurze einzelsträngige, komplementäre DNA-Überhänge im Vektor und Insert erzeugt (66). Die DNA-Fragmente lagern sich *in vitro* aneinander, und die fehlenden homologen Basen werden bei der Transformation in *E. coli* aufgefüllt (*Double-Stranded Gap Repair*) (67).

Je 1 µg linearisierter Vektor und Zielgen, zuvor amplifiziert mit flankierenden, homologen Sequenzen zum eingesetzten Vektor, wurden separat voneinander für 30 min bei 22 °C mit einer T4-DNA Polymerase inkubiert.

Tabelle 18: Pipettierschema SLIC Methode, Schritt 1

Komponente	Mengenangabe
DNA Vektor / Insert	Je 1 µg
T4-DNA Polymerase (1/10)	5 µL
T4-DNA Polymerase Puffer (10x)	2 µL
BSA (100x)	0,2 µL
ddH ₂ O	Ad 20 µL

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/10 Volumina 10 mM dCTP Lösung gestoppt. Für den zweiten Schritt der SLIC Methode wurden 50 ng des T4-linearisierten Vektors und die äquimolare Menge des Inserts eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert:

Tabelle 19: Pipettierschema SLIC Methode, Schritt 2

Komponente	Mengenangabe
Vektor	50 ng
Insert	Äquimolar zum Vektor
T4-DNA Ligase Puffer (10x)	1 µL
Rekombinase A (1/25)	0,1 µL
ddH ₂ O	Ad 10 µL

Nach der Inkubation wurde 1µL des Ansatzes für die Transformation in One Shot® OmniMax™ 2T1^R-Zellen verwendet.

Die Transformation mit dem beschriebenen SLIC Reaktionsansatz hat in den meisten Fällen nur unzureichend funktioniert. Daher wurde das Annealing der T4-DNA Polymerase linearisierten Sequenzen folgendermaßen modifiziert:

Tabelle 20: Pipettierschema SLIC Methode, modifizierter Schritt 2

Komponente	Mengenangabe
Vektor	50 ng
Insert	Äquimolar zum Vektor
T4-DNA Ligase Puffer (10x)	0,5 µL
Rekombinase A (1/25)	0,1 µL
ddH ₂ O	Ad 5 µL

Nach der Inkubation von 30 min bei 22 °C wurde außerdem 1 µL EDTA (100 mM) dem Ansatz zugegeben und weitere 30 min bei 22 °C inkubiert. Es wurde 1µL des Ansatzes für die Transformation in One Shot® OmniMax™ 2T1^R-Zellen verwendet.

4.1.7 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Vervielfältigung von Insert-tragenden Vektoren wurden kompetente One Shot® OmniMax™ 2T1^R-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mittels Hitzeschock-Methode transformiert:

- Je Transformation wurde ein Reaktionsgefäß mit je 50 µL kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut
- 1 µL DNA aus dem SLIC Reaktionsansatz wurde den Zellen zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert
- Hitzeschock der Zellen für 30 min bei 42 °C im Wasserbad
- Inkubation der Zellen für 2 min auf Eis
- Je Reaktionsgefäß wurde 250 µL SOC Medium (Raumtemperatur) zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 225 rpm/min inkubiert
- Das gesamte Volumen (ca. 300 µL) wurde auf LB-Ampicillin-Agarplatten (100 µg/mL (w/v) Ampicillin) ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert

2-5 Kolonien wurden am nächsten Tag mittels Kolonie-PCR (siehe Kapitel 4.1.2) analysiert.

4.1.8 Plasmid-Isolation

Die Plasmid-Isolation mittels alkalischer Lyse wurde erstmals 1979 von Birnboim und Doly beschrieben (68) und zählt heute, mit wenigen Modifikationen, zu einer der Standardmethoden der Plasmid-Extraktion aus Bakterien.

Bei der alkalischen Lyse wird die bakterielle Zellwand mit SDS-NaOH-Lösung lysiert. RNA wird durch die Zugabe von RNase degradiert. Die Zugabe von Natriumacetat neutralisiert die Lösung und sorgt mit Hilfe von SDS dafür, dass Proteine und genomische DNA ausfallen. Mittels Ethanol-Fällung wird das Plasmid aus dem Überstand isoliert.

Klone, die nach der Kolonie-PCR eine Bande der erwarteten Größe im Agarosegel zeigten, wurden vervielfältigt und isoliert. Dazu wurde die Kolonie mit Hilfe einer 10 µL Pipette von der Agarplatte gestrichen, in ein Kulturröhrchen mit 3 mL LB-Ampicillin Medium (100 µg/mL Ampicillin) überführt und über Nacht bei 28 °C und 150 rpm kultiviert. Aus dieser Kultur wurde die Plasmid-DNA nach folgender Anleitung isoliert (Pufferzusammensetzung: siehe Tabelle 8):

- Je 1,5 mL Kultur in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführen und bei 10.000 g, 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 50 µL Puffer 1 resuspendieren und 100 µL Puffer 2 zugeben
- Lösung mehrfach invertieren und inkubieren, bis die Lösung klar ist (maximal 5 min)
- 75 µL Puffer 3 und 225 µL Puffer 4 hinzu geben und wiederum mehrfach invertieren
- 10 min bei 12.000 g zentrifugieren
- Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführen

Ethanol Fällung

- 2,5-faches Volumen EtOH_{abs.} zugeben
- Mindestens 30 min bei -20 °C lagern
- 10 min bei 12.000 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 700 µL 70% EtOH waschen
- 1 min bei 12.000 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen lassen und in 50 µL ddH₂O resuspendieren

Die DNA Konzentration wurde mittels NanoDrop bei 260 nm bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben ein Verhältnis von $A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 zeigten, sodass von einer Reinheit der DNA > 90 % ausgegangen werden konnte. Das gereinigte Plasmid wurde zur Sequenzüberprüfung zu MWG geschickt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2 Design der Expressionsvektoren zur Expression in HEK293-Zellen

4.2.1 Design von universellen Shuttle-Vektoren

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde der Shuttle-Vektor pcDNA3.1/zeo von Invitrogen verwendet (siehe Kapitel 3.3). In diesen Vektor wurde eine Signalsequenz, eine Restriktionsschnittstelle, die der ursprüngliche Vektor nicht enthält, sowie eine zusätzliche Sequenz, die für einen Polyhistidin-Tag kodiert, kloniert. Anhand der neuen Schnittstelle zwischen Signalsequenz und His-Tag-Sequenz wurden alle Zielsequenzen in den neuen Ausgangsvektor kloniert. Dazu wurde der pcDNA3.1/zeo Vektor zuerst mit dem Restriktionsenzym EcoRV für 45 min bei 37 °C linearisiert (siehe Tabelle 21), anschließend das Enzym inaktiviert (20 min, 80 °C), der Vektor mittels Ethanol-Fällung gewonnen (siehe Kapitel 4.1.8) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 21: Pipettierschema: Restriktionsverdau mit EcoRV

Komponente	Mengenangabe
pcDNA3.1/zeo	15 µg
Fast Digest Puffer (10x)	10 µL
EcoRV	5 µL
ddH ₂ O	Ad 100 µL

Die DNA-Sequenz, bestehend aus Signalsequenz, SfoI Schnittstelle, 4er His-Tag-Sequenz und Stop-Codon wurde bei Eurofins Genomics synthetisiert.

Tabelle 22: DNA-Sequenz, bestehend aus Signalsequenz, SfoI Schnittstelle, His-Tag-Sequenz und Stop-Codon (pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis).

Signalsequenz	SfoI Schnittstelle	His-Tag	Stop-codon
atggaattgggctgagctgggtttcctgtgctatatttaaattgtgccagtgt	ggc gcc	catcaccacat	tga

Mittels kombinierter 3-Schritt / 2-Schritt PCR wurde zuerst die Sequenz aus Tabelle 22 amplifiziert (siehe Kapitel 4.1.1), die DNA isoliert (siehe Kapitel 4.1.3) und dann mittels SLIC Methode (siehe Kapitel 4.1.6) in den pcDNA3.1/zeo Vektor kloniert.

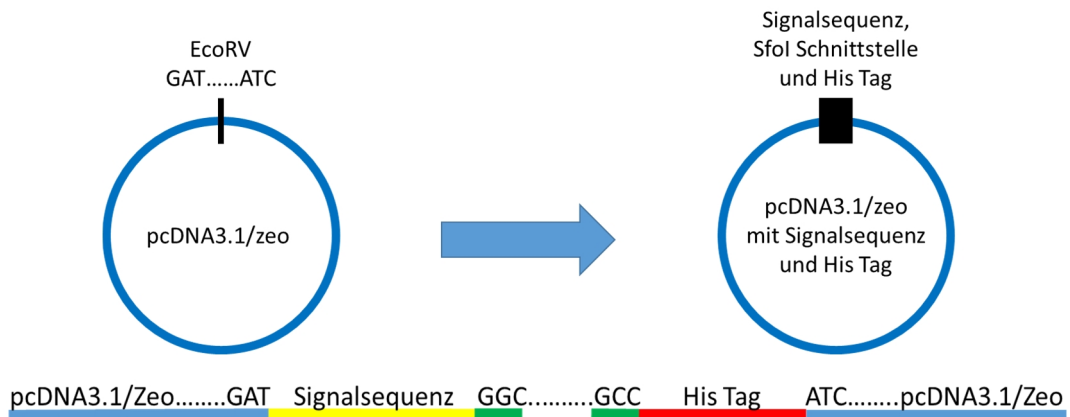


Abbildung 13: Schematische Darstellung des pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis. pcDNA3.1/zeo wurde mit EcoRV linearisiert und die Sequenz aus Tabelle 22 mittels SLIC Methode kloniert.

Nach der Transformation in *E. coli* und Plasmid-Isolation (siehe Kapitel 4.1.7 und 4.1.8) wurde der pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis mit dem Restriktionsenzym SfoI für 16 h bei 37 °C linearisiert (siehe Tabelle 23), anschließend das Enzym inaktiviert (20 min, 65 °C), der Vektor mittels Ethanol-Fällung gewonnen (siehe Kapitel 4.1.8) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 23: Pipettierschema: Restriktionsverdau mit SfoI

Komponente	Mengenangabe
Vektor	20 µg
Tango Puffer (10x)	5 µL
SfoI	3,5 µL
ddH ₂ O	Ad 50 µL

Der mittels SfoI linearisierte pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis wurde dann als Ausgangsvektor für alle weiteren Klonierungen verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide (siehe Tabelle 12) weisen am 3' und 5' Ende homologe Sequenzen zu dem eingesetzten Vektor auf, sprich homologe Sequenzen zur Signalsequenz und zur His-Tag-Sequenz (siehe Abbildung 13).

Zur Herstellung des pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis wurde der pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis mit einer Sequenz, die für zwei Histidine codiert, erweitert. Es wurde dazu ein Oligonukleotid designt, das mittels PCR die His-Tag Sequenz erweitert (Oligonukleotid 99, siehe Tabelle 12).

4.2.2 Design der Expressionsvektoren verschiedener humaner Proteine

Folgende Proteine wurden in HEK293-Zellen exprimiert:

- Humaner CD64 Rezeptor (extrazelluläre Region)
- Humane IgE Fc Region
- Adapter-Molekül aus CD64 Rezeptor und IgE Fc Region (CD64-IgE Fc)

- Humane IgG4 Fc Region
- Adapter-Molekül aus CD64 Rezeptor und Ig4 Fc Region (CD64-Ig4 Fc)

- Humane IgG1 Fc Region und verschiedene Mutationen der IgG1 Fc Region
- Adapter-Molekül aus CD64 Rezeptor und mutierter IgG1 Fc Region (CD64-mIgG1 Fc)

Die DNA-Sequenz des CD64-IgE Fc Moleküls wurde, bereits kloniert in den pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis, von der Universität Hamburg bereitgestellt (siehe Kapitel 3.4). Aus dieser Sequenz wurde die DNA für den CD64 Rezeptor und der IgE Fc Region mittels kombinierter 3-Schritt / 2-Schritt PCR (siehe Kapitel 4.1.1) amplifiziert. Die DNA-Sequenzen, die für die IgG1 und IgG4 Fc Regionen codieren, wurde bei Eurofins Genomics bestellt. Die DNA-Sequenz des Rezeptors und der Antikörperfragmente wurden jeweils in den pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis, der im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, kloniert. Die zuvor in der PCR eingesetzten Oligonukleotide (siehe Tabelle 12) wiesen dazu am 3' und 5' Ende homologe Sequenzen zu dem pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis auf, sprich homologe Sequenzen zur Signalsequenz und zur His-Tag-Sequenz (siehe Abbildung 13).

Die Herstellung der mutierten IgG1 Fc Sequenzen sind in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Geeignete Mutationen, die nach der Expression in HEK293-Zellen keine oder nur eine geringe Affinität zu dem CD64 Rezeptor zeigten, wurden zur Erstellung des Adapter-Moleküls CD64-IgG1 Fc verwendet. Dieses Adapter-Molekül sowie das Adapter-Molekül bestehend aus dem CD64 Rezeptor und der Ig4 Fc Region (CD64-Ig4 Fc) wurden mittels Megaprimer PCR realisiert. Zur Verknüpfung des Rezeptors mit dem jeweiligen Antikörperfragment wurde zuvor jede Sequenz durch eine PCR flankiert. Dazu wurden erneut Oligonukleotide, die am 3' und 5' Ende homologe Bereiche zu der Sequenz enthielten, an die angelagert werden sollte, verwendet. Die DNA für den CD64 Rezeptor wurde jeweils mit komplementären Sequenzen zu der IgG1 Fc Region und der IgG4 Fc Region flankiert und die Antikörperfragmente mit komplementären Sequenzen zu dem CD64 Rezeptor. Nach der Isolierung der PCR-Produkte folgte die Megaprimer PCR.

Als Megaprimer werden die eingesetzten Sequenzen bezeichnet, die aufgrund der komplementären Überhänge miteinander annealen (69). Bei der Megaprimer PCR wurden 5 Zyklen ohne Zugabe spezifischer Oligonukleotide durchgeführt, sodass lediglich die zwei DNA-Sequenzen

aufgrund der komplementären Überhänge aneinander binden und flankiert werden. Danach erst wurden die flankierenden Oligonukleotide dem Reaktionsansatz zugegeben, damit das neu entstandene Template vervielfältigt werden konnte.

Tabelle 24: Temperaturprofil der Megaprimer PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	15 s	1x
Denaturierung	98 °C	5 s	5x
Annealing	T _m spezifisch der Überhänge	5 s	
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Pause	4 °C	Zugabe der Oligonukleotide	
Denaturierung	98 °C	5 s	25x
Annealing	T _m der Oligonukleotide	5 s	
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	30 s	1x
Lagerung	4 °C		

Tabelle 25: Pipettierschema der Megaprimer PCR

Komponente	Mengenangabe	
DNA mit komplementären Überhängen	Je 50 ng	
2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	25 µL	
Fwd Oligonukleotid (10 µM)	5 µL	Zugabe nach den ersten 5 Zyklen
Rev Oligonukleotid (10 µM)	5 µL	
Betain (5 M)	10 µL	
ddH ₂ O	Ad 50 µL	

Die entstandenen PCR-Produkte wurden im Agarosegel überprüft und die entsprechenden Banden, abhängig von der Reinheit, aus dem Agarosegel eluiert (siehe Kapitel 4.1.5) oder die DNA aus dem gesamten Ansatz isoliert (siehe Kapitel 4.1.3) und anschließend in den pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis kloniert.

4.2.3 Site-directed mutagenesis mit Megaprimer PCR

Bestimmte Bereiche der humanen IgG1 DNA-Sequenz wurden mittels der sogenannten „*Site-directed mutagenesis*“ Methode mutiert. Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die in der Mitte der Sequenz die gewünschte Mutation tragen, sowie ein upstream und ein downstream Oligonukleotid, welche die gesamte IgG1 Sequenz flankieren (58). Es wurden 6 unterschiedliche Mutationen durchgeführt, wobei bei den ersten 5 Mutationen jede AS durch Alanin getauscht wurde (Punktmutation), bei der 6. Mutationen wurde eine AS deletiert sowie drei weitere AS mutiert. Die mutierte Sequenz der Mutation 6 entspricht in diesem Bereich dadurch der humanen IgG2 Sequenz.

Tabelle 26: Übersicht der durchgeführten IgG1 Mutationen

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Nukleotidsequenz
IgG1, Wildtyp	ELLGG	GAA CTT CTG GGA GGA
IgG1, Mutation 1	ALLGG	GCC CTT CTG GGA GGA
IgG1, Mutation 2	EALGG	GAA GCC CTG GGA GGA
IgG1, Mutation 3	ELAGG	GAA CTT GCC GGA GGA
IgG1, Mutation 4	ELLAG	GAA CTT CTG GCC GGA
IgG1, Mutation 5	ELLGA	GAA CTT CTG GGA GCA
IgG1, Mutation 6	-PVAG	- - - CCC GTG GCC GGA

Das Prinzip der verwendeten Methode ist in Abbildung 14 beschrieben. Zuerst wurden für alle Mutationen jeweils zwei separate PCR-Ansätze (PCR A und PCR B) durchgeführt. In dem Reaktionsansatz für PCR A wurde der flankierende forward Primer und der reverse mutierte Primer eingesetzt. Bei der PCR B wurde der flankierende reverse Primer und der forward mutierte Primer eingesetzt. Die Durchführung dieser PCR ist in Tabelle 15 und Tabelle 16 beschrieben.

Die entstandenen Amplifikate mit komplementären Überhängen im zu mutierenden Bereich wurden mittels einer zweiten PCR, einer Megaprimer PCR, miteinander verbunden und vervielfältigt. Diese Methode ist bereits im vorherigen Kapitel beschrieben.

Die entstandenen PCR Produkte wurden im Agarosegel überprüft und die entsprechenden Banden, abhängig von der Reinheit, aus dem Agarosegel eluiert (siehe Kapitel 4.1.5) oder die DNA aus dem gesamten Ansatz isoliert (siehe Kapitel 4.1.3).

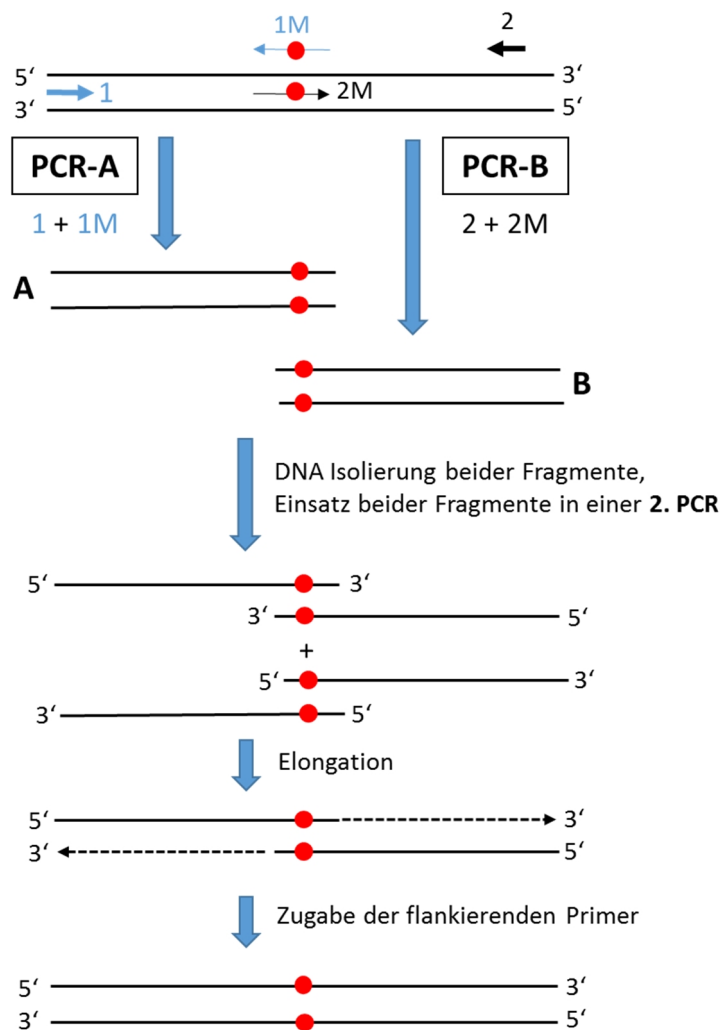


Abbildung 14: Schema: *Site-directed mutagenesis* mit Megaprimer PCR

4.3 Zellkultur Methoden

4.3.1 Zellkulturarbeiten mit HEK293-Zellen

Die Expression von rekombinanten Proteinen wird, aufgrund einfacher Handhabung und hoher Ausbeuten, in der Regel in Bakterien durchgeführt. Expressionen in Säugerzellen hingegen sind deutlich aufwendiger und mit geringeren Proteinausbeuten verbunden. Dennoch werden Säugerzellen für die Expression von Säugerproteinen verwendet, da diese, im Gegensatz zu Bakterien, in der Lage sind, das Protein korrekt zu falten und posttranslationale Modifikationen durchzuführen (58, 70).

Humane embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney cell*, HEK Zellen) werden seit über 25 Jahren als Expressionssystem für Proteine humanen Ursprungs verwendet (71). Neben dem

Einsatz für transiente Expressionen kann diese Zelllinie auch für stabile Expressionen verwendet werden, obgleich die Wahrscheinlichkeit, dass das transfizierte Plasmid in das Genom der Zelle übernommen wird sehr gering ist. In der Regel werden, unabhängig von der Transfektionsmethode, maximal 10^{-4} Zellen stabil transfiziert (58). Die kommerziell erhältlichen HEK Zellen wurden von Graham, Smiley, Russell und Narin 1977 mit der Adenovirus Typ 5 DNA transfiziert. Die sogenannte HEK293 Zelllinie beinhaltet DNA-Fragmente des Adenovirus Typ 5 im Chromosom 19 (72).

4.3.2 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen, die in T-Flaschen oder Rollerflaschen mit geeignetem Kultivierungsmedium (DMEM, 10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin) inkubiert wurden. Rollerflaschen wurden mit 0,6 Umdrehungen pro min im Brutschrank, ebenfalls bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen haben unter optimalen Bedingungen eine Verdopplungszeit von 24-30 h (Angabe der DSMZ).

In der vorliegenden Arbeit enthielt eine Kryokonserven der HEK293-Zellen nach dem Zentrifugieren und Lösen in 6 mL Zellkulturmedium $3,2 \times 10^6$ Zellen ($5,3 \times 10^5$ Zellen/mL) mit einer Vitalität von 80 % ($4,3 \times 10^5$ lebende Zellen/mL). Die gesamte Zellsuspension wurde in eine 25 cm² T-Flasche überführt und wie oben angeführt kultiviert. Drei Tage nach dem Start der Kultivierung zeigte die Flasche ca. 90 % Konfluenz. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und die Zellzahl und Vitalität erneut bestimmt. Die Zellzahl, Verdopplungszeit und Vitalität der Zellen wurde anhand von 4 Passagen bestimmt.

Tabelle 27: Bestimmung der Verdopplungszeit und Vitalität von HEK293-Zellen. Bestimmt anhand von 4 Passagen jeweils 72 h nach der Aussaat von 6 mL in eine 25 cm² T-Flasche.

Passage	Zellzahl bei Aussaat (ml ⁻¹)	Zellzahl bei ca. 90 % Konfluenz (ml ⁻¹)	Verdopplungszeit (h)	Vitalität (%)
1 (aus Kryokonserven)	$4,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	23,5	80
2	$4,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	25,86	100
3	$4,4 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	25,11	100
4	$4,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	25,39	100

Lediglich die Zellen der Kryokonserven zeigten eine Vitalität von 80 %. Bereits nach der zweiten Passage lag eine Vitalität von 100 % vor. Ab der zweiten Passage wurde eine Verdopplungszeit von ca. 25 h, bei einer Aussaat von $4,2 \times 10^5$ - $4,8 \times 10^5$ Zellen/mL, berechnet. Die ermittelte Verdopplungszeit steht im Einklang mit der Angabe der DSMZ, der ATCC sowie mit in der Literatur

beschriebenen Erfahrungen (121). Aus Passage 4 wurden Kryokonserven angelegt. Zur Überprüfung der Kryokonservierung wurde 2 Wochen später eine Kryokonserve wieder in Kultur genommen. Auch die Zellen dieser Kryokonserve zeigten zunächst eine Vitalität von ca. 80 % und nach der zweiten Passage wieder nahezu 100 %. Auch eine Verdopplungszeit von ca. 25 h konnte wieder ermittelt werden.

4.3.3 Passagieren von HEK293-Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 90 % mittels Trypsin / EDTA passagiert. Nach der Abnahme des Mediums wurden die adhären Zellen bei 37 °C für 3 - 5 Minuten mit der Enzymlösung inkubiert.

Tabelle 28: Verwendetes Volumen Trypsin / EDTA zum Ablösen adhären wachsender HEK293-Zellen von T-Flaschen mit unterschiedlicher Oberflächengröße.

T-Flasche (cm ²)	Trypsin / EDTA (mL)
25	1
75	2
175	3

Trypsin löst die Verbindung zwischen der Zelloberfläche und den Poly-L-Lysin beschichteten Kulturgefäßen auf, indem das Enzym die beteiligten AS, speziell Lysin und Arginin, an ihrem c-Terminus spaltet. EDTA separiert die Zellen voneinander, indem es Kalzium komplexiert, welches die sogenannten Cadherine (Kalzium-Ionen-abhängige transmembrane Glykoproteine) benötigen, um Inter-Zellwechselwirkungen zu stabilisieren (73). Die trypsinisierten Zellen wurden im Verhältnis 1/6 bis 1/10 mit Kultivierungsmedium versetzt und in ein frisches Kulturgefäß (T-Flasche) überführt. Nach 20-30 Passagen wurde eine frische Kryokonserve in Kultur genommen, da ab dieser Passagenzahl die Transfektionseffizienz sinkt (71).

4.3.4 Expression in Rollerflaschen

Angeimpfte Rollerflaschen wurden so lange kultiviert, bis das Medium optisch eindeutig verbraucht war (Farbumschlag von rot zu orange). Die Zeit betrug in der Regel 8 - 10 Tage. Das Medium wurde entnommen und erneut 250 mL Kultivierungsmedium, versetzt mit 1,0 % (v/v) Zeocin, in die mit Zellen bewachsene Rollerflasche überführt und diese wiederum bis zum Verbrauch des Medium kultiviert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich die Zellen von

der Wandung lösten. Der Überstand jeder Passage wurde gesammelt, 30 min bei 5000 g zentrifugiert, 20 mg/mL Ampicillin zugegeben und bis zur Aufreinigung bei 2-8°C gelagert.

4.3.5 Kryokonserven

Kryokonservierung

Eine zu ca. 90 % bewachsene 75 cm² T-Flasche wurde wie oben beschrieben trypsiniert, die gelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 mL DMEM überführt und 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 4 mL DMEM mit 20 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO gelöst und je 1 mL in Kryoröhrchen aliquotiert. Zuerst wurden die Kryokulturen für 2 - 4 h bei -20 °C gelagert, bis sie dann bei -80 °C für bis zu einem Jahr gelagert wurden.

Auftauen von Kryokonserven

Die gefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Danach wurden die Zellen zügig in Zentrifugenröhrchen mit 10 mL DMEM überführt und 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Kultivierungsmedium gelöst und in eine 75 cm² T-Fläche überführt.

4.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie der Vitalität von HEK293-Zellen wurden diese mit Trypanblau gefärbt und die Zellen mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer analysiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau nicht auf und erscheinen im mikroskopischen Bild hell, wobei tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und dunkel gefärbt sind (74).

20 µL trypsiniertes Zellen wurden mit 20 µL Trypanblaulösung für ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Lösung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden mindestens 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellen} * \text{mL}^{-1} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 * \text{mL}^{-1}$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Der Verdünnungsfaktor bezieht sich auf die Verdünnung trypsiniertes Zellen mit Trypanblau.

Mittels Formel 1 wurde die Gesamtzellzahl nach Trypsinierung der Zellen ermittelt. War die Zellzahl so hoch, dass die Neubauer-Zählkammer nicht auswertbar war, wurde die Lösung aus trypsinierter Zellen und Trypanblaulösung stärker verdünnt. Es wurde PBS mit zusätzlich 0,9 % (w/v) NaCl zur Verdünnung verwendet. Die verwendete Verdünnung wurde in Formel 1 berücksichtigt (Verdünnungsfaktor). Zur Bestimmung der Vitalität wurde ebenfalls Formel 1 verwendet, jedoch wurde zusätzlich zu der Gesamt-Zellzahl auch die Anzahl der toten Zellen (dunkel gefärbt durch Aufnahme des Farbstoffs) gesondert ausgezählt. Aus der Differenz ergibt sich die Anzahl der lebenden Zellen, die gemessen an der Gesamt-Zellzahl in Prozent dargestellt wurden.

4.3.7 Transfektion von HEK293-Zellen

Als Transfektion bezeichnet man die Übertragung von DNA oder RNA in Säugerzellen. Dabei ist die Effizienz d.h. der Anteil an transfizierten Zellen abhängig von der Kombination aus Zelllinie und Transfektionsmethode. Folgende Methoden bzw. Mechanismen, DNA in Säugerzellen zu transferieren, stehen zur Auswahl:

1. Endo- bzw. Phagozytose (DEAE-Dextran, Calciumphosphat, Transferrin)
2. Fusion mit der Zelle (Lipofectin, Liposomenfusion, Protoplastenfusion)
3. Diffusion (Elektroporation)
4. Gewalt (Mikroinjektion, Beschuss)
5. Virale Aufnahmemechanismen (Virensysteme) (58)

Es wurden die ersten zwei Methoden zur Transfektion von HEK293-Zellen angewendet.

Transfektion mittels Zellfusion

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit kationischen Liposomen, auch Lipofektion genannt, wurde 1987 erstmals von Felgner *et al.* beschrieben (75). Die negativ geladene DNA wird dabei von kationischen Liposomen eingebettet und durch Fusion mit der Zellmembran in das Zytoplasma der Zelle aufgenommen (76, 77). Diese Methode wurde mittels dem Reagenz Lipofectamine® LTX von ThermoFisher Scientific durchgeführt. Um eine höhere Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde zusätzlich das PLUS™ Reagenz von ThermoFisher Scientific der Vektor-DNA zugefügt. Dieses soll die DNA stärker komprimieren, sodass sie schneller von den Liposomen umschlossen wird.

HEK293-Zellen wurden in 6-well Platten mit 2,5 µg Plasmid-DNA, 2,5 µL PLUS™ Reagenz und 5 µL Lipofectamine® LTX je Kavität transfiziert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellervorschrift für adhärent wachsende Zellen.

Transfektion mittels Endozytose

JetPEI® von Polyplus ist ein Polyethylenimin (PEI), ein stabiles kationisches Polymer, welches aufgrund der Ladung negativ geladene DNA-Fragmente bindet (78). Das positiv geladene DNA / PEI Molekül interagiert mit anionischen Proteoglykanen wie z.B. Heparinsulfat auf der Zelloberfläche und wird durch Endozytose in das Zytoplasma der Zelle aufgenommen (79).

HEK293-Zellen wurden in 6-well Platten mit 3 µg Plasmid DNA und 6 µL JetPEI® je Kavität transfiziert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellervorschrift für adhärent wachsende Zellen.

Selektion transfizierter Zellen

Da das für alle Transfektionen verwendete Plasmid ein Zeocin-Resistenzgen enthielt (siehe Abbildung 9), wurde zur Selektion von transfizierten HEK293-Zellen Zeocin, ein kupferchelatisierendes Glykopeptidantibiotikum der Familie der Bleomycine, eingesetzt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und von der 6-well Platte in eine 75 cm² T-Flasche überführt. Das Kultivierungsmedium wurde mit 0,1 % (v/v) Antibiotikum versetzt. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit Zeocin, bis eine Konfluenz von ≈ 90 % gegeben war und nahezu alle Zellen adhärent wuchsen. Diese Selektion dauerte in der Regel ca. 3 Wochen. Danach wurde lediglich nach jeder Passage dem Kultivierungsmedium Zeocin zugegeben. Zusätzliche Medienwechsel waren nicht mehr nötig.

4.4 Protein-biochemische Methoden

4.4.1 Kopplung von Penicilloyl G an Carrier-Proteine

Penicilloyl G hat eine molekulare Masse von 334,39 g/mol und muss deshalb, wie viele andere Medikamente, an ein Carrier-Protein gekoppelt werden, um einen Hapten-Protein Komplex zu bilden, der immunogen ist (80). Zur Immunisierung von Kaninchen wurde Penicilloyl G an Hemocyanin aus dem atlantischen Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) gekoppelt. Es ist bekannt, dass Kaninchen keine oder nur geringe Mengen spezifischer Antikörper gegen diese Carrier-Protein bilden, sodass vorrangig nur Antikörper gegen Penicilloyl G gebildet werden (81). Für die *in vitro* Testung von humanem sIgE gegen Penicilloyl G wird in der Regel humanes Serumalbumin (HSA) als Carrier-Protein verwendet, da das Vorkommen von humanen Antikörpern gegen dieses Protein unwahrscheinlich ist (82).

Die Kopplung von Penicilloyl G an LPH (Hemocyanin aus *Limulus polyphemus*) und HSA als Carrier-Proteine erfolgte in Anlehnung an die Anweisung von Horiuchi *et al.* und Levine *et al.*

(83, 84). Dazu wurde das Penicillin G durch Öffnung des β -Lactam Rings kovalent an ein Carrier-Protein gebunden.

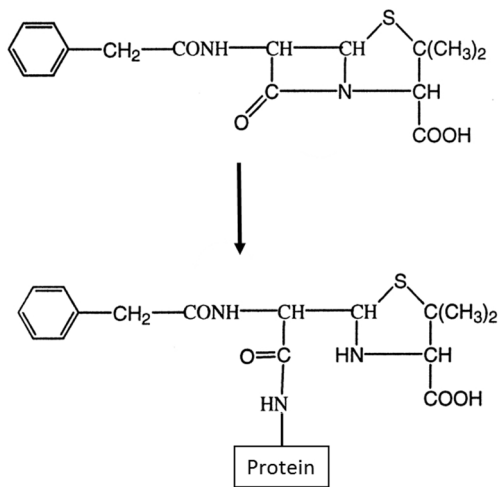


Abbildung 15: Kopplung von Penicillin G an ein Carrier-Protein (85).

1. 75 mg HSA und 0,5 g Penicillin G (Na^+) bzw. 25 mg LPH und 167 mg Penicillin G (Na^+) wurden in 7,5 mL bzw. 2,5 mL 10x PBS gelöst. Zur Kontrolle wurden die Carrier-Proteine ohne Zugabe von Penicillin G gelöst und wurden im Folgenden wie die Reaktionslösung behandelt.
2. Alle Ansätze wurden mit 0,1 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt.
3. Alle Ansätze wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert.
4. Es wurde der pH Wert der Ansätze gemessen und ggf. wieder mit 0,1 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt.
5. Die Ansätze wurden für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert.
6. Es wurde der pH Wert der Ansätze gemessen und jeweils der gesamte Ansatz gegen 2 L Carbonatpuffer bei 4 °C über 2 Tage und dreimaligem Pufferwechsel dialysiert.
7. Nach der Dialyse wurde das Volumen der einzelnen Ansätze bestimmt.

Mittels Dialyse wurde das nicht gekoppelte Penicilloyl G abgetrennt. Die Anzahl gekoppelter Penicilloyl G-Haptene an das jeweilige Carrier-Protein wurde mittels Penamaldete-Test bestimmt. Bei diesem Test wird die Wirkung von Quecksilber(II)-chlorid ausgenutzt, die zur Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 285 nm führt. Die verwendete para-Chlormercuribenzoessäure (PCMB) reagiert ausschließlich mit der Schwefelgruppe von gekoppeltem Penicillin, jedoch nicht mit freiem Penicilloyl G (84, 86).

Durchführung Penamaldate Test:

1. 0,54 g PCMB wurden in 0,1 M NaOH gelöst und mit 50 mM Carbonatpuffer (pH 9,2) auf 100 mL aufgefüllt.
2. Je 250 µL der Reaktions- und Kontrollansätze wurden dementsprechend in Carbonatpuffer verdünnt, sodass die Endkonzentration zwischen 0,2 mg/mL und 0,5 mg/mL lag (Endvolumen: mindestens 2 mL).
3. Von allen Ansätzen wurde die Absorption bei 285 nm gemessen.
4. Zu den jeweils 5 mL Ansätzen wurde je 100 µL PCMB-Lösung gegeben und die Absorption bei 285 nm erneut bestimmt.

Auswertung Penamaldate Test:

Tabelle 29: Absorptionsmessungen bei 285 nm für die Quantifizierung von gebundenen Penicilloyl G an HSA/LPH.

Ansatz	OD _{285nm} ohne PCMB	OD _{285nm} mit PCMB	Differenz
Penicillin-HSA / LPH	A	B	A-B
HSA / LPH Kontrolle	C	D	C-D

Die **Absorptionserhöhung**, die lediglich durch die gekoppelten Penicilloyl G Reste hervorgerufen wurde, wurde folgendermaßen berechnet: **(A-B) - (C-D)**

Die **Konzentration der Penicilloyl G Reste** ergibt sich durch die Division der **Absorptionserhöhung** durch den Extinktionskoeffizienten (84).

Die **Konzentration des Carrier-Proteins** ergibt sich durch die Division des Proteingehalts der verdünnten Lösung durch das MG des Carrier-Proteins.

Die durchschnittliche Anzahl Mole „Penicilloyl“ pro Mol Carrier-Protein ergibt sich aus:

$$\text{Konzentration der Penicilloyl G Reste} / \text{Konzentration des Carrier-Proteins}$$

4.4.2 Affinitätschromatografie

Die Affinitätschromatografie dient der Aufreinigung spezifischer Moleküle oder Molekülgruppen aus einem komplexen Molekülgemisch. Die Methode basiert auf spezifischen Interaktionen zwischen zwei Molekülen wie z.B. Enzym und Substrat, Rezeptor und Ligand oder Antikörper und Antigen. Dazu wird ein Interaktionsmolekül, der sogenannte Affinitätsligand, an eine feste Phase gebunden, während das zu isolierende Molekül in Lösung vorliegt. Die Verbindung

zwischen den Interaktionsmolekülen ist typischerweise reversibel, sodass das Zielmolekül, nachdem es während der Aufreinigung von dem Affinitätsliganden gebunden wurde, wieder durch Veränderung der Bedingungen von diesem gelöst werden kann (87).

Für die Aufreinigungen in dieser Arbeit wurde das Chromatographie System ÄKTA™ pure L von GE Healthcare (Software Unicorn™ 6.3) verwendet. Die ÄKTA™ pure L ist ein flexibles FPLC (Fast protein liquid chromatography) System zur schnellen Aufreinigung von Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren. Die Ausbeute des Zielproteins kann dabei vom Mikrogramm bis zum Gramm Bereich reichen.

4.4.2.1 Aufreinigung von Proteinen mit Polyhistidin-Tag

Die IMAC (immobilized metal-affinity chromatography) ist eine weit verbreitete Methode zur Aufreinigung von rekombinant hergestellten Proteinen mit Polyhistidin-Tag (His-Tag). IMAC basiert auf der Wechselwirkung zwischen Metallionen (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), welche an einer festen Phase immobilisiert sind, und dem Imidazol-Ring vom Histidin, der als Elektronen-Donor fungiert. Proteine mit aufeinanderfolgenden Histidinen werden daher an einer mit Metallionen immobilisierten Säule gebunden, während andere Komponenten weg gewaschen werden. Mittels der Zugabe von freiem Imidazol können die Proteine wieder von der Säule abgelöst (eluiert) werden (88).

Für die Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag aus Zellkulturüberständen wurden in dieser Arbeit die „HisTrap™ excel“ Säulen (1 mL Säulenvolumen) von GE Healthcare verwendet. Diese gebrauchsfertigen Nickel-Sepharose-Säulen sind speziell für die Aufreinigung aus Zellkulturüberständen vorgesehen, da die Aufreinigung aus größerer Menge Medium bei dieser Säule, im Gegensatz zu den meisten kommerziell erhältlichen Säulen, keine Ablösung der Metallionen zur Folge hat.

Der Zellkulturüberstand wurde bei 5000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, über einen 0,2 µM Filter filtriert und bei 4 °C über Nacht gelagert. Unmittelbar vor der Aufreinigung über die ÄKTA™ pure L wurde der Zellüberstand erneut filtriert.

Das Programm zur Aufreinigung von Zellüberständen wurde folgendermaßen angelegt:

Tabelle 30: Aufreinigungsprogramm von Proteinen mit Polyhistidin-Tag über „HisTrap™ excel“ Säule mittels ÄKTA™ pure L.

Phase	Puffer / Probe	Programmierung
Method Settings		<ul style="list-style-type: none"> - Einheitliche Flussrate in jeder Phase: 1 mL/min - Säulen Volumen: 0,962 mL - Pre column pressure limit: 0,5 MPa
Equilibration	Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 10 Säulenvolumina
Sample Application	Zellkultur-überstand	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 10 mL der Probe - Probenvolumen wird bei jeder Aufreinigung angepasst
Column Wash	Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 15 mL - Waschen der Säule mit 20 Säulenvolumina - Fraktionierung à 5 mL
Elution	Waschpuffer und Elutionspuffer	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 15 mL je Puffer - Elution der Probe: 0% bis 100 % Elutionspuffer über 20 Säulenvolumina - Fraktionierung à 1 mL
Equilibration	Elutionspuffer	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 5 Säulenvolumina
Equilibration II	Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 5 Säulenvolumina
Storage	20 % Ethanol	<ul style="list-style-type: none"> - Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 10 Säulenvolumina

Nach der Aufreinigung wurde die Säule, befüllt mit 20 % Ethanol und verschlossen, bei 2-8 °C bis zur nächsten Verwendung aufbewahrt. Anhand des Chromatogramms wurde entschieden, welche Fraktionen weiter im PAGE-Gel, Western Blot und / oder ELISA analysiert werden.

4.4.2.2 Aufreinigung allergenspezifischer Kaninchen-Antikörper

Die Seren von immunisierten Kaninchen wurde von Biogenes IgG-spezifisch aufgereinigt (siehe Kapitel 4.5.1). Nach Erhalt der Gesamt-IgG-Fraktion wurde diese nochmals allergenspezifisch aufgereinigt. Dazu wurden 1 mL „HiTrap™ NHS-activated HP“ Säulen von GE Healthcare verwendet. Diese Säulen binden primäre Amine kovalent an die *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) -aktivierte Sepharose und bilden stabile Amid-Verbindungen aus. Für jedes Allergen, das zur Immunisierung verwendet wurde, wurde daher eine Säule mit dem entsprechenden Allergen beschichtet.

Unmittelbar vor der Beschichtung der Säule mittels ÄKTA™ pure L wurde das Allergen, welches vorab ebenfalls zur Immunisierung verwendet wurde, in Kopplungspuffer zu 0,5 - 10 mg/mL verdünnt. Das verdünnte Allergen wurde vor Gebrauch filtriert (0,2 µm Filter).

Zur Vermeidung von Luftblasen wurde der obere Verschluss einer neuen „HiTrap™ NHS-activated HP“ Säule entfernt und ein Tropfen kalte 1 mM HCl-Lösung hinzu gegeben. Die Kopplung von Proteinen an die verwendete Säule wurde gemäß Gebrauchsanleitung der Säulen durchgeführt:

Tabelle 31: Kopplungsprogramm von Proteinen an eine HiTrap™ NHS-activated HP Säule mittels ÄKTA™ pure L.

Phase	Puffer / Probe	Programmierung
Method Settings		- Flussrate: 1 mL/min - Pre column pressure limit: 0,5 MPa
Column Preparation	Kalte HCl-Lösung	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 6 Säulenvolumina
Coupling	Verdünnte Allergenlösung	- Spülen des Systems mit 6 mL - Koppeln der Säule mit 2 Säulenvolumina
Incubation	-	- Inkubation der Allergenlösung für 30 min
Column Wash	Waschpuffer A und Waschpuffer B	- Spülen des Systems mit 15 mL je Puffer - Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumina Puffer A - Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumina Puffer B - Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumina Puffer A
Incubation	-	- Inkubation für 30 min
Column Wash	Waschpuffer A und Waschpuffer B	- Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumina Puffer B - Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumina Puffer A - Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumina Puffer B
Storage	Bindungspuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 10 Säulenvolumina

Nach der Kopplung wurde die Säule, befüllt mit Bindungspuffer und verschlossen, bei 2-8 °C bis zur Aufreinigung von allergenspezifischen Antikörpern aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Aufreinigung allergenspezifischer Antikörper aus IgG-gereinigten Kaninchenserum wurden diese 1/10 in PBS zu 30 mL verdünnt und durch einen 0,2 µM Filter filtriert. In jedes Fraktionsröhrchen wurden 50 µL Neutralisierungspuffer vorgelegt. Das Programm zur Aufreinigung von verdünnten Kaninchenserum wurde folgendermaßen angelegt:

Tabelle 32: Aufreinigungsprogramm von allergenspezifischen Antikörpern über eine mit Allergen beschichtete HiTrap™ NHS-activated HP Säule mittels ÄKTA™ pure L.

Phase	Puffer / Probe	Programmierung
Method Settings		- Flussrate: 1 mL/min - Pre column pressure limit: 0,5 MPa
Equilibration	Elutionspuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 6 Säulenvolumina
Column Preparation	Waschpuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 6 Säulenvolumina - Inkubation des Waschpuffers für 30 min (Blockierung freier Bindungsstellen)
Sample Application	Verdünntes Kaninchenserum	- Spülen des Systems mit 6 mL der Probe - Aufreinigung von 20 mL
Column Wash	Waschpuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Waschen der Säule mit 10 Säulenvolumina
Elution	Elutionspuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Elution der Probe mit 5 Säulenvolumina - Fraktionierung à 0,5 mL
Equilibration	Elutionspuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 5 Säulenvolumina
Storage	Bindungspuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 10 Säulenvolumina

Nach der Aufreinigung wurde die Säule, befüllt mit Bindungspuffer und verschlossen, bei 2-8 °C bis zur nächsten Aufreinigung aufbewahrt. Nach der Aufreinigung wurden die Fraktionen, die einen Peak im Chromatogramm zeigten, dialysiert (siehe Kapitel 4.4.4) und im ELISA analysiert.

4.4.3 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie ist eine Methode zur Separation von Proteinen aufgrund unterschiedlichem MG. In dieser Arbeit wurde eine „HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade“ Säule von GE Healthcare verwendet. Diese beinhaltet eine Dextran-Matrix mit stark vernetzter Agarose und ist geeignet für die Auftrennung von Proteinen mit einem MG zwischen 10 kDa und 600 kDa und daher geeignet zur Aufreinigung für alle in dieser Arbeit exprimierten Antikörper und Antikörper-Konstrukte (siehe Kapitel 3.3). Je kleiner das Protein in der Probe ist, desto länger verweilt es in der Säule, da es, im Gegensatz zu größeren Molekülen, in die dichteren Poren der Matrix eindringen kann. Die Aufreinigungseffizienz ist abhängig von der Größe des Zielproteins im Verhältnis zu dem MG der abzutrennenden Proteine (89). Die Gelfiltrationschromatografie wurde mit Proben durchgeführt, die nach IMAC keine ausreichende Reinheit zeigten.

Unmittelbar vor der Aufreinigung über die ÄKTA™ pure L wurde die Probe durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Das Programm für die Gelfiltration wurde folgendermaßen angelegt:

Tabelle 33: Aufreinigungsprogramm zur Gelfiltration mit „HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade“ Säule mittels ÄKTA™ pure L.

Phase	Puffer / Probe	Programmierung
Method Settings		- Flussrate: 1 mL/min - Pre column pressure limit: 0,3 MPa
Column Preparation	Gelfiltrationspuffer	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 0,1 Säulenvolumina
Sample Application	Unverdünnte Probe	- Aufgabe der Probe über einen Superloop - Aufreinigung von 1,5 mL
Elution	Gelfiltrationspuffer	- Elution der Probe mit 1 Säulenvolumen - Fraktionierung à 1,5 mL
Equilibration	Gelfiltrationspuffer	- Equilibrieren der Säule mit 1 Säulenvolumen
Storage	20 % Ethanol	- Spülen des Systems mit 15 mL - Equilibrieren der Säule mit 1 Säulenvolumen

Nach der Aufreinigung wurde die equilibrierte Säule, befüllt mit 20 % Ethanol und verschlossen, bei Raumtemperatur (20-25 °C) bis zur nächsten Aufreinigung aufbewahrt. Nach der Aufreinigung wurden die Fraktionen, die einen Peak im Chromatogramm zeigten, dialysiert (siehe Kapitel 4.4.4) und in SDS-PAGE, Western Blot und / oder ELISA analysiert.

4.4.4 Dialyse

Ein Pufferwechsel der Proben nach Chromatographie wurde mittels Dialyse durchgeführt. Dazu wurden die Proben in einen 14 kDa Dialyseschlauch überführt und gegen PBS mit 0,05 % (w/v) Natriumazid bei 2-8 °C dialysiert. Die Dialyse wurde nach 48 h und dreimaligem Pufferwechsel beendet.

4.4.5 Beschichtung von Mikrotiterplatten

Sowohl der Fc γ RI Rezeptor als auch Antikörper unterschiedlicher Spezies wurden adsorptiv in den Kavitäten von Mikrotiterplatten (96 well, MICROLON® 600, high binding) gebunden. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen des Rezeptors in PBS verdünnt, davon 300 μ L in jede Kavität überführt und für 24 h bei 2-8 °C inkubiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten mit einem Waschpuffer dreimal gewaschen, geleert, mit 300 μ L Nachbeschichtungslösung je Kavität befüllt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Nachbeschichtungspuffer abgesaugt, die Platten für 2 h bei 37 °C getrocknet und diese luft- sowie feuchtigkeitsdicht bei 2-8 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (90).

4.4.6 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Eine Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinen, DNA und RNA nach ihrem MG in einem elektrischen Feld (91).

Bei einer SDS-PAGE erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in einem Polyacrylamidgel, welches durch die Polymerisation von Acrylamid entsteht und über Methylbisacrylamid quervernetzt wird. Besteht das Polyacrylamidgel aus einem Sammel- und einem Trenngel, hat das Sammelgel die Aufgabe, die Proteine an der Front zum Trenngel zu konzentrieren. Das Trenngel trennt die Proteine gemäß ihrem MG auf. Die Acrylamidkonzentration in einem linearen Gel wird proportional zu dem MG des zu trennenden Proteins gewählt (34). Gradienten-Gele hingegen weisen einen Konzentrationsanstieg des Acrylamids innerhalb eines Gels auf, sodass ein größerer Trennbereich der Molmassen erzielt werden kann (92).

Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat im Proteingemisch werden fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb nativer Proteine zerstört. Zusätzlich binden die SDS-Anionen an die Proteine und sorgen bei der Elektrophorese für eine einheitliche Laufrichtung (Kathode zu Anode). Der Zusatz von Mercaptoethanol führt zur Reduktion von Disulfidbrücken innerhalb

eines Moleküls (34). Während der Elektrophorese werden die Komplexe aus SDS und denaturiertem Protein nach ihrem MG getrennt, wobei die im Verhältnis kleineren Moleküle schneller durch das Gel wandern, als die großen Moleküle.

Für die Auftrennung wurden sogenannte „pre-cast“ 4-20 %-ige Gradienten-Gele verwendet. Teilweise wurde die „Stain-free“ Variante dieser Gele verwendet. Diese Gele beinhalten eine Trihalogen-Komponente, welche die Tryptophan-Seitenketten der Proteine dementsprechend modifiziert, dass durch UV-Bestrahlung der Gele (nach der Gelelektrophorese) die Proteinbanden fluoreszieren. Diese Gele mussten somit zur Auswertung nicht angefärbt werden (93).

Die Proben wurden vor der Auftragung auf das Polyacrylamidgel in Probenpuffer (Laemmli Sample Buffer mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol) denaturiert. Zur Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde kein β -Mercaptoethanol dem Probenpuffer zugegeben. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Protein-Standard aufgetragen, der dazu dient, die Proteine anhand ihrer Größe zu identifizieren. Nach dem Einsetzen der Gele in die Biorad-Kammer, wurde diese mit Laufpuffer befüllt. Es wurde eine Spannung von 180 V für ca. 30 Minuten angelegt. Die Elektrophorese wurde spätestens gestoppt, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

4.4.7 Coomassie Blau-Färbung

Nach SDS-PAGE wurden die Proteinbanden mit einer Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbelösung visualisiert. Der Farbstoff bindet nicht-kovalent an die Seitenketten basischer AS (94). Die Nachweisgrenze für die Färbung liegt im Bereich von 0,1 - 2 μ g Protein pro Bande (74).

Das Gel wurde für mindestens eine Stunde in einer Färbeschale mit Färbelösung bedeckt. Das blaugefärbte Gel wurde anschließend für mehrere Stunden in ein Entfärbebad gegeben, bis die einzelnen Proteinbanden sichtbar wurden. Der Entfärber wurde je Bedarf mehrmals gewechselt.

4.4.8 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine Methode, neben Coomassie-Färbung und fluoreszierender Färbung, welche die Detektion von Proteinen nach einer Gelelektrophorese erlaubt (95). Switzer *et al.* beschrieben 1979 erstmals die Methode der Silberfärbung, die sich als eine äußerst sensitive Proteindetektion mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng bis 1 ng Protein pro Bande bewährt hat (96). Die Proteindetektion beruht auf der Bindung zwischen den Silberionen und den Aminosäureketten, hauptsächlich auf den Carboxylgruppen des Proteins, (97, 98) und anschließender Reduktion zu freiem Silber (99, 100). Die Proteinbanden werden an der Stelle im Gel sichtbar, an

der alkalische Formaldehyd das Ag^+ -Ion der Komplexe zu Ag reduziert (101). Der Ort der Bande lässt auf die Größe des Proteins und die Intensität auf die Menge des Proteins schließen.

Die Silberfärbung kann in zwei generelle Kategorien unterteilt werden: 1) Silberamin-Methode und 2) Silbernitrat-Methode (102).

Die Anfärbung der Proteine in dieser Arbeit erfolgte mit der Silbernitrat-Methode mittels dem „Silver Staining Kit“ von Invitrogen (99).

4.5 Immunologische Methoden

4.5.1 Kaninchen-Immunsierung

Die Immunsierungen wurden von Biogenes in Berlin durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Kaninchen mit einem Antigen immunisiert. Dabei wurden zwei unterschiedliche Immunsierungsstrategien ausgetestet.

Die Immunsierungen mit Bet v 1 wurden nach dem „Garantie“-Protokoll durchgeführt. Dieses beinhaltet folgende Leistungen:

- Auswahl von zwei Tieren, deren Seren keine Reaktion gegen das Antigen zeigen
- Immunsierung
- Auslieferung von mindestens 2 x 50 ml Antiserum mit einem garantierten Titer von 1/25.000.

Das „High-Speed“-Protokoll wurde für die restlichen Immunsierungen verwendet. Dieses Protokoll beinhaltet folgende Leistungen:

- Immunsierung
- Auslieferung von mindestens 2 x 20 ml Antiserum ohne garantierten Titer.

Konnten nach der ersten Serumabnahme (nach 28 Tagen) keine spezifischen Antikörper oder zu geringe spezifische IgG-Konzentrationen nachgewiesen werden, wurden die Tiere weitere Male geboostert und der Titer erneut bestimmt. War der Titer ausreichend hoch, wurden die Tiere nach einem finalen Boost ausgeblutet. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Immunsierungen wurde der Verlauf der Immunsierung (Anzahl der Boosterungen und Dauer der Immunsierung), in Abhängigkeit der Ergebnisse, individuell angepasst. Nach dem Ausbluten erhielt man von Biogenes die aufgereinigten Gesamt IgG Fraktionen (einschließlich Konzentrationsbestimmung) der Tiere.

4.5.2 Hühner-Immunsierung

Zwei Immunsierungen wurden von Ovalehn und eine Immunsierung von Biogenes (in Kooperation mit Agriseria) durchgeführt. Es wurde jeweils ein Huhn mit einem Antigen immunsiert. Immunglobulin Y (IgY) ist ein avianer Antikörper, der nach der Sekretion ins Blut in das Eigelb transportiert wird. Hühner produzieren diese Antikörperklasse als Schutz ihrer Brut gegen aviane Pathogene (103). Beide Anbieter immunsierten die Hühner dreimal im Abstand von vier Wochen und sammelten Hühnereier in einem bestimmten Zeitraum. Ovalehn sammelte Eier vor der Immunsierung, 5 Tage nach der ersten und zweiten Immunsierung und reinigte das Eigelb IgY-spezifisch auf. Ab einer Woche nach der letzten Immunsierung sammelte Ovalehn vier Wochen lang die Hühnereier und reinigte die IgY-Antikörper aus den gepoolten Eiern einer Woche auf (Sammelzeitraum I-IV). Biogenes reinigte IgY vor der ersten Immunsierung aus Preimmunserserum auf. Eine Woche nach der letzten Boosterung wurden 12 Hühnereier gesammelt, IgY aus dem gepoolten Eigelb aufgereinigt und die IgY-Konzentration bestimmt. Zusätzlich prüfte Biogenes die Reaktion der gereinigten Antikörper gegen das Antigen, welches zur Immunsierung verwendet wurde, im ELISA.

4.5.3 Immunoblot

Bei einem Immunoblot werden die Proteine eines Gels (z.B. PAGE-Gel) elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Geblottete Proteine lassen sich anschließend mit spezifischen Antikörpern nachweisen (104).

Der Transfer dient der Übertragung auf proteinbindende Oberflächen, auf denen Proteine für Reaktionen mit Makromolekülen leichter zugänglich sind als im dichten Netzwerk des Elektrophoresegels (105). Als proteinbindende Materialien eignen sich Nitrocellulose- (NC-), Polyvinylidendifluorid (PVDF-) oder Nylonmembranen, welche die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden (106). Beim SemiDry-Blotting-Verfahren, einer von Khyse-Andersen (1984) entwickelten Methode, ist das Gel-Membran-Sandwich zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden angeordnet. Diese Methode zeichnet sich durch einen schnellen Transfer bei konstanter Feldstärke und eine geringe benötigte Puffermenge aus (107).

Mithilfe der SemiDry-Blotting-Apparatur von Pharmacia wurden die Proteine aus dem PAGE-Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach dem Einlegen des Gels, der Membran und der Blottpapiere wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 65 mV für 75 Minuten auf der Membran immobilisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurden vor der Durchführung der Immunreaktion unspezifische Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung (Inkubation: 3 h) möglichst vollständig abgesättigt (104). Die auf der blockierten Membran

gebundenen aufgereinigten Antikörper oder Adapter-Moleküle wurden je nach nachzuweisendem Fc-Fragment für 1 h mit anti-IgE- oder anti-IgG-HRP inkubiert oder es wurde der His-Tag der zu exprimierenden Proteine mittels anti-Polyhistidin-Tag-HRP nachgewiesen. Überschüssiges Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Der Nachweis erfolgte mit präzipitierendem TMB.

4.5.4 Dot Blot

Bei einem Dot Blot werden Proteine auf eine Membran gebunden, um Antigen-Antikörper-Bindungen zu analysieren. Im Gegensatz zum Immunoblot werden die Proteine zuvor nicht durch eine Elektrophorese getrennt (104).

Mittels Dot Blot wurden die Kaninchen- und Hühner-Immunsierungen überprüft. Dazu wurde das Allergen oder der Allergenextrakt, mit dem immunisiert wurde, auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert (0,5 - 1,0 µL) und der sogenannte „Dot“ für 10 Minuten getrocknet. Auch bei dieser Blotting-Methode wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung möglichst vollständig abgesättigt (104). Die Kaninchen- bzw. Hühnerproben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen für 3 h mit der Membran inkubiert. Überschüssiges Probenmaterial wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Folgend wurde die Membran mit anti-rabbit IgG-HRP oder anti-chicken IgY-HRP für 1 h inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch einen zweiten Waschschrift entfernt. Der Nachweis erfolgte mit präzipitierendem TMB.

4.5.5 Nachweis von Antikörper-Interaktionen mit FcγRI

Mit FcγRI beschichtete Mikrotiterplatten wurden einerseits für den Nachweis von IgG1 und IgG4 im Zellkulturüberstand sowie im Eluat nach Affinitätschromatographie, andererseits für die Analyse der Bindungsaffinitäten zwischen den unterschiedlichen IgG1-Mutationen und dem Rezeptor genutzt.

Zellkulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt, während die Proben nach Affinitätschromatographie teilweise in PBS mit BSA verdünnt wurden. Es wurden 50 µL der Probe (verdünnt oder unverdünnt) je Kavität überführt und für 1 h bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert. Nicht-gebundene Komponenten aus der Probe wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und jede Kavität mit 100 µL anti-IgG HRP (Goat anti-human IgG) für 30 min bei 20-25 °C inkubiert. Die Kavitäten wurden wie oben beschrieben erneut gewaschen und mit 100 µL TMB One Substrat befüllt. Nach 15 min bei 20-25 °C wurde die Farbreaktion mit H₂SO₄ gestoppt,

und die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes wurde bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen (108).

4.5.6 Total-IgE-HRP EIA

Der Total-IgE-HRP Enzym-Immuno-Assay (EIA) dient der Konzentrationsbestimmung von Gesamt-IgE in humanem Serum oder Plasma (109).

Die einzelnen Kavitäten einer Mikrotiterplatte sind mit anti-human-IgE beschichtet, wodurch die Gesamt-IgE-Fraktion aus der Probe gebunden wird. Nach einem Waschschrift wird das Gesamt-IgE mittels anti-human-IgE HRP detektiert, welches nach einem zweiten Waschschrift das farblose Substrat 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit H₂SO₄ schlägt die Farbe nach gelb um, und die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes wird bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Die IgE-Konzentration der Probe wird anhand einer WHO 75/502 kalibrierten Standardkurve in IU/mL umgewandelt. Der EIA erfasst IgE-Konzentrationen im Bereich von 5 IU/mL bis 1000 IU/mL (109). Die Testdurchführung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung „Total-IgE-HRP EIA“ (REF: 08102CP) beschrieben (109).

4.5.7 ImmunoCAP®

Der ImmunoCAP® der Firma ThermoScientific ist ein Immuntest zum Nachweis von Immunglobulin E. In diesem System erfolgt der Nachweis von sIgE, indem das zu untersuchende Allergen irreversibel an ein Zellulosederivat, in Form einer Kapsel, gebunden wird. Zur Bestimmung des Gesamt-IgEs aus einer Patientenprobe wird dieses durch kovalent gebundenes anti-IgE an den Kapseloberflächen abgefangen. Die ImmunoCAP® Technologie basiert auf einer extrem hohen Gesamtbindefähigkeit, die durch die hohe Bindekapazität der Cellulose in der festen Phase erreicht wird (110).

Das interessierende Allergen, kovalent an ImmunoCAP® gebunden, reagiert mit dem spezifischen IgE in der Patientenprobe. Nachdem die unspezifischen IgE gewaschen wurden, wird β -Galaktosidase-anti-IgE hinzugefügt, um einen Komplex zu bilden. Nach der Inkubation wird ungebundenes Enzym-Anti-IgE abgewaschen und der gebundene Komplex mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wird die Fluoreszenz des Eluats gemessen. Je höher der Signalwert, umso mehr spezifisches IgE ist in der Probe vorhanden. Um die Testergebnisse auszuwerten, werden die Messsignale der Patienten-

proben mithilfe einer Kalibrationskurve in Konzentrationen umgewandelt (111). Die Testdurchführung erfolgte in einem externen Labor in Berlin (Institut für Medizinische Diagnostik Berlin, Nikolaistr. 22, D-12247 Berlin).

4.5.8 Spezifisches IgE, REAST

Der spezifische IgE REAST (*reversed enzyme allerge sorbent test*) wird zur Konzentrationsbestimmung von sIgE in humanem Serum oder Plasma eingesetzt und trägt zur Diagnose von Typ I Allergien bei. Die Grundlage bilden dabei anti-human IgE-beschichtete Mikrotiterplatten in Kombination mit biotinylierten Reagenzien (112).

Der Test wird in Mikrotiterplatten durchgeführt, bei denen die einzelnen Kavitäten mit anti-human-IgE beschichtet sind. Nachdem die Gesamt-IgE-Fraktion aus der Probe gebunden ist, werden biotinylierte Allergene in den einzelnen Kavitäten inkubiert. Die Detektion der spezifisch gebundenen Allergene erfolgt über ein Streptavidin/HRP-Konjugat, welches das farblose Substrat TMB zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit H₂SO₄ schlägt die Farbe nach gelb um, und die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes wird bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Als Referenz dienen Kalibratoren mit bekannten IgE-Konzentrationen (kalibriert an WHO75/502). Anhand der ODs der Kalibratoren wird eine Standardkurve ermittelt, mit deren Hilfe die unbekanntes IgE-Konzentrationen der Proben ermittelt werden können. Angegeben wird die IgE-Konzentration in IU/mL wobei ein IU ungefähr 2,4 ng IgE entspricht. Die ermittelten Konzentrationen werden in die folgenden Klassen unterteilt:

Tabelle 34: Internationale Bewertung der sIgE Konzentrationen.

Klasse	IU/mL	Spez. IgE-Konz.
6	≥ 100	Extrem positiv
5	50-100	Sehr stark positiv
4	17,50-50,00	Stark positiv
3	3,50-17,50	Deutlich positiv
2	0,70-3,50	Mäßig positiv
1	0,35-0,70	Niedrig
0	< 0,35	Nicht nachweisbar

Da die IgE-Konzentrationen beim ImmunoCAP® in kU/L angegeben werden, bedarf es keiner Umrechnung der Einheiten zwischen den beiden Methoden. Die Testdurchführung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung „Spezifisches IgE REAST“ (REF: 0520960 FL) beschrieben (112).

4.5.9 Weitere ELISA Systeme

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere ELISA Systeme von Dr. Fooke Laboratorien verwendet:

- **IgG4 - ELISA**, Enzym Immuno Assay zur quantitativen Bestimmung von spezifischem IgG4 in humanem Serum oder Plasma
- **IgG - ELISA**, Enzym Immuno Assay zur quantitativen Bestimmung von spezifischem IgG in humanem Serum oder Plasma
- **dsDNA ELISA**, ELISA für die semi-quantitative Bestimmung von anti-dsDNA-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma

Die in den Kits enthaltenen Mikrotiterplatten sind mit Allergenen (IgG4 und IgG ELISA) oder dsDNA (dsDNA ELISA) beschichtet. Nach der Probeninkubation werden die Reaktionen mit HRP konjugierten anti-IgG bzw. anti-IgG4-Antikörpern und TMB nachgewiesen. Die ermittelten Konzentrationen werden folgendermaßen interpretiert:

Tabelle 35: Interpretation der ermittelten Konzentrationen im IgG4 -, IgG - und dsDNA ELISA.

IgG4-ELISA		IgG-ELISA		dsDNA ELISA	
U/mL	Interpretation	U/mL	Interpretation	RU	Interpretation
< 100	negativ	< 1,0	negativ	< 1,0	negativ
100-200	grenzwertig	1,0-2,0	grenzwertig	1,0-1,5	grenzwertig
> 250	positiv	2,0-3,5	positiv	> 1,5	positiv
		> 3,5	Stark positiv		

4.5.10 Allergy Lateral Flow Assay

Der Allergie Lateral Flow Assay (ALFA) ist ein Schnelltest zur qualitativen Bestimmung von sIgE in humanem Serum, Plasma oder Vollblut (20).

Für die Testung wird das Probenmaterial in die Probenauftragsstelle des Basis Sets pipettiert und direkt anschließend die gewünschte Allergenlösung zugegeben. Während der Inkubationszeit von 20 min wird die Flüssigkeit aufgrund von Kapillarkräften durch die Testeinheit gezogen. Ein Komplex aus spezifischem IgE und biotinyliertem Allergen bindet an ein immobilisiertes Fänger-molekül (Streptavidin-Derivat) an der Test-Linie (T). Gleichzeitig löst sich das reversibel gebundene Maus anti-human IgE Gold Konjugat (anti-IgE Konjugat) vom Konjugatfilter und bindet an das sIgE der Probe. Dabei ist die Farbintensität an der Testlinie proportional zur Menge der Immunkomplexe aus Ligand-markierten Antigenen, sIgE und anti-IgE Konjugat. Nicht-gebundenes Konjugat wird an der Kontrolllinie (anti-mouse IgG) zurückgehalten und bildet innerhalb der Inkubationszeit eine dunkel-rote Linie aus (113).

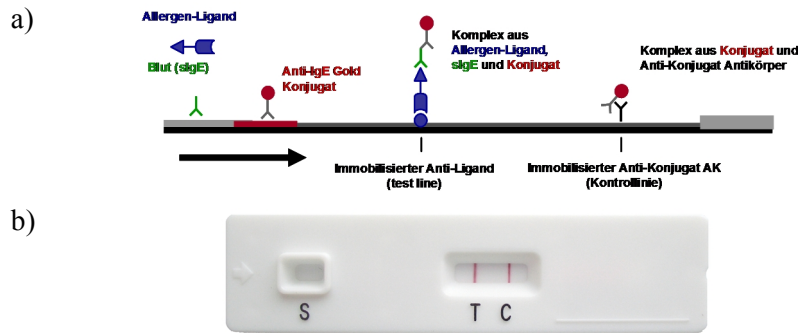


Abbildung 16: a) Prinzip ALFA, b) Beispiel einer Testkassette mit positivem Ergebnis (114).

Mittels speziellem Reader wird die Intensität der Testlinie analysiert. Dabei korreliert die Farbintensität der Testlinie mit der sIgE-Konzentration in der Probe. Die ermittelten Konzentrationen werden in U/mL angegeben und analog zu den ELISA-Systemen in Klassen unterteilt (siehe Tabelle 34). Die Testdurchführung erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung „ALFA Basis Set“ (REF: 1800010 / 184000) beschrieben (113).

4.6 Statistik und analytische Methoden

Die **Spearman Korrelation** wird zum quantitativen Vergleich zweier unterschiedlicher Gruppen eines Parameters verwendet. Basierend auf den Unterscheidungen kann auf eine Korrelation oder auf keine Korrelation der beiden Gruppen geschlossen werden.

Eine Korrelation legt den Grad des Zusammenhangs zweier betrachteter Kriterien fest. Der Spearman Korrelations-Koeffizient ist äquivalent zum Pearson Korrelations-Koeffizient „ r “. Der Korrelations-Koeffizient „ r “ oder „Pearsons r “ misst die Stärke einer linearen Beziehung zwischen zwei Variablen (Messbereich von +1 bis -1). Man spricht von einer perfekten Korrelation bei einem Koeffizient von +1 oder -1.

Wenn keine Gaußsche Normal-Verteilung oder einheitliche Skalierung vorliegt, führt eine Pearson Korrelation zu einem falschen Ergebnis. In diesem Fall wird eine Spearman Korrelation eingesetzt, da dieser Koeffizient nicht mit den originalen Werten (X_i, Y_i) kalkuliert wird. Der Spearman Koeffizient ersetzt die Werte einer jeden Messung durch einen Rang (x_i, y_i) relativ zu den anderen Messungen. Anhand der originalen Werte werden die Ränge separat voneinander bestimmt.

Da die Spearman Korrelation kein parametrischer Test ist, ist eine Normalverteilung der Messdaten nicht zwingend notwendig. Diese Korrelation kann, im Gegensatz zu parametrischen Tests, auch bei anders verteilten Werten angewendet werden.

Der Spearman Koeffizient ρ (rho) kann auf der Basis der Differenz der beiden Ränge durch folgende Formel berechnet werden:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

Formel 2: Berechnung des Spearman Koeffizienten ρ .

mit:

d_i = die Differenz zwischen den Rängen von x_i und y_i einer Beobachtung und
 n = Anzahl der Wertepaare.

Es besteht eine gute Korrelation, wenn alle Werte näherungsweise als eine gerade Linie, auch Regressionsgerade genannt, beschrieben werden können (115, 116).

Der **Student's t-test** bezeichnet eine statistische Methode, bei der eine t-Verteilung verwendet wird. Dieser Test ist nach William Gossets Pseudonym „Student“ benannt und vergleicht die Mittelwerte zweier Proben, wobei er von einer Normalverteilung der Daten innerhalb jeder Gruppe sowie von einer ähnlichen Varianz in beiden Gruppen ausgeht.

Die studentische t-Verteilung vergleicht die Mittelwerte zweier Werte und entscheidet, ob die ermittelte Differenz zwischen den beiden Gruppen signifikant ist.

Der Test wird für unabhängige Proben benutzt, egal ob die Proben aus zwei unterschiedlichen Populationen stammen oder Einzelwerte aus derselben Population ausgewählt wurden. Für den t-Test benötigt man eine Regelgröße und eine Messgröße. Anhand der Regelgröße, die aus zwei Parametern besteht (z.B. positiv und negativ), werden die Werte der Messgröße in zwei Gruppen eingeteilt und verglichen. Für die Durchführung der t-Verteilung ist keine gleiche Anzahl von Datenpunkten in den Gruppen nötig.

Die zwei Gruppen ergeben mit dem t-Test folgende Statistik t:

$$t = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \div \sqrt{A * B}$$

Wobei,

$$A = (n_1 + n_2) \div n_1 n_2 ,$$

und

$$B = [(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2] \div [n_1 + n_2 - 2]$$

Formel 3: Berechnung der t-Verteilung.

—
 \bar{x} bezeichnet den Mittelwert der jeweiligen Gruppen und s die Standardabweichung. Je höher der Wert der t-Verteilung ist, umso sicherer ist das Vorliegen einer Differenz.

Bei dieser statistischen Methode wird eine Nullhypothese (p-Value) vorausgesetzt. Die Nullhypothese sagt aus, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen den zwei Gruppen besteht. Eine Wahrscheinlichkeitstabelle, basierend auf der t-Verteilung, gibt den Grenzwert für eine Signifikanz bei verschiedenen Freiheitsgraden wieder. Der Freiheitsgrad n beschreibt die bei einer Stichprobe durchgeführten Beobachtungen, verringert um die Anzahl der aus der Stichprobe geschätzten Parameter. Ist kein Grenzwert für die Signifikanz festgelegt, wird ein Wahrscheinlichkeitswert (*p-Value*) von unter 0,05 als signifikant bezeichnet (116).

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der zur Immunisierung eingesetzten Allergene

Folgende Allergene wurden für Auftrags-Immunisierungen ausgewählt:

- **Proteine aus der Kuhmilch:** α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin, Casein,
- **Saisonales Inhalationsallergen:** rekombinantes Bet v 1 als Haupt-Allergen der Birke,
- **Antibiotika:** Penicilloyl G-LPH-Konjugat als immunogene Form des Penicillins,
- **Haselnuss:** *Corylus avellana* als Beispiel für eine Immunisierung mit Nüssen,
- **Hausstaubmilbe:** *Dermatophagoides pteronyssinus* als Vertreter der Hausstaubmilbe,
- **Schimmelpilz:** *Aspergillus fumigatus* als Beispiel für eine Immunisierung mit Schimmelpilzen,
- **Latex:** Verschiedene rekombinant hergestellte Allergene von *Hevea brasiliensis*.

Es wurden mit allen Antigenen jeweils zwei Kaninchen immunisiert. Die Immunisierungen mit Casein, Bet v 1 und Penicilloyl G-LPH wurden parallel mit Kaninchen und Hühnern durchgeführt. Die Kaninchen-Immunisierungen sowie die Immunisierung eines Huhns mit Penicilloyl G-LPH wurden von Biogenes durchgeführt. Die Hühner-Immunisierungen mit Casein und Bet v 1 wurden von Ovalehn durchgeführt.

Zur Immunisierung mit α -Laktalbumin (f76), β -Laktoglobulin (f77) und Bet v 1 wurden kommerziell erhältliche Komponenten ohne weitere Prozessierung verwendet (siehe Tabelle 4).

Da in einer Studie von Bernard *et al.* 85 % der untersuchten Kuhmilchallergiker IgE-Reaktionen gegen jedes der vier Caseine (α -s1 Casein, α -s2 Casein, β -Casein und κ -Casein) (117) zeigten, wurden diese in nativer, gereinigter Form entsprechend ihrem Mengenverhältnis in der Milch zur Immunisierung von zwei Kaninchen und einem Huhn verwendet.

Tabelle 36: Mengenverhältnis der Casein Subklassen in Kuhmilch.

Subklasse	Allergenbezeichnung	MG (kDa)	g Protein/L Kuhmilch
α -s1 Casein	Bos d 9	25	12-15
α -s2 Casein	Bos d 10	26	3-4
β -Casein	Bos d 11	25	9-11
κ -Casein	Bos d 12	21,2	2-4

Penicilloyl G wurde vor der Immunisierung an LPH gekoppelt. Zum Nachweis von spezifischen Kaninchen-IgG- und Hühner-IgY-Antikörpern gegen Penicilloyl G wurde später Penicilloyl G gekoppelt an HSA verwendet.

Bestimmung der gebundenen Mol Penicilloyl G/Mol LPH mittels Penamaldate Test

Die Reaktions- und Kontrolllösung wurden 1/10 in Carbonatpuffer verdünnt und die Absorption vor sowie nach Zugabe von PCMB bei 285 nm in einer Küvette mit 1 cm Durchmesser bestimmt.

Tabelle 37: Absorptionsmessung der Reaktions- und Kontrolllösung bei 285 nm vor und nach Zugabe von PCMB für die Quantifizierung von gebundenem Penicilloyl G an LPH.

	OD 285 nm ohne PCMB	OD 285 nm mit PCMB	Differenz
Reaktionsansatz	0,277	0,392	0,115
Kontrollansatz	0,221	0,258	0,037
			0,078

Die Division der Absorptionserhöhung durch den Extinktionskoeffizienten ($23800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ergibt die molare Konzentration an gebundenem Penicilloyl G in der Lösung:

Gebundenes Penicilloyl G an LPH: $3,277 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

Die Division des Proteingehaltes der verdünnten Lösung (25 mg LPH / 10 mL (Volumen nach Dialyse) / 10 (Verdünnungsfaktor vor OD Messung): **0,25 mg/mL LPH**) durch das MG des LPHs (600 kDa) ergibt die molare Konzentration des Carrier-Proteins in der Lösung:

LPH Konzentration in der Lösung: $4,167 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

Menge Penicillin/mol LPH: **7,87 mol**

Bestimmung der gebundenen Mol Penicilloyl G/Mol HSA mittels Penamaldate Test

Die Bestimmung der Mol Penicilloyl G/Mol HSA erfolgte analog zu der Bestimmung der Mol Penicilloyl G/Mol LPH. Pro Molekül HSA wurden durchschnittlich 7,40 Moleküle Penicilloyl G gebunden.

Zur Analyse der Proteinzusammensetzung von *Dermatophagoides pteronyssinus* Extrakt (d1), *Aspergillus fumigatus* Extrakt (m3), Haselnussextrakt (f17) und *Hevea brasiliensis* Extrakt (k82) wurden mittels SDS-PAGE verschiedene Chargen der jeweiligen Extrakte aufgetrennt.

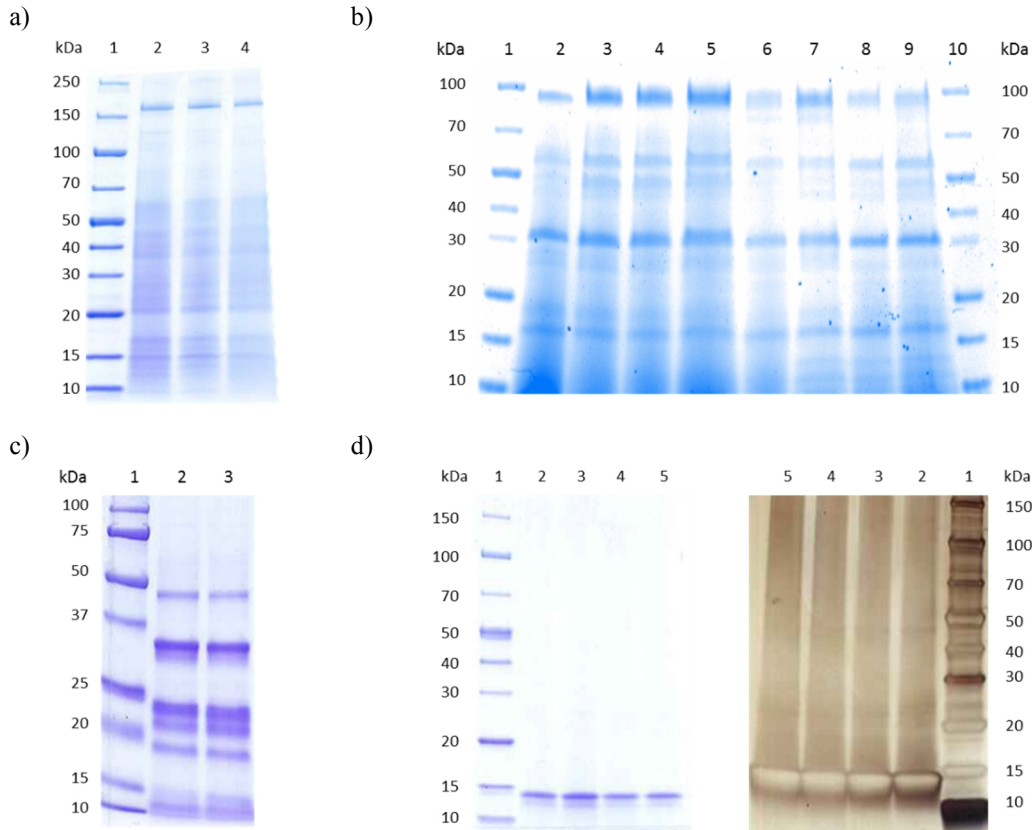


Abbildung 17: Verschiedene Allergenextrakte, aufgetragen in 4 - 20 % Gradienten-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie Blau-Färbung und Silberfärbung. a) d1: Es wurden je Extrakt 2,5 µg in das Gel überführt. Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (5 µL aufgetragen), Spur 2: d1 Extrakt lot 118, Spur 3: d1 Extrakt lot 119, Spur 4: d1 Extrakt lot 120. **b) m3:** Es wurden je Extrakt 2,4 µg in das Gel überführt. Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (5 µL aufgetragen), Spur 2: m3 Extrakt lot 228, Spur 3: m3 Extrakt lot 233, Spur 4: m3 Extrakt lot 236, Spur 5: m3 Extrakt lot 238, Spur 6: m3 Extrakt lot 239, Spur 7: m3 Extrakt lot 241, Spur 8: m3 Extrakt lot 242, Spur 9: m3 Extrakt lot 243. **c) f17:** Es wurden je Extrakt 2,5 µg in das Gel überführt. Spur 1: Protein Standard: Precision PlusProtein™ Unstained (5 µL aufgetragen), Spur 2: Haselnussextrakt lot 1, Spur 3: Haselnussextrakt lot 2. **d) k82:** Es wurden je Extrakt 20 µg in das Gel überführt. Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (5 µL aufgetragen), Spur 2: k82 Extrakt lot 38, Spur 3: k82 Extrakt lot 38b, Spur 4: k82 Extrakt lot 39, Spur 5: k82 Extrakt lot 39b.

Die drei Chargen des *Dermatophagoides pteronyssinus* Extraktes zeigten schwache und größtenteils unscharfe Banden über den gesamten Größenbereich (Spalte 2 bis 4). Die stärkste Bande war bei ca. 150 kDa zu sehen. Da alle d1-Chargen ein nahezu identisches Bandenmuster zeigten, wurde die Immunisierung von zwei Kaninchen mit lot 118 durchgeführt.

Die acht Chargen des m3 Extraktes zeigten mehrere Banden auf gleicher Höhe zwischen ca. 10 kDa und 100 kDa (Spalte 2 bis 9). Die stärksten Banden waren jeweils bei ca. 30 kDa und 100 kDa zu sehen. Weitere eindeutige Banden waren zwischen 15 kDa und 20 kDa sowie

zwischen 50 kDa und 70 kDa zu erkennen. Unscharfe Banden waren insgesamt zwischen 10 kDa und 70 kDa zu sehen. Alle aufgetragenen Chargen zeigten ein nahezu identisches Bandenmuster. Ein unterschiedliches Bandenmuster war im Größenbereich von 50 kDa bis 70 kDa zu erahnen. Da unter anderem bei der m3 lot 233 (Spur 3) in diesem Bereich, im Gegensatz zu anderen Chargen, eindeutig zwei Banden zu erkennen waren, wurde diese Charge für die Immunisierung eingesetzt.

Die beiden Chargen des Haselnussextraktes zeigten mehrere Banden auf gleicher Höhe zwischen ca. 10 kDa und 50 kDa (Spalte 2 und 3). Die stärksten Banden waren jeweils zwischen 20 kDa und 25 kDa und zwischen 25 kDa und 37 kDa zu sehen. Zusätzlich waren Banden auf der Höhe von ca. 10 kDa, 20 kDa und 50 kDa zu erkennen. Da beide Haselnussextrakt-Chargen ein nahezu identisches Bandenmuster zeigten, wurde die Immunisierung von zwei Kaninchen mit Lot 1 durchgeführt.

Alle Chargen des k82 Extraktes zeigten sowohl im Coomassie gefärbten als auch Silber gefärbten PAGE-Gel jeweils eine Bande unterhalb von 15 kDa (siehe Abbildung 17). Aufgrund der fehlenden Proteinbanden wurden die Immunisierungen von zwei Kaninchen mit den rekombinanten *Hevea brasiliensis* Allergenen Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8 von Biomay durchgeführt. Zur Immunisierung wurde eine Mischung der Allergene verwendet, wobei jedes Protein in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde.

5.2 Analyse der Reaktivität spezifischer, tierischer Antikörper

5.2.1 α -Laktalbumin und β -Laktoglobulin

91 Tage nach Beginn der Immunisierung wurde das gesamte Serum der Tiere gewonnen und die Gesamt-IgG Fraktionen im Dot Blot auf Reaktionen gegen das jeweilige Allergen analysiert.

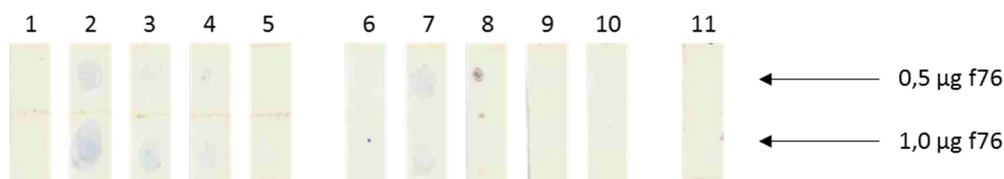


Abbildung 18: Charakterisierung der f76-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenserum 91 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunsersum 23457 (1/5.000), Streifen 2-5: Gereinigte IgG-Antikörper aus 23457-91 (1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 und 1/40.000), Streifen 6: Präimmunsersum 23458 (1/5.000), Streifen 7-10: Gereinigte IgG-Antikörper aus 23458-91 (1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 und 1/40.000), Streifen 11: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei α -Laktalbumin (f76) Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,5 μ g und 1 μ g). Die Gesamt-IgG Fraktion, aufgereinigt aus dem Serum 23457-

91, zeigte bis zu einer Verdünnung von 1/10.000 schwache Signale gegen die Allergenspots. Die aufgereinigten Antikörper aus Serum 23458-91 zeigten nur bei der stärksten Konzentration schwache Signale. Streifen 1 (Präimmunserum 23457), Streifen 6 (Präimmunserum 23458) und Streifen 11 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

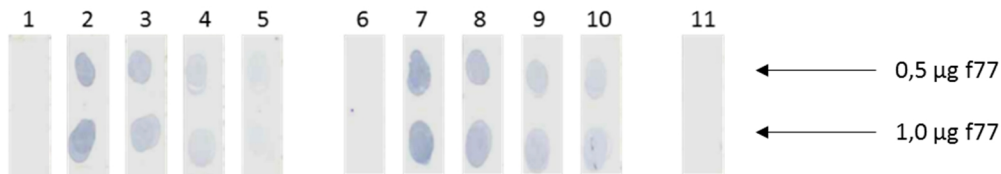


Abbildung 19: Charakterisierung der f77-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenseren 91 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunserum 23459 (1/5.000), Streifen 2-5: Gereinigte IgG-Antikörper aus 23459-91 (1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 und 1/40.000), Streifen 6: Präimmunserum 23460 (1/5.000), Streifen 7-10: Gereinigte IgG-Antikörper aus 23460-91 (1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 und 1/40.000), Streifen 9: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei β -Laktoglobulin (f77) Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,5 μ g und 1 μ g). Die Gesamt-IgG Fraktionen, aufgereinigt aus beiden Seren, zeigten bis zu einer Verdünnung von 1/40.000 Signale gegen die Allergenspots. Die Intensitäten der Spots innerhalb eines Streifens waren vergleichbar. Streifen 1 (Präimmunserum 23459), Streifen 6 (Präimmunserum 23460) und Streifen 11 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

5.2.2 Casein

Casein-spezifisches Kaninchen-IgG

140 Tage nach Beginn der Immunisierung wurde das Serum gewonnen und das Gesamt-IgG im Dot Blot auf Reaktionen gegen die Casein-Subklassen und das Casein-Gemisch (f78) analysiert.

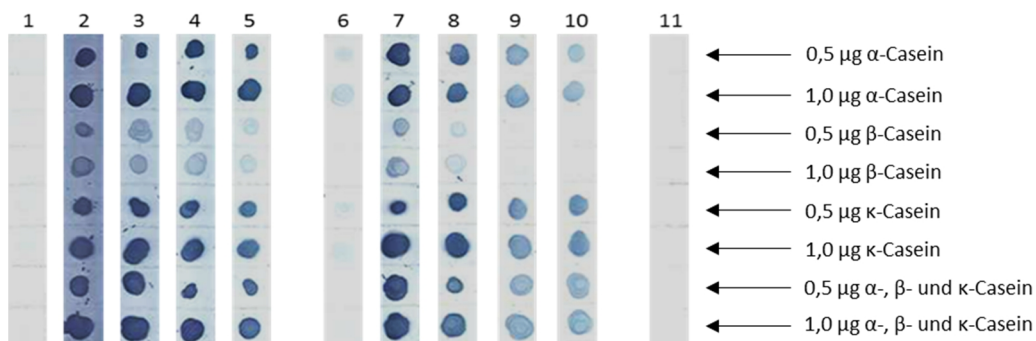


Abbildung 20: Charakterisierung der f78-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenseren 140 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunserum 22057 (1/1.000), Streifen 2-5: Gereinigte IgG-Antikörper aus 22057-140 (1/1.000, 1/5.000, 1/10.000 und 1/20.000), Streifen 6: Präimmunserum 22058 (1/1.000), Streifen 7-10: Gereinigte IgG-Antikörper aus 22058-140 (1/1.000, 1/5.000, 1/10.000 und 1/20.000), Streifen 9: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befand sich an Position 7 und 8 das Casein-Gemisch, welches zur Immunisierung verwendet wurde. Gegen dieses Gemisch zeigten die IgG-gereinigten Antikörper beider Antiseren starke Reaktionen bis zu einer 1/20.000 Verdünnung. Die Reaktionen gegen die Subklassen α -Casein und κ -Casein waren ähnlich stark. Bis zu der höchsten Verdünnung zeigten auch die gereinigten Antikörper aus dem Antiserum 22057 Signale auf β -Casein. Reaktionen auf β -Casein konnten für die Antikörper des Kaninchens 22058 nur bis zu einer 1/5.000 Verdünnung nachgewiesen werden. Streifen 1 (Präimmunserum 22057) und Streifen 11 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots, hingegen waren auf Streifen 6 (Präimmunserum 22058) schwache Signale gegen α -Casein und κ -Casein sichtbar.

Casein-spezifisches Hühner-IgY

Nach Erhalt der Proben von Ovalehn wurden diese im Dot Blot auf Reaktionen gegen die Casein-Subklassen und das Casein-Gemisch analysiert.

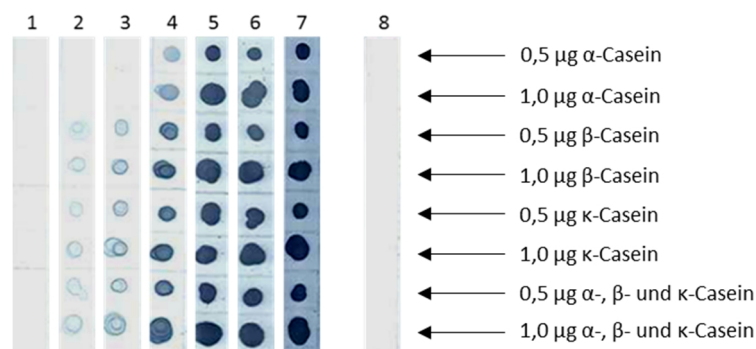


Abbildung 21: Charakterisierung der f78-spezifischen Antikörper im Dot Blot. IgY-Antikörper wurden aus Hühnereigelb isoliert und die Proben jeweils 1/500 verdünnt. Streifen 1: Probe vor Immunisierung, Streifen 2: 5 Tage nach 1. Immunisierung, Streifen 3: 5 Tage nach 2. Immunisierung, Streifen 4: Sammelzeitraum I, Streifen 5: Sammelzeitraum II, Streifen 6: Sammelzeitraum III, Streifen 7: Sammelzeitraum IV, Streifen 8: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befand sich an Position 7 und 8 das Casein Gemisch, welches zur Immunisierung verwendet wurde. Gegen dieses Gemisch sowie gegen β und κ Casein waren bereits Reaktionen nach der 1. Immunisierung bei der getesteten Verdünnung zu sehen (siehe Abbildung 21, Streifen 2). Die Proben der Sammelzeiträume (Streifen 4-7) zeigten Signale auf alle Casein-Subklassen, wobei die Probe vom Sammelzeitraum I (Streifen 3) gegen das α Casein eine geringere Reaktion zeigte. Ab dem Sammelzeitraum II (Streifen 4) waren die Reaktionen auf die einzelnen Subklassen ähnlich stark. Anhand des Dot Blots konnte weder eine Reaktion der Präimmunisierungsprobe noch des Konjugats (Streifen 1 und 8) gegen die Casein-Subklassen detektiert werden.

5.2.3 Bet v 1

Bet v 1-spezifisches Kaninchen-IgG

28 Tage nach Immunisierung wurde durch Biogenes je 25 mL Serum von beiden Tieren gewonnen und der Titer gegen Bet v 1, beschichtet auf Mikrotiterplatten, bestimmt. Biogenes konnte einen Titer von 1/200.000 für beide Antiseren bestimmen. Da die Immunisierungen mit Bet v 1 nach dem „Garantie“-Protokoll durchgeführt wurden und dieses Protokoll die Auslieferung von 2 x 50 mL Antiserum beinhaltet, wurden die Tiere einem verlängerten Immunisierungsprotokoll unterzogen. 133 Tage nach Beginn der Immunisierung wurde das gesamte Serum des Tieres 22163 gewonnen und die Gesamt-IgG-Fraktion aufgereinigt. Das Tier 22164 verstarb nach 105 Tagen, vor Abschluss des geplanten Immunisierungsprotokolls. Die gewonnenen 30 mL Antiserum wurden nicht IgG-spezifisch aufgereinigt. Die Proben wurden im Dot Blot auf Reaktionen gegen Bet v 1 analysiert.

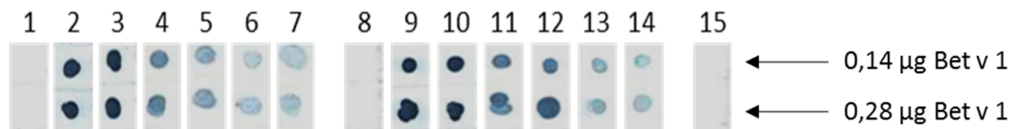


Abbildung 22: Charakterisierung der Bet v 1-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenseren 133 und 105 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunsereum 22163 (1/5.000), Streifen 2-7: Gereinigte IgG-Antikörper aus 22163-133 (1/5.000, 1/10.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/200.000, 1/400.000), Streifen 8: Präimmunsereum 22164 (1/5.000), Streifen 9-14: Serum 22164-105 (1/5.000, 1/10.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/200.000, 1/400.000), Streifen 15: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei Bet v 1-Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,14 µg und 0,28 µg). Sowohl die gereinigten Antikörper aus Serum 22163-133 als auch das Antiserum 22164-105 zeigten bis zu einer Verdünnung von 1/400.000 deutliche Signale gegen das Allergen. Streifen 1 (Präimmunsereum 22163), Streifen 8 (Präimmunsereum 22164) und Streifen 15 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

Bet v 1-spezifisches Hühner-IgY

Ovalehn konnte im ELISA einen Titer von 1/5.000 für alle Sammelzeiträume gegen Bet v 1 bestimmen. Zudem wurden die Proben im Dot Blot auf Reaktionen gegen Bet v 1 analysiert.

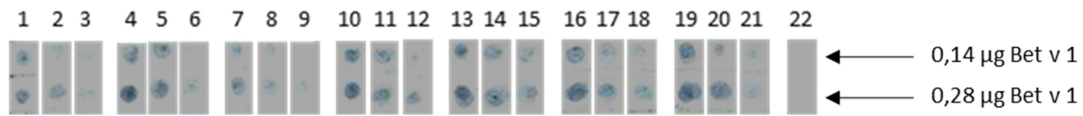


Abbildung 23: Charakterisierung der Bet v 1-spezifischen Antikörper im Dot Blot. IgY-Antikörper wurden aus Hühnereigelb isoliert und die Proben jeweils 1/2.500, 1/5.000, und 1/10.000 verdünnt. Streifen 1-3: Probe vor Immunisierung, Streifen 4-6: Probe 5 Tage nach 1. Immunisierung, Streifen 7-9: Probe 5 Tage nach 2. Immunisierung, Streifen 10-12: Sammelzeitraum I, Streifen 13-15: Sammelzeitraum II, Streifen 16-18: Sammelzeitraum III, Streifen 19-21: Sammelzeitraum IV, Streifen 22: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei Bet v 1-Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,14 µg und 0,28 µg). Alle Proben, sowohl die Proben vor Immunisierung als auch die Proben während der Immunisierung, zeigten Reaktionen gegen Bet v 1. Die Proben aus Sammelzeitraum I - IV (Streifen 10 - 21) lieferten stärkere Signale als die Proben 5 Tage nach der ersten und zweiten Immunisierung (Streifen 4 - 9). Es war kein Unterschied in der Reaktivität zwischen den Proben vor Immunisierung (Streifen 1 - 3) und 5 Tage nach den Immunisierungen (Streifen 4 - 9) erkennbar. Streifen 15 (Konjugatkontrolle) zeigte keine Spots.

5.2.4 Penicilloyl G

Penicilloyl G-spezifisches Kaninchen-IgG

91 Tage nach Beginn der Immunisierung wurde das gesamte Serum der Tiere gewonnen und die Gesamt-IgG-Fraktion im Dot Blot auf Reaktionen gegen Penicilloyl-G (c1), gekoppelt an HSA analysiert.

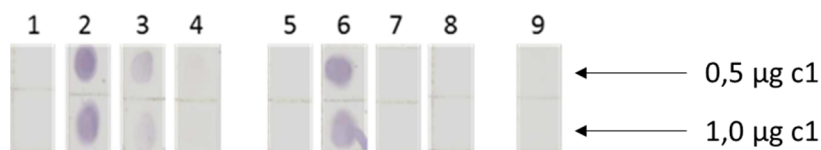


Abbildung 24: Charakterisierung der Penicilloyl G-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenseren 91 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunserum 23455 (1/5.000), Streifen 2-4: Gereinigte IgG-Antikörper aus 23455-91 (1/5.000, 1/10.000 und 1/20.000), Streifen 5: Präimmunserum 23456 (1/5.000), Streifen 6-8: Gereinigte IgG-Antikörper aus 23456-91 (1/5.000, 1/10.000 und 1/20.000), Streifen 9: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei c1 Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,5 µg und 1 µg). Die Gesamt-IgG-Fraktion, aufgereinigt aus dem Serum 23455-91, zeigte bis zu einer Verdünnung von 1/10.000 schwache Signale gegen die Penicilloyl G-HSA-Konjugationen. Die

aufgereinigten Antikörper aus Serum 23456-91 zeigten nur bei der stärksten Konzentration deutliche Signale. Streifen 1 (Präimmunserum 23455), Streifen 6 (Präimmunserum 23456) und Streifen 11 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

Penicilloyl G-spezifisches Hühner-IgY

62 Tage nach Beginn der Immunisierung wurden die Proben von Biogenes gewonnen und diese im Dot Blot auf Reaktionen gegen c1 analysiert.

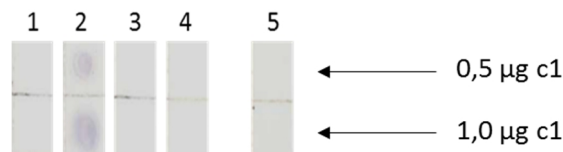


Abbildung 25: Charakterisierung der Penicilloyl G-spezifischen Antikörper im Dot Blot nach Isolierung der IgY-Antikörper aus Hühnereigelb. Streifen 1: Gereinigte IgY-Antikörper aus Präimmunserum 11092 (1/250), Streifen 2-4: Gereinigte IgY-Antikörper aus der Eigelb-Fraktion 11092-62 (1/250, 1/500 und 1/1.000), Streifen 5: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei c1 Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,5 µg und 1 µg). Die Gesamt-IgY-Fraktion, aufgereinigt aus dem Eigelb immunisierter Hühner, zeigte nur bei einer Verdünnung von 1/250 eindeutige Signale gegen die Penicilloyl G - HSA-Konjugation. Streifen 1 (gereinigte IgY-Antikörper aus Präimmunserum 11092) und Streifen 5 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

5.2.5 *Corylus avellana*

49 Tage nach Beginn der Immunisierung wurde das Serum der Tiere gewonnen und die Gesamt-IgG-Fraktion im Dot Blot auf Reaktionen gegen (*Corylus avellana*) f17 und vier rekombinant hergestellte Allergene, die natürlich in der Haselnuss vorkommen, getestet.

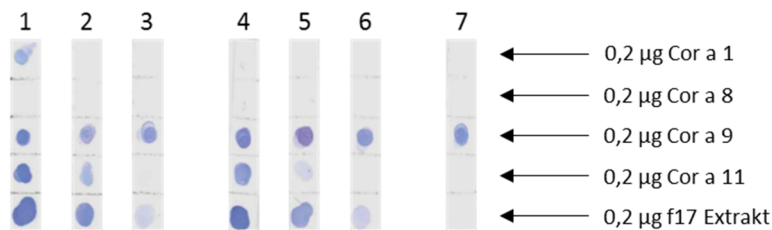


Abbildung 26: Charakterisierung der f17-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenserum 49 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1-3: Gereinigte IgG-Antikörper aus Serum 25297-49 (1/20.000, 1/200.000 und 1/2.000.000) Streifen 4-6: Gereinigte IgG-Antikörper aus Serum 25298-49 (1/20.000, 1/200.000 und 1/2.000.000), Streifen 7: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Reaktionen gegen Cor a 1 konnten bis zu einer 1/20.000 Verdünnung der gereinigten Antikörper aus Serum 25297-49 nachgewiesen werden. Cor a 8 (Position 2) zeigte bei den getesteten Verdünnungen keine Signale. Cor a 11 (Position 4) zeigte bis zu einer 1/200.000 Verdünnung deutliche Reaktionen mit beiden Kaninchen-Proben. Cor a 9 sowie der Haselnussextrakt (Position 3 und 5) zeigten bis zu einer 1/2.000.000 Verdünnung eindeutige Spots. Jedoch nahm die Reaktion gegen Cor a 9 mit steigender Verdünnung der Seren nicht ab, wie es bei Cor a 11 und dem Haselnussextrakt der Fall war. Zudem zeigte auch der Streifen der Konjugatkontrolle (Streifen 7), welcher nicht mit den Kaninchenproben inkubiert wurde, an Position 3 einen deutlichen Spot.

5.2.6 *Dermatophagoides pteronyssinus*

Aufgrund eines hohen Titers wurden die Immunisierungen zu dem frühestmöglichen Zeitpunkt abgebrochen, die Antiseren nach 49 Tagen gewonnen und diese IgG-spezifisch aufgereinigt. Die IgG-Fractionen wurden daraufhin im Dot Blot auf Reaktionen gegen (*Dermatophagoides pteronyssinus*) d1 analysiert.

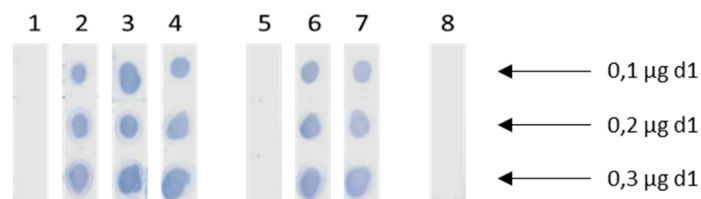


Abbildung 27: Charakterisierung der d1-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenserum 49 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunserum 24936 (1/5.000), Streifen 2-4: Gereinigte IgG-Antikörper aus 24936-49 (1/5.000, 1/10.000 und 1/20.000), Streifen 5: Präimmunserum 24937 (1/5.000), Streifen 6-7: Gereinigte IgG-Antikörper aus 24937-49 (1/5.000 und 1/10.000), Streifen 8: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich drei d1 Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,1 µg, 0,2 µg und 0,3 µg). Die Gesamt-IgG-Fraktion, aufgereinigt aus Serum 24936, zeigte auch im Dot Blot bis zu einer Verdünnung von 1/20.000 Signale gegen die Allergenspots. Ebenfalls konnte auch der Titer von Biogenes für das Serum 24937 im Dot Blot bestätigt werden (siehe Abbildung 27). Die Intensitäten der Spots innerhalb eines Streifens waren, trotz unterschiedlicher Volumina, vergleichbar. Streifen 1 (Präimmunserum 24936), Streifen 5 (Präimmunserum 24937) und Streifen 8 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

5.2.7 *Aspergillus fumigatus*

Die Antiseren wurden nach 49 Tagen gewonnen und diese IgG-spezifisch aufgereinigt. Die IgG-Fractionen wurden daraufhin im Dot Blot auf Reaktionen gegen (*Aspergillus fumigatus*) m3 analysiert.

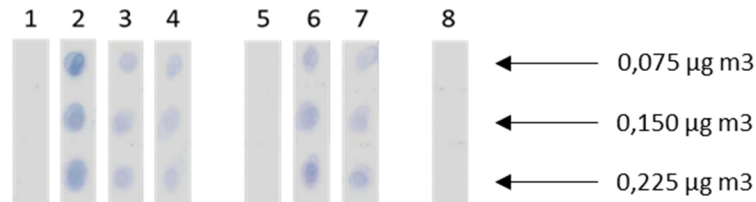


Abbildung 28: Charakterisierung der m3-spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchenseren 49 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunserum 24938 (1/5.000), Streifen 2-4: Gereinigte IgG-Antikörper aus 24938-49 (1/5.000, 1/25.000 und 1/50.000), Streifen 5: Präimmunserum 24939 (1/5.000), Streifen 6-7: Gereinigte IgG-Antikörper aus 24939-49 (1/5.000 und 1/25.000), Streifen 8: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auf jedem Streifen befanden sich drei m3 Spots mit unterschiedlicher Konzentration (0,075 µg, 0,150 µg und 0,225 µg). Die Gesamt-IgG-Fraktion, aufgereinigt aus Serum 24938, zeigte im Dot Blot bis zu einer Verdünnung von 1/50.000 deutliche Signale gegen die Allergenspots. Für das Serum 24939 konnte im Dot Blot ein Titer von 1/25.000 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 28). Die Intensitäten der Spots innerhalb eines Streifens waren, trotz unterschiedlicher Volumina, vergleichbar. Streifen 1 (Präimmunserum 24938), Streifen 5 (Präimmunserum 24939) und Streifen 8 (Konjugatkontrolle) zeigten keine Spots.

5.2.8 *Hevea brasiliensis*

Die Seren wurden 28 Tage nach der initialen Immunisierung im Dot Blot auf Reaktionen gegen (*Hevea brasiliensis*) k82 sowie gegen die rekombinant hergestellten Proteine, welche zur Immunisierung eingesetzt wurden, analysiert.

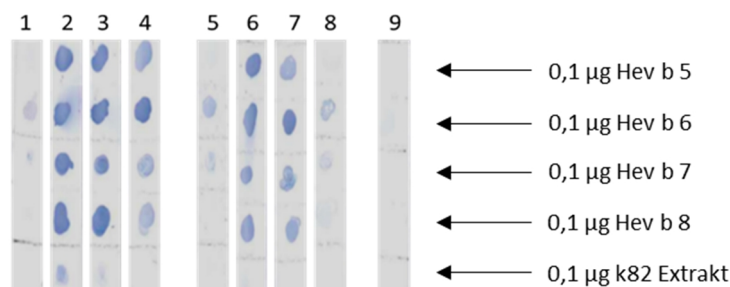


Abbildung 29: Charakterisierung der Hev b 5-8 - spezifischen Antikörper aus zwei Kaninchen-seren 28 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1: Präimmunserum 25295 (1/2.000), Streifen 2-4: Antiserum 25295-28 (1/2.000, 1/20.000 und 1/200.000) Streifen 5: Präimmunserum 25296 (1/2.000), Streifen 6-8: Antiserum 25296-28 (1/2.000, 1/20.000 und 1/200.000), Streifen 9: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Das Antiserum 25295-28 zeigte im Dot Blot bis zu einer Verdünnung von 1/200.000 eindeutige Reaktionen gegen Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8. K82 wurde von diesem Serum bis zu einer Verdünnung von 1/20.000 detektiert, wobei der Spot sehr schwach war. Das Präimmunsersum zeigte auch schwache Signale gegen Hev b 6 und Hev b 7 bei einer Verdünnung von 1/2.000. Das Serum 25296-28 zeigte ähnliche Reaktionen gegen die rekombinant hergestellten Allergene, jedoch waren die Spots bei der 1/200.000 nur schwach sichtbar. Signale gegen k82 konnten für dieses Serum anhand des Dot Blots nicht bestätigt werden. Auch das Präimmunsersum 25296 zeigte schwache Signale gegen Hev b 6 und Hev b 7 bei einer Verdünnung von 1/2000. Streifen 9 (Konjugatkontrolle) zeigte keine Spots.

Aufgrund des hohen Titers gegen die Allergene, mit denen immunisiert wurde, wurden die Immunisierungen zu dem frühestmöglichen Zeitpunkt abgebrochen, die Antiseren nach 49 Tagen gewonnen und diese IgG-spezifisch aufgereinigt. Die IgG-Fractionen wurden daraufhin im Dot Blot auf Reaktionen gegen die Allergenmischung, mit der immunisiert wurde, überprüft.



Abbildung 30: Charakterisierung der Hev b 5-8 -spezifischen Antikörpern aus zwei Kaninchen-seren 49 Tage nach der Immunisierung im Dot Blot. Streifen 1-2: Gereinigte IgG-Antikörper aus Serum 25295-49 (1/200.000 und 1/2.000.000) Streifen 3-4: Gereinigte IgG-Antikörper aus Serum 25296-49 (1/200.000 und 1/2.000.000), Streifen 5: Konjugatkontrolle (keine Seruminkubation).

Auch die aufgereinigten IgG-Antikörper aus dem Antiserum 25295-49 zeigten bis zu einer 1/200.000 Verdünnung eindeutige Signale gegen eine Mischung aus Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8. Das Antiserum 25296-49 zeigte nach Aufreinigung der IgG-Antikörper sogar eine eindeutige Reaktion gegen die rekombinant hergestellten Allergene bis zu einer Verdünnung von 1/2.000.000.

5.2.9 Vergleichende Darstellung allergenspezifischer Antikörper

In Tabelle 38 sind die Ergebnisse der Immunisierungen von Kaninchen und Hühnern mit den oben beschriebenen Allergenen dargestellt. Das Volumen nach Aufreinigung der IgG- bzw. IgY-Antikörper und die gemessenen Konzentrationen dieser Antikörper sind ebenfalls aufgeführt. Für die zwei von Ovalahn gelieferten IgY-Konzentrate (gegen Bet v 1 und f78) sind keine Konzentrationen angegeben. Die Proben wurden in einem proteinhaltigen Stabilisierungspuffer geliefert, sodass eine IgY-spezifische Proteinbestimmung nachträglich nicht möglich war. Das Antiserum aus einem mit Bet v 1 immunisierten Kaninchen (22164-105) konnte aufgrund eines zu geringen Volumens von Biogenes nicht IgG-spezifisch gereinigt werden. Zudem sind die Mindesttiter

gegen das Allergen, mit dem immunisiert wurde, ermittelt im Dot Blot für alle Proben dargestellt (siehe Tabelle 38).

Tabelle 38: Übersicht aller Kaninchen- und Hühner-Immunisterungen. Die ermittelten Gesamt-IgG- / IgY-Konzentrationen (aufgereinigt und ermittelt durch Biogenes / Ovalehn), aufgereinigtes Volumen und der allergenspezifische Mindesttiter ermittelt im Dot Blot ist dargestellt.

	Immunistert mit	Gereinigte Antikörper (ID)	Volumen (mL)	Antikörper (IgG/IgY) Konzentration (mg/mL)	Mindesttiter gegen das Allergen der Immunisierung 1/
IgG-spezifisch aufgereinigte Kaninchenserum	f76	23457-91	45,0	14,53	10.000
		23458-91	47,0	15,82	5.000
	f77	23459-91	40,0	16,52	40.000
		23460-91	70,0	14,71	40.000
	f78	22057-140	34,0	13,32	20.000
		22058-140	33,0	8,88	20.000
	Bet v 1	22163-133	45,0	11,68	400.000
		22164-105 *	30,0	-	400.000
	c1	23455-91	60,0	7,67	10.000
		23456-91	70,0	13,06	5.000
	f17	25297-49	67,0	11,84	2.000.000
		25298-49	39,5	13,93	2.000.000
	d1	24936-49	48,0	6,81	20.000
		24937-49	44,0	7,95	10.000
	m3	24938-49	50,0	6,99	50.000
		24939-49	26,0	10,64	25.000
Hev b 5-8	25295-49	64,0	12,66	200.000	
	25296-49	37,0	12,84	2.000.000	
IgY-spezifisch aufgereinigtes Hühnereigelb	Bet v 1	Sammelzeitraum I-IV	8,0	Nicht bekannt	10.000
	f78	Sammelzeitraum I-IV	8,0	Nicht bekannt	500
	c1	11092	13,5	19,20	250

*Serum wurde nicht IgG-spezifisch aufgereinigt, da das Volumen nicht ausreichte.

Es wurden sowohl jeweils zwei Kaninchen als auch jeweils ein Huhn mit Bet v 1, f78 und c1 immunisiert. Der Vergleich der ermittelten Titer gegen das jeweilige Allergen im Dot Blot ist in Abbildung 31 dargestellt. Bei allen Immunisierungen zeigten beide Kaninchenproben deutliche Signale gegen das Allergen der Immunisierung bei einer stärkeren Verdünnung im Vergleich zu den Hühnerproben. Zudem ist das gewonnene Volumen der Probe von immunisierten Hühnern geringer, als von immunisierten Kaninchen (siehe Tabelle 38). Die Ausbeuten allergenspezifischer Antikörper bei den betrachteten Kaninchen-Immunisterungen sind damit höher, als bei den Hühner-Immunisterungen, obgleich mittels *Student's t-test* keine statistische Signifikanz, aufgrund zu geringer Stichprobenzahl, belegt werden kann (*p-Value*: 0,37).

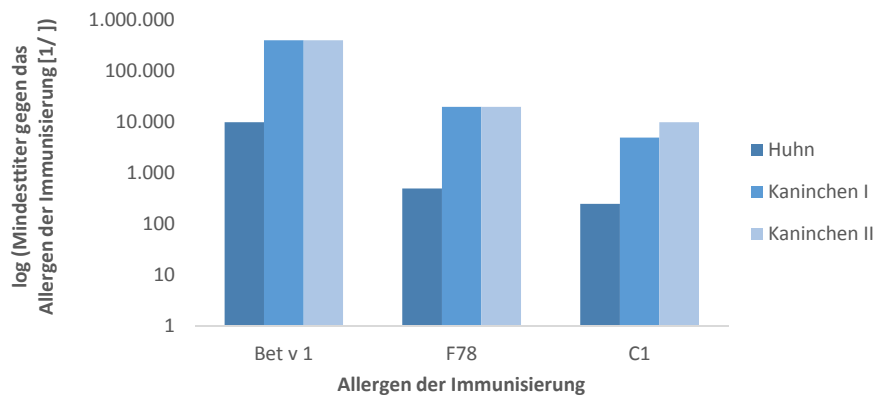


Abbildung 31: Vergleich der ermittelten Titer im Dot Blot gegen das Allergen der Immunisierung. Darstellung von jeweils zwei Kaninchen und einem Huhn gegen Bet v 1, f78 und c1.

Die von Biogenes gemessenen IgG-Konzentrationen der gereinigten Kaninchenserum wurden mit den ermittelten Mindesttitern aus dem Dot Blot verglichen (siehe Tabelle 38). Es wurden die IgG-Konzentration von allen 17 aufgereinigten Kaninchenserum mit den Verdünnungen aus dem Dot Blot korreliert. Die Korrelation nach Spearman liefert einen Koeffizienten von $-0,004$, wodurch sich ein Zusammenhang zwischen diesen Werten ausschließen lässt (siehe Abbildung 32a). Zusätzlich wurde die Dauer der Immunisierung mit den Mindesttitern aus dem Dot Blot verglichen. Der ermittelte Korrelationskoeffizient von $-0,289$ lässt ebenfalls auf keine Korrelation zwischen den Daten schließen. Weder die IgG-Konzentration noch die Dauer der Kaninchenimmunisierung korrelierten mit den allergenspezifischen Reaktionen im Dot Blot.

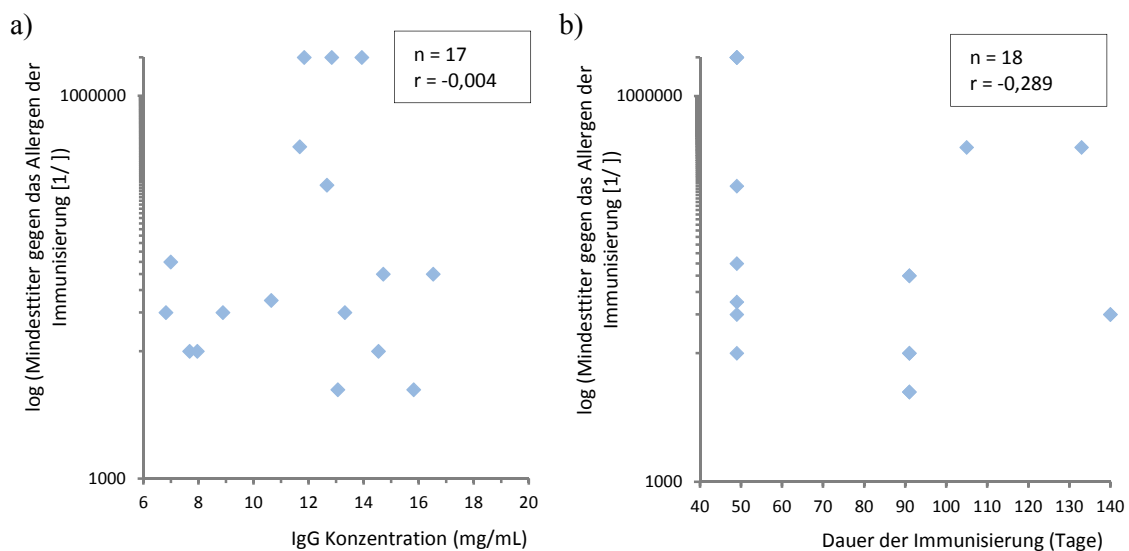


Abbildung 32: Korrelation (nach Spearman) der allergenspezifischen Mindesttiter gegen die IgG-Konzentrationen der aufgereinigten Kaninchenserum (a) und gegen die Dauer der Immunisierung (b).

5.3 Ansätze zur Herstellung artifizierlicher humaner Seren

Zur Herstellung artifizierlicher humaner Seren, unter Verwendung von allergenspezifischem IgY, wurde ein CHIR-IgE Fc Konstrukt eingesetzt. Dieses Konstrukt besteht aus der humanen IgE Fc Region fusioniert mit einem hoch affinen IgY Rezeptor (CHIR, Chicken Ig-like receptor). Das Konstrukt zeigte in einem ELISA eine deutliche Reaktivität gegen IgY. Es konnten keine Reaktivitäten gegen weitere Antikörper-Isotypen (Maus IgG1 und IgG2a, IgG aus der Ziege, Schaf, und Kaninchen, humanes IgA, IgM und IgG) nachgewiesen werden.

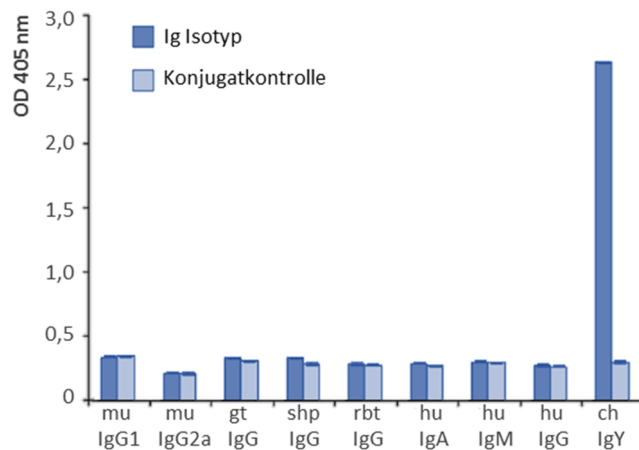


Abbildung 33: Analyse der Reaktivität des CHIR-IgE Fc Konstrukts gegen Antikörper unterschiedlicher Antikörper-Isotypen im ELISA. Die Bindung des CHIR-IgE Fc Konstrukts an die an der Platte immobilisierten Antikörper (je 100 µg/mL) wurde mittels goat anti-human IgE AP (1/1.000) und pNPP visualisiert. Die Reaktionen mit dem Konjugat wurden ohne Zugabe des Konstrukts bestimmt (Konjugatkontrolle).

Das CHIR-IgE Konstrukt, welches hoch-spezifisch IgY bindet, wurde daraufhin mit verschiedenen allergenspezifischen Hühnerproben für 1 h in PBS mit 5 % (w/v) BSA inkubiert. Die allergenspezifischen Reaktionen wurden im spezifischen IgE REAST (*reversed enzyme allerge sorbent test*) überprüft. Die Etablierung artifizierlicher Kontrollen mithilfe dieses Fusionsproteins wurde bereits in der Literatur beschrieben (118).

Tabelle 39: Initiale Konstrukte aus Hühnerproben und CHIR-IgE Fc im spezifischen IgE REAST. Es wurden drei Verdünnungen der Hühnerproben mit jeweils drei Konzentrationen des CHIR-IgE Fc Moleküls getestet.

Allergen	Verdünnung der Hühnerproben (1/)	IU/mL		
		CHIR-IgE Fc (µg/mL)		
		50,0	25,0	12,5
Casein	400	3,58	3,05	2,92
	800	3,58	3,85	3,34
	1.600	3,10	2,70	3,13
Bet v 1	400	0,14	0,11	0,10
	800	0,12	0,11	0,09
	1.600	0,10	0,11	0,10
Penicilloyl G	200	3,14	2,89	2,60
	400	3,44	3,02	3,01
	800	3,23	3,26	3,27

Die Bet v 1-spezifischen Hühnerproben zeigten keine signifikanten Reaktionen in Kombination mit dem CHIR-IgE Fc Konstrukt. Die Casein- und Penicilloyl G-spezifischen artifiziellen Kontrollen zeigten zwar positive Reaktionen ($> 0,35$ IU/mL), jedoch konnten keine konzentrationsabhängigen Reaktionen ermittelt werden. Unabhängig von der Konstrukt-Konzentration und der Hühnerprobenverdünnung lagen die Werte zwischen 2,60 IU/mL und 3,85 IU/mL. Die Proben der Hühner-Immunsierungen lieferten auch ohne zusätzliches Konstrukt signifikant niedrigere Reaktionen im Vergleich zu den Kaninchen-Immunsierungen (siehe Kapitel 5.2.9). Daher wurde ein kommerziell verfügbarer, allergenspezifischer IgY-Antikörper in Kombination mit dem CHIR-IgE Konstrukt ausgetestet. Es wurde ein anti-Soja-IgY gewählt, um die Funktionalität des Konstrukts zu prüfen.

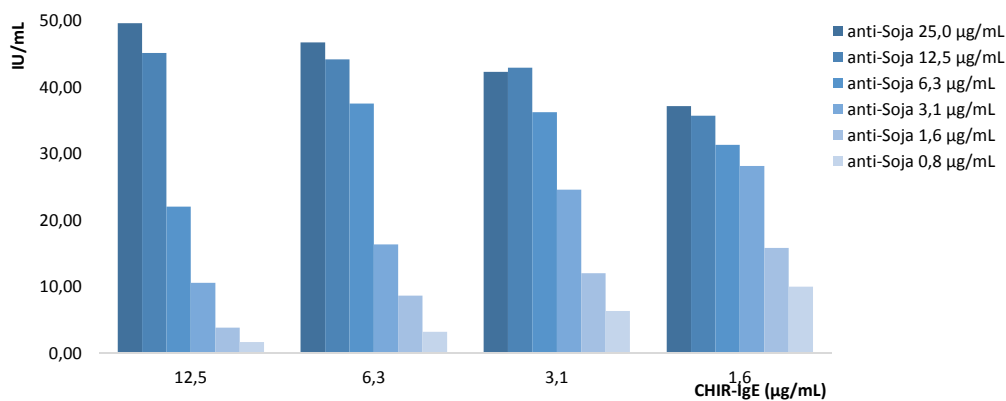


Abbildung 34: Analyse von einem anti-soja IgY-Antikörper in Kombination mit dem CHIR-IgE Molekül im REAST. Es wurden sechs Verdünnungen des anti-Soja-Antikörpers mit jeweils vier Verdünnungen CHIR-IgE für 1h in PBS mit 5 % (w/v) BSA inkubiert und im REAST getestet.

Alle getesteten Soja-spezifischen Antikörper-Verdünnungen zeigten in Kombination mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktion gegen Soja-Extrakt. Die Reaktionen

konnten in Abhängigkeit der Konstrukt- und anti-Soja-IgY-Konzentration titriert werden. Demnach schien das Konstrukt funktionell, jedoch die aus der Immunisierung resultierenden allergenspezifischen-IgY nicht ausreichend reaktiv.

Zudem wurde eine serielle Verdünnung von Soja-spezifischen artifizielle humanen Seren in drei etablierten Testsystemen zum Nachweis von sIgE getestet. Die Ergebnisse ermittelt im REAST, ALFA und ImmunoCAP® sind in Tabelle 40 dargestellt. Es sind sowohl die ermittelten Konzentrationen als auch die Variationskoeffizienten (Standardabweichung dividiert durch Mittelwert) zwischen den drei Ergebnissen aufgeführt. Die Variantskoeffizienten liegen zwischen 0,34 % und 24,10 %. Die Ergebnisse der vier artifiziellen Seren weichen um maximal eine Klasse voneinander ab.

Tabelle 40: Artifizielle humane Seren bestehend aus einem anti-soja IgY-Antikörper und dem CHIR-IgE Molekül wurden in drei Testsystemen zum Nachweis von sIgE gegen Sojaextrakt getestet. Es sind sowohl die ermittelten Konzentrationen (kU/L für ImmunoCAP®, IU/mL für REAST und U/mL für ALFA) als auch die Variationskoeffizienten (Standardabweichung dividiert durch Mittelwert) zwischen den drei Ergebnissen aufgeführt.

CHIR-IgE Fc µg/mL	Anti-Soja µg/mL	REAST		ALFA		ImmunoCAP®		Variations- koeffizient (%)
		IU/mL	Klasse	U/mL	Klasse	kU/L	Klasse	
6,25	6,25	> 100	6	99,27	5	> 100	6	0,34
3,13	3,13	75,2	5	54,81	5	> 100	6	24,10
1,56	1,56	35,9	4	38,16	4	38,2	4	2,87
0,78	0,78	14,9	3	12,95	3	15,4	3	7,33

Da das Spektrum artifizieller humaner Seren, bedingt durch den IgY-spezifischen CHIR Rezeptor, limitiert ist, wurde ein Konstrukt zur Verwendung von allergenspezifischen Kaninchen-IgG Antikörpern entwickelt.

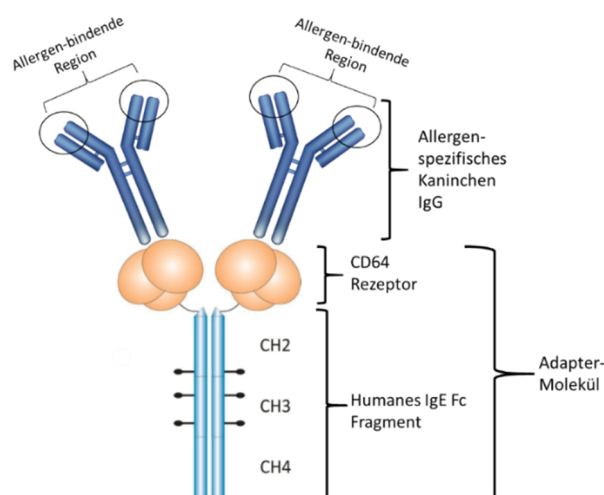


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Kombination aus Adapter-Molekül (CD64-IgE Fc) und allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern [teilweise entnommen aus (119)].

Es wurde ein Konstrukt, bestehend aus der konstanten Region (Fc Fragment) des humanen IgEs und einer Kaninchen-IgG-bindenden Region, rekombinant hergestellt werden. Bei dem Einsatz dieses Adapter-Moleküls sollte die Kaninchen-IgG-bindenden Region als Linker zwischen den Kaninchen-IgG-Antikörpern und der humanen IgE Fc Region fungieren. Die Wahl der humanen IgE Fc Region als Immunglobulin-Domäne war bedingt durch die beabsichtigte Verwendung des Konstrukts als Komponente artifizieller humaner Seren. ARTHUS sollten unter anderem zur Standardisierung von Testsystemen zum Nachweis von sIgE eingesetzt werden. Daher musste eine Komponente, die von möglichst allen in der Diagnostik eingesetzten anti-IgE-Antikörpern erkannt wird, eingesetzt werden. Da in der humanen IgE Diagnostik anti-IgE-Fc Antikörper eingesetzt werden (24), war der Einsatz der humanen IgE Fc Region als Immunglobulin-Domäne des Konstrukts unumgänglich. Der FcγRI Rezeptor (CD64) sollte als Kaninchen-IgG-bindende Region eingesetzt werden. Es ist bekannt, dass die humanen IgG Rezeptoren in der Lage sind Kaninchen-IgG zu binden (53). Es wurde der FcγRI eingesetzt, da dieser IgG mit der höchsten Affinität im Vergleich mit den übrigen Fcγ Rezeptoren bindet (120). Ziel war es, damit artifizielle humane, IgE spezifische, Seren bestehend aus polyklonalen, allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem Adapter-Molekül zu erstellen.

5.4 Evaluierung der Expression humaner Proteine in HEK293-Zellen anhand des CD64-IgE Fc Konstrukts

Die Transfektion von HEK293-Zellen wurde mit zwei unterschiedlichen Transfektionsreagenzien, die in Kapitel 4.3.7 beschrieben sind, durchgeführt. Es wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_CD64_IgE Fc (siehe Kapitel 3.4) zum Vergleich beider Methoden verwendet.

Tabelle 41: Bedingungen für die Transfektion mit JetPEI® und Lipofectamine® LTX von HEK293-Zellen in 6-well-Platten.

Reagenz	Medium je well (mL)	DNA (µg)	Konfluenz bei Transfektion	Dauer der Transfektion (h)	Konfluenz bei Beendigung Transfektion
JetPEI®	2	3	60 %	36	100 %
Lipofectamine® LTX	2	3	60 %	36	90 %

Die Transfektionen wurden nach 36 h durch Passagieren in eine 75 cm² T-Flasche und Zugabe des Antibiotikums Zeocin zur Selektion beendet. Der Überstand aus den Kavitäten wurde bereits zur Messung einer möglichen transienten Expression verwendet. Der Überstand wurde in einem ELISA zur Bestimmung von humanem IgE (Total-IgE-HRP, siehe Kapitel 4.5.6) eingesetzt. Das

Ergebnis wird in IU/mL angegeben, wobei $1 \text{ IU/mL} \approx 2,4 \text{ ng/mL}$ humanem IgE mit einem MG von 200 kDa entspricht. Das CD64-IgE Fc Konstrukt besteht aus zwei identischen Polypeptidketten mit jeweils 67,3 kDa (siehe Kapitel 3.4). Daher wird zur Umrechnung der gemessenen IU/mL des CD64-IgE Fc Konstrukt in ng/mL der zusätzliche Faktor 0,7 eingesetzt. Somit entspricht $1 \text{ IU/mL} \approx 1,7 \text{ ng/mL}$ CD64-IgE Fc. Die Ergebnisse der Messung sowie die Umrechnung in $\mu\text{g/mL}$ sind in Tabelle 42 beschrieben. Die Testung des Überstands nicht transfizierter Zellen fungierte als Negativkontrolle bzw. Bestimmung des Hintergrundsignals.

Tabelle 42: Messung der Zellkulturüberstände unmittelbar vor Beendigung der Transfektionen (beschrieben in Tabelle 41) im Total-IgE HRP ELISA.

Probe	Gemessen (IU/mL)	Berechnet ($\mu\text{g/mL}$)
Überstand transfizierter Zellen mit JetPEI [®]	73,53	0,12
Überstand transfizierter Zellen mit Lipofectamine [®] LTX	47,80	0,08
Überstand nicht transfizierter Zellen	< 5,00	-

Der Überstand der Transfektion mit JetPEI[®] lieferte ein höheres Signale im ELISA als der Überstand der Transfektion mit Lipofectamine[®] LTX ($0,12 \mu\text{g/mL}$ und $0,08 \mu\text{g/mL}$) 36 h nach der Transfektion. Der gemessene Wert für den Überstand nicht transfizierter Zellen liegt unterhalb der Nachweisgrenze des eingesetzten ELISAs von $5,00 \text{ IU/mL}$.

Es wurde im Abstand von 2-3 Tagen bei beiden Transfektionen ein Medienwechsel durchgeführt, bis eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht wurde. Die Dauer betrug bei beiden Transfektionsmethoden ca. 4 Wochen. Die Reaktivität der Überstände wurde erneut gemessen sowie die Zellen passagiert. Die Zellen wurden weitere Male passagiert und vor jedem Passagieren der Überstand im ELISA gemessen.

Auch nach der Stabilisierung der Transfektionen zeigten die Zellkulturüberstände der mit JetPEI[®] transfizierten Zellen ein höheres Signale im ELISA, als die Überstände der Transfektion mit Lipofectamine[®] LTX (siehe Tabelle 43). Daher wurde für alle weiteren Transfektionen das Transfektionsreagenz JetPEI[®] verwendet.

Tabelle 43: Messung der Zellkulturüberstände nach verschiedenen Zeitpunkten der Transfektionen (beschrieben in Tabelle 41) im Total-IgE HRP ELISA.

Probe	Zeit der Probennahme	Gemessen (IU/mL)	Berechnet ($\mu\text{g/mL}$)
Überstand transfizierter Zellen mit JetPEI®	Vor 1. Passage	499,73	0,85
	Vor 2. Passage	852,26	1,45
	Vor 3. Passage	909,86	1,55
	Vor 4. Passage	707,20	1,20
Überstand transfizierter Zellen mit Lipofectamine® LTX	Vor 1. Passage	114,33	0,19
	Vor 2. Passage	186,26	0,32
	Vor 3. Passage	177,60	0,30
	Vor 4. Passage	157,60	0,27

Zur Optimierung der Transfektionen mit JetPEI® wurden verschiedene Parameter, wie Zellzahl, Inkubationszeit, Mediumvolumen je Kavität und Volumen des JetPEI® Reagenzes, während der Transfektion mit der CD64-IgE Fc DNA, variiert. Die Variationen richteten sich nach Angabe des Herstellers.

Die Reaktivität der Überstände jeder Transfektion wurde nach der Stabilisierungsphase (ca. 4 Wochen) im ELISA zur Bestimmung von humanem IgE (Total-IgE-HRP, siehe Kapitel 4.5.6) bestimmt. Die höchsten Konzentrationen wurden bei der Variante, beschrieben in Tabelle 44, ermittelt. Für die Bestimmung musste der Zellüberstand 1/4 verdünnt werden, damit der gemessene Wert unterhalb der oberen Nachweisgrenzen von 1000 IU/mL lag (siehe Tabelle 45).

Tabelle 44: Optimale Parameter der Transfektion von HEK293-Zellen mit JetPEI®, ermittelt anhand der Transfektion mit CD64-IgE Fc in 6-well Platten.

DNA (μg)	JetPEI® (μL)	Konfluenz in 6-well Platten (%)	Mediumvolumen (mL)	Inkubationszeit des Reagenz (h)
3	6	50	3	36

Tabelle 45: Messung eines Zellkulturüberstands nach Optimierung der Transfektion mit CD64-IgE Fc mittels JetPEI® im Total-IgE HRP ELISA.

Probe	Gemessen (IU/mL)	Verdünnung des Überstands (1/)	Berechnet ($\mu\text{g/mL}$)
Überstand transfizierter Zellen mit JetPEI® nach Optimierung	> 1000,00	-	> 1,70
	> 1000,00	2	> 3,40
	909,86	4	6,19

Alle weiteren Transfektionen von HEK293-Zellen mit JetPEI® wurden in Analogie zu den beschriebenen Parametern in Tabelle 44 durchgeführt.

5.5 Charakterisierung und Quantifizierung des CD64-IgE Fc Konstrukts

Nach der Trypsinierung einer zu 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche mit 2 mL Trypsin/EDTA wurde eine Rollerflasche mit 1 mL (Rollerflasche 1) und eine Rollerflasche (Rollerflasche 2) mit 2 mL Zellsuspension versetzt. Die Expression des CD64-IgE Fc Konstrukts erfolgte gemäß der Beschreibung in Kapitel 4.3.4. Bei beiden Rollerflaschen wurde das Medium dreimal gewechselt, bis sich die Zellen von der Wandung lösten. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die Expression des Konstrukts im Total-IgE-HRP ELISA (siehe Kapitel 4.5.6) überprüft.

Tabelle 46: Überprüfung der Expression des CD64-IgE Fc Konstrukts in Rollerflaschen bei jedem Mediumwechsel mittels Total-IgE-HRP ELISA. Rollerflasche 1 wurde mit 1 mL Zellsuspension und Rollerflasche 2 mit 2 mL Zellsuspension angeimpft.

Probe aus	Verdünnung des Überstands (1/)	Gemessen (IU/mL)		
		1. Mediumwechsel (nach 10 Tagen)	2. Mediumwechsel (nach 14 Tagen)	3. Mediumwechsel (nach 18 Tagen)
Roller-flasche 1	-	752,53	> 1000,00	494,40
	10	-	144,33	-
Roller-flasche 2	-	> 1000,00	> 1000,00	432,00
	10	157,20	115,46	-

Der Überstand aus Rollerflasche 2 lieferte nach dem ersten Mediumwechsel ein höheres Signal im ELISA (> 1000 IU/mL unverdünnt, 157,20 IU/mL bei einer 1/10 Verdünnung), als der Überstand aus Rollerflasche 1 (752,53 IU/mL unverdünnt). Nach dem zweiten und dritten Mediumwechsel zeigte der Überstand aus Rollerflasche 1 minimale höhere Werte (siehe Tabelle 46). Insgesamt nahm die gemessene Konzentration an CD64-IgE-Fc vom ersten zum zweiten Mediumwechsel bei beiden Rollerflaschen zu. Der dritte Zellkulturüberstand zeigte hingegen wieder niedrigere Werte, wobei in dieser Phase sich die Zellen bereits von der Wandung ablösen.

Die Zellkulturüberstände aus Rollerflasche 2 wurden vor der chromatographischen Aufreinigung gepoolt und eine Probe im PAGE-Gel analysiert. Zur Identifizierung der Bande des Zielproteins wurde zusätzlich Zellkulturüberstand nicht transfizierter HEK293-Zellen aufgetragen. Mittels Western Blot wurde das Bandenmuster der Zellkulturüberstände hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-PolyhistidinTag-HRP-Antikörper analysiert.

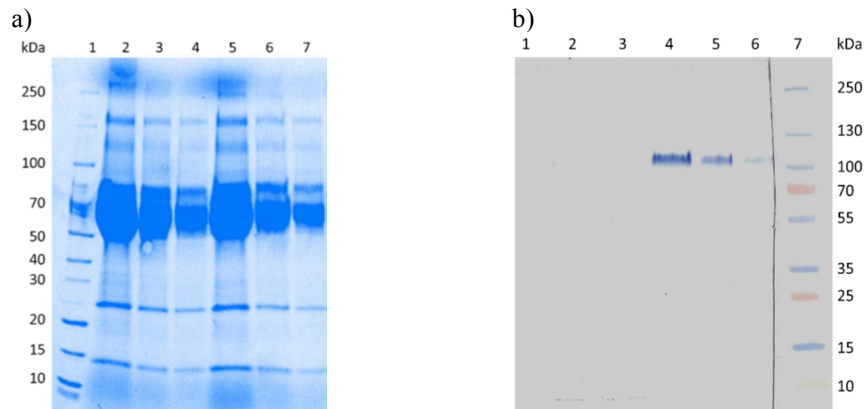


Abbildung 36: Zellkulturüberstand einer Rollerfalsche mit CD64-IgE Fc transfizierten HEK293-Zellen sowie Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen, aufgetragen in einem 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen (a) mit anschließendem Western Blot (b). a) Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder 5 - 250 kDa, 5 µL, Spur 2-4: Zellkulturüberstand einer Rollerfalsche mit CD64-IgE Fc transfizierten Zellen (20 µL, 10 µL und 5 µL), Spur 5-7: Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen (20 µL, 10 µL und 5 µL). b) Spur 1-3: Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen (20 µL, 10 µL und 5 µL), Spur 4-6: Zellkulturüberstand einer Rollerfalsche mit CD64-IgE Fc transfizierten Zellen (20 µL, 10 µL und 5 µL), Spur 7: Protein Standard: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, 5 µL. Die Nitrozellulosemembran wurde mit anti-PolyhistidinTag-HRP (1/2.000) und präzipitierendem TMB inkubiert.

Das Bandenmuster des Zellkulturüberstands CD64-IgE Fc transfizierter Zellen (Spur 2-4) unterschied sich im PAGE-Gel visuell nicht von den Banden des Zellkulturüberstands nicht transfizierter Zellen (Spur 5-7). Bei beiden Proben korrelierten die Bandenintensitäten mit dem aufgetragenen Volumen. Bei keinem Volumen war eine zusätzliche Bande des Zielproteins im Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen zu erkennen. Das CD64-IgE Fc sollte ein theoretisches MG von 67,3 kDa aufweisen (siehe Kapitel 3.4).

Die Proben der Zellkulturüberstände nicht transfizierter Zellen zeigten im Western Blot keine Banden (Spur 1 - 3) nach der Entwicklung mit anti-PolyhistidinTag-HRP-Antikörper und Visualisierung mit präzipitierendem TMB. Die Proben der Zellkulturüberstände CD64-IgE Fc transfizierter Zellen hingegen zeigten jeweils eine Bande mit einem MG von ca. 110 kDa (Spur 4 - 6). Die Bandenintensitäten korrelierten mit dem aufgetragenen Volumen.

Alle weiteren Rollerflaschen wurden, analog zu Rollerflasche 2, mit der gesamten Zellzahl einer zu ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche angeimpft.

Das CD64-IgE Fc Konstrukt wurde aus 300 mL Zellkulturüberstand aus Rollerflasche 2 affinitätschromatografisch über den Polyhistidin-Tag mittels IMAC (immobilized metal-affinity chromatography) aufgereinigt. Das Chromatogramm der Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem CD64-IgE Fc Konstrukt zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) von Fraktion 6 bis Fraktion 14. Fraktion 6 wurde bei ca. 10 % Elutionspuffer fraktioniert und Fraktion 13 bei ca. 20 % Elutionspuffer. Die Fraktionen 6-13 sowie eine Probe des Zellkulturüberstands vor Aufreinigung wurden im PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert.

Mittels Western Blot wurde das Bandenmuster der Fraktionen 8 - 13 hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-IgE-Antikörper analysiert.

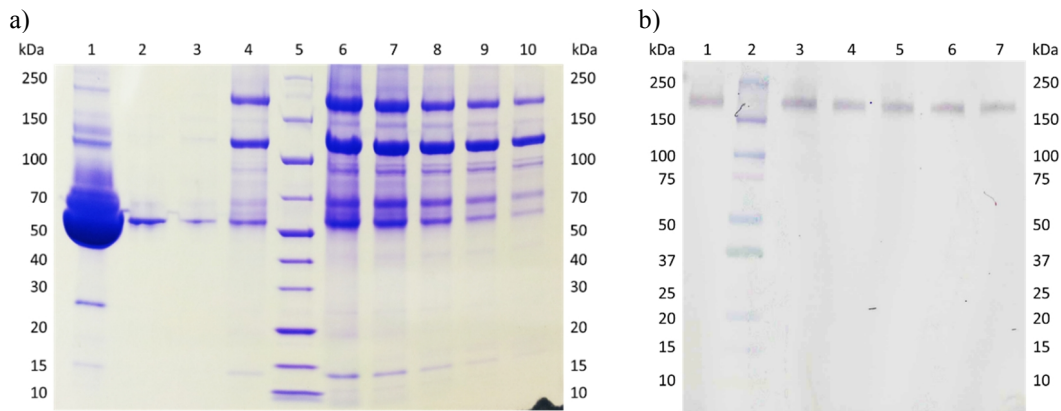


Abbildung 37: Analyse der Fraktionen der IMAC von CD64-IgE Fc im PAGE-Gel und Western Blot.
a) Fraktionen 6-13 sowie der Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie Blau-Färbung. Es wurde von allen Proben 5 μ L je Tasche aufgetragen. Spur 1: Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, Spur 2: Fraktion 6, Spur 3: Fraktion 7, Spur 4: Fraktion 8, Spur 5: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 6: Fraktion 9, Spur 7: Fraktion 10, Spur 8: Fraktion 11, Spur 9: Fraktion 12, Spur 10: Fraktion 13. **b)** Fraktionen 8-13, aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blot. Es wurde von allen Proben 5 μ L je Tasche aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit anti-IgE-HRP (1/10.000) und präzipitierendem TMB inkubiert. Spur 1: Fraktion 8, Spur 2: Protein Standard: Kaleidoscope™ Prestained SDS-PAGE Standards, broad range 10 - 250 kDa, Spur 3: Fraktion 9, Spur 4: Fraktion 10, Spur 5: Fraktion 11, Spur 6: Fraktion 12, Spur 7: Fraktion 13.

Der Zellkulturüberstand vor Aufreinigung (Tasche 1) zeigte im Gel mehrere Banden zwischen 15 kDa und 200 kDa. Eine sehr intensive Bande war zwischen 50 kDa und 70 kDa zu sehen, wobei aus diesem Gel nicht eindeutig hervorging, ob es sich um eine oder mehrere Banden handelte. Fraktion 6 und 7 (Spalte 2 und 3) zeigten jeweils eine Bande bei ca. 50 kDa. Ab Fraktion 8 waren mehrere Banden sichtbar. Die intensivsten Banden lagen bei einem MG von ca. 200 kDa und 125 kDa. Zwei weniger intensive Banden waren zwischen 50 kDa und 70 kDa zu erkennen. Alle vier Banden waren in den Proben aus Fraktion 9 und 10 (Spur 6 und 7) am stärksten gefärbt. Weitere schwache Banden bei 15 kDa, 120 kDa und 200 kDa in Fraktion 8 - 13 wurden durch die Coomassie Blau-Färbung visualisiert. Diese sechs Fraktionen zeigten eine Bande mit einem MG von ca. 200 kDa nach der Entwicklung mit anti-human IgE-HRP und Visualisierung mit präzipitierendem TMB. Die Intensitäten der Banden in den einzelnen Fraktionen waren ähnlich. Die Fraktionen 8-13 der vorhergegangenen Aufreinigung wurden gepoolt und 1,5 mL des Gemisches mittels Gelfiltrationschromatografie zusätzlich gereinigt. Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigte drei deutliche UV-Absorptionspeaks (280 nm) von Fraktion 16 bis Fraktion 41. Aufgrund des Immunoblots aus Abbildung 37 wurde angenommen, dass das CD64-IgE Fc Konstrukt das Protein mit dem größten MG von ca. 200 kDa in der Probe war. Daher wurden die

Fraktionen, die zuerst eluiert wurden, im PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Mittels Western Blot wurde das Bandenmuster der Fraktionen 16-24 hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-IgE-Antikörper analysiert.

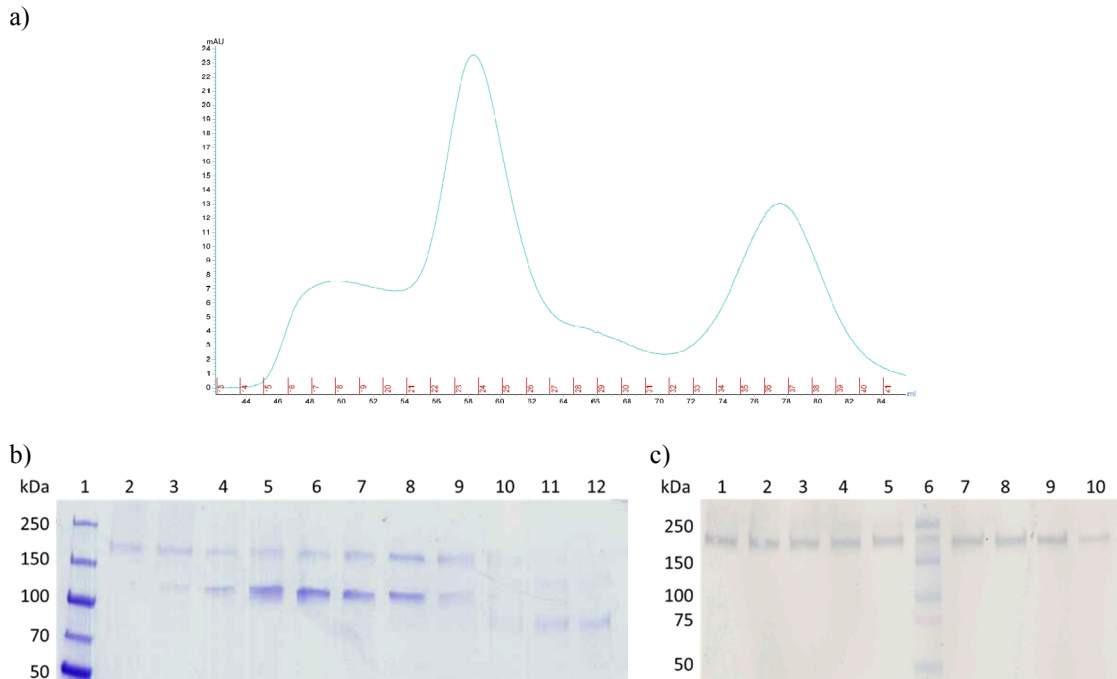


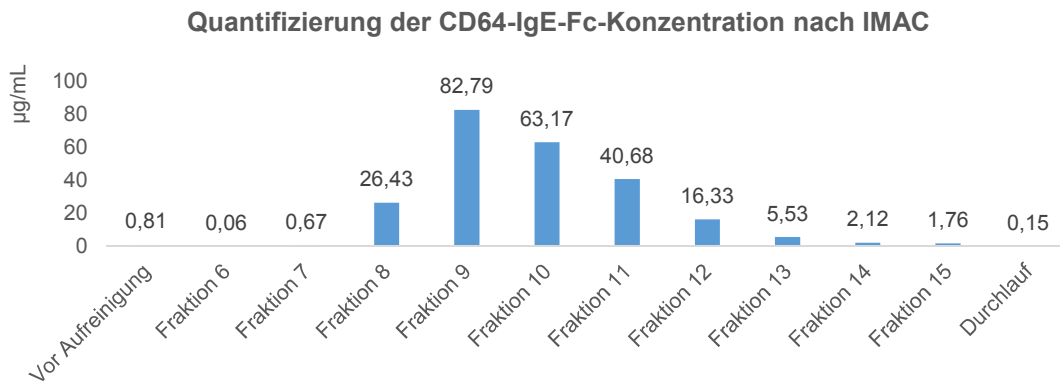
Abbildung 38: Analyse der Fraktionen nach Gelfiltration von CD64-IgE Fc. **a)** Ausschnitt des Chromatogramms der Gelfiltration von 1,5 mL der gepoolten Fraktionen 8 - 13 (CD64-IgE Fc) mittels „HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade“ Säule. **b)** Fraktionen aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie Blau-Färbung. Es wurde von allen Proben 5 μ L je Tasche aufgetragen. Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Fraktion 16, Spur 3: Fraktion 17, Spur 4: Fraktion 18, Spur 5: Fraktion 19, Spur 6: Fraktion 20, Spur 7: Fraktion 21, Spur 8: Fraktion 22, Spur 9: Fraktion 23, Spur 10: Fraktion 24, Spur 11: Fraktion 25, Spur 12: Fraktion 26. **c)** Fraktionen aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blot. Es wurde von allen Proben 5 μ L je Tasche aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit anti-IgE-HRP (1/10.000) und präzipitierendem TMB inkubiert. Spur 1: Fraktion 16, Spur 2: Fraktion 17, Spur 3: Fraktion 18, Spur 4: Fraktion 19, Spur 5: Fraktion 20, Spur 6: Protein Standard: Kaleidoscope™ Prestained SDS-PAGE Standards, broad range 10 - 250 kDa, Spur 7: Fraktion 21, Spur 8: Fraktion 22, Spur 9: Fraktion 23, Spur 10: Fraktion 24.

Die Fraktionen 16 bis 23 (Spalte 2-9) zeigten im Gel unter anderem jeweils eine Bande bei ca. 200 kDa. In Fraktion 16 war keine weitere Bande sichtbar. Ab Fraktion 17 bis 23 war zusätzlich eine zweite Bande zwischen 100 kDa und 150 kDa sichtbar. Fraktion 24 (Spur 10) zeigte drei sehr schwache Banden bei ca. 200 kDa, zwischen 100 kDa und 150 kDa und ca. 70 kDa. Ab Fraktion 25 (Spur 11) waren die zwei Banden bei ca. 200 kDa, zwischen 100 kDa und 150 kDa noch zu erahnen, wobei die 70 kDa Bande an Intensität zunahm.

Die Fraktionen 16 - 24 zeigten jeweils eine Bande mit einem MG von ca. 200 kDa nach der Entwicklung mit anti-human IgE-HRP und Visualisierung mit präzipitierendem TMB. Die Intensität der Bande in Fraktion 16 bis Fraktion 23 (Spur 1 - 5 und 7 - 9) war ähnlich. Die Bande der

Fraktion 24 (Spur 10) war weniger intensiv. Alle im PAGE-Gel überprüften Fraktionen der IMAC und Gelfiltration wurden in einem ELISA zur Bestimmung von humanem IgE (Total-IgE-HRP, siehe Kapitel 4.5.6) eingesetzt. Das Ergebnis wurde in IU/mL angegeben, wobei 1 IU/mL \approx 1,7 ng/mL CD64-IgE Fc entsprachen. Die Proben wurden entsprechend dem Messbereich des ELISAs (5 IU/mL - 1000 IU/mL) verdünnt.

a)



b)

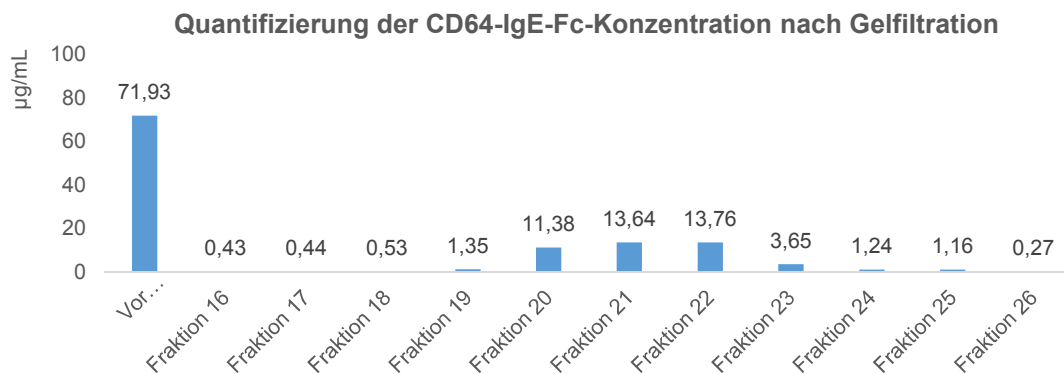


Abbildung 39: Quantifizierung der CD64-IgE Fc Konzentration nach IMAC und Gelfiltration im Total-IgE HRP ELISA. a) Messung der Fraktionen 6-15 nach IMAC sowie Zellkulturüberstand vor der Aufreinigung und Durchfluss während der Aufreinigung. **b)** Messung der Fraktionen 16-26 nach Gelfiltration sowie die Probe vor der Aufreinigung.

Vor der Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem CD64-IgE Fc Konstrukt wurde mittels Total-IgE-HRP ELISA eine Konzentration von 0,81 µg/mL des Konstrukts in 300 mL Zellkulturüberstand ermittelt. Es lagen somit 243,00 µg Konstrukt zur Aufreinigung vor. Nach der Aufreinigung wurden die Fraktionen 6 - 15 im Total-IgE-HRP ELISA untersucht. Die ermittelte Konzentration der einzelnen Fraktionen lag zwischen 0,06 µg/mL und 82,79 µg/mL fraktioniert à 1 mL. Die ermittelten Konzentrationen korrelierten mit den Bandenintensitäten bei ca. 200 kDa im PAGE-Gel (siehe Abbildung 37). Der Durchfluss des Zellkulturüberstands lieferte im ELISA eine Konzentration von 0,15 µg/mL. Von den eingesetzten 243,00 µg Konstrukt wurden daher

45,00 µg nicht von der Säule gebunden. Die Summe an CD64-IgE Fc Konstrukt in den getesteten Fraktionen ergab 239,53 µg Konstrukt in 10 Fraktionen à 1 mL.

Vor der Gelfiltration des bereits IMAC gereinigten CD64-IgE Fc Konstrukts wurde mittels Total-IgE-HRP ELISA eine Konzentration von 71,93 µg/mL des Konstrukts in 1,5 mL Probe ermittelt. Es lagen somit 107,90 µg Konstrukt zur Aufreinigung vor. Die ermittelten Konzentrationen der einzelnen Fraktionen lagen zwischen 0,27 µg/mL und 13,76 µg/mL fraktioniert à 1,5 mL. Die höchsten Konzentrationen beinhalteten die Fraktionen 20 - 22, wobei diese im PAGE-Gel zwei Banden zeigten (siehe Abbildung 38). Lediglich Fraktion 16 zeigte eine einzelne Bande bei ca. 200 kDa. Betrachtet man ausschließlich diese Fraktion mit einer Reinheit von nahezu 100 % (gemäß SDS-PAGE) wurden 0,65 µg von 107,90 µg Konstrukt effektiv gereinigt. Die Summe an CD64-IgE Fc Konstrukt in den getesteten Fraktionen ergab 71,80 µg Konstrukt in 11 Fraktionen à 1,5 mL.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde eine weitere Transfektion von HEK293-Zellen mit pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_CD64-IgE Fc in Analogie zu den beschriebenen Parametern in Tabelle 44 durchgeführt. Die Summe an CD64-IgE Fc Konstrukt in den getesteten Fraktionen nach IMAC ergab 0,82 mg Konstrukt in 6 Fraktionen à 1 mL. Die Summe an CD64-IgE Fc Konstrukt aus der ersten IMAC ergab 239,53 µg Konstrukt in den getesteten 10 Fraktionen aufgereinigt aus ebenfalls 300 mL Zellkulturüberstand. Nach der ersten IMAC wurden 6 Fraktionen à 1 mL gepoolt (Fraktion 8 - 13) und eine Konzentration von 71,93 µg/mL für das Gemisch im Total-IgE-HRP ELISA bestimmt. Nach der Reproduktion der Aufreinigung wurden ebenfalls 6 Fraktionen à 1 mL gepoolt und im IgE-HRP ELISA bestimmt. Der Pool der Reproduktion lieferte eine Konzentration von 145,15 µg/mL.

Da die zusätzliche Gelfiltration bei der Aufreinigung des initialen CD64-IgE Fc Moleküls keine höheren Signale im REAST lieferte und zudem der zusätzliche Reinigungsschritt mit einem hohen Verlust des Zielproteins verbunden war, wurde auf eine zusätzliche Gelfiltration bei der Reproduktion verzichtet.

5.5.1 Analyse der humanen IgE Fc Region hinsichtlich der Eignung als Komponente in der *in vitro* Allergiediagnostik

Die humane IgE Fc Region (CH₂ - CH₄ Domänen) wurde in HEK293-Zellen exprimiert, um diese Region als Komponente des CD64-IgE Fc Konstrukts hinsichtlich der Eignung in kommerziell erhältlichen Testsystemen zu analysieren.

Die DNA-Sequenz, die für die humane IgE Fc Region codiert, wurde aus dem CD64-IgE Fc Konstrukt mittels kombinierter 3-Schritt / 2-Schritt PCR amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide verfügten am 3'- und 5'-Ende über homologe Sequenzen zu dem pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis, sprich homologe Sequenzen zur Signalsequenz und His-Tag-Sequenz (siehe Tabelle 22). Das PCR-Produkt wurde isoliert, dann mittels SLIC Methode in den mittels SfoI linearisierten pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis kloniert und in One Shot® OmniMax™ 2T1^R-Zellen mit dem SLIC Reaktionsansatz transformiert. Eine Plasmid-Präparation, die zu 100 % mit der theoretischen DNA-Sequenz übereinstimmte, wurde zur Transfektion von HEK293-Zellen verwendet.

Die Transfektion von HEK293-Zellen mit dem pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_IgE Fc (siehe Kapitel 3.4) wurde in Analogie zu den beschriebenen Parametern in Tabelle 44 durchgeführt. Es wurde eine Rollerflasche mit der gesamten Zellzahl einer zu ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche angeimpft, bevor das IgE Fc Fragment aus 700 mL Zellkulturüberstand anhand des Polyhistidin-Tags mittels IMAC aufgereinigt wurde.

Das Chromatogramm der Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem IgE Fc Fragment zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) von Fraktion 4 bis Fraktion 10. Diese Fraktionen der IMAC wurden im Total-IgE-HRP ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse der Messung sowie die Umrechnung in mg/mL sind in Tabelle 47 beschrieben. Der Zellkulturüberstand vor Aufreinigung wurde ebenfalls im Total-IgE-HRP ELISA bestimmt. Das Ergebnis wird in IU/mL angegeben, wobei 1 IU/mL \approx 2,4 ng/mL humanem IgE mit einem MG von 200 kDa entspricht. Die IgE Fc Region besteht aus zwei identischen Polypeptidketten mit jeweils 35,2 kDa (siehe Kapitel 3.4). Daher wurde zur Umrechnung der gemessenen IU/mL der IgE Fc Region in ng/mL der zusätzliche Faktor 0,35 eingesetzt. Somit entsprach 1 IU/mL \approx 0,84 ng/mL IgE Fc. Die Proben wurden entsprechend dem Messbereich des ELISAs (5 IU/mL - 1000 IU/mL) verdünnt.

Tabelle 47: Messung der Fraktionen 4-10 nach IMAC sowie Zellkulturüberstand vor der Aufreinigung im Total-IgE HRP ELISA.

Probe	Fraktion	Gemessen (IU/mL)	Verdünnung der Probe (1/)	Berechnet (mg/mL)
Überstand vor Aufreinigung	-	967,46	10	0,01
Fraktionen 4-10 nach IMAC	4	710,93	10.000	5,97
	5	819,20	10.000	6,88
	6	890,66	1.000	0,75
	7	562,66	1.000	0,47
	8	962,66	100	0,08
	9	923,73	100	0,08
	10	701,33	100	0,06

Vor der Aufreinigung des Polyhistidin-markierten IgE-Fc-Fragments wurde mittels Total-IgE-HRP ELISA eine Konzentration von 10,0 µg/mL des Konstrukts in 700 mL Zellkulturüberstand ermittelt. Es lagen somit ca. 7,0 mg Konstrukt zur Aufreinigung vor. Nach der Aufreinigung wurden die Fraktionen 4 - 10 im Total-IgE-HRP ELISA untersucht. Die ermittelten Konzentrationen lagen zwischen 0,06 mg/mL und 6,88 mg/mL fraktioniert à 0,5 mL. Die Summe an IgE Fc Fragment in den getesteten Fraktionen ergab 7,11 mg in 7 Fraktionen à 0,5 mL.

Die Fraktionen 4 - 7 der Aufreinigung wurden gepoolt und dialysiert (siehe Kapitel 4.4.4). Danach wurde diese Probe im PAGE-Gel und Total-IgE-HRP ELISA analysiert. Im ELISA wurden die Proben seriell verdünnt und die Ergebnisse der Verdünnungen dargestellt, die im Messbereich des ELISAs (5 IU/mL - 1000 IU/mL) lagen.

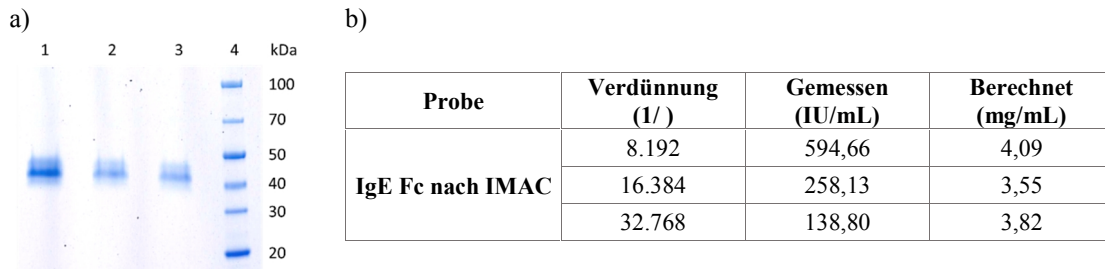


Abbildung 40: Analyse des IgE Fc Fragments in den gepoolte Fraktionen 4-7 nach IMAC. a) 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie Blau-Färbung. Spur 1-3: IgE Fc Probe (10 µL, 5 µL und 2,5 µL aufgetragen); Spur 4: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (5 µL aufgetragen). **b)** Messung im Total-IgE HRP ELISA.

Das Gemisch der Fraktionen 4 - 7 zeigte im PAGE-Gel, unabhängig von dem eingesetzten Volumen, lediglich eine Bande zwischen 40 kDa und 50 kDa. Die CH2 - CH4 Domänen des humanen IgEs bestehen aus 317 AS mit einem MG von 35,19 kDa. Die CH2 - CH4 Domänen des humanen IgEs weisen drei Glykosylierungen auf, wodurch ein abweichendes Laufverhalten denkbar wäre.

Das IgE Fc Fragment in den gepoolten Fraktionen 4-7 nach IMAC und Dialyse lieferte im Total-IgE-HRP ELISA, abhängig von der Verdünnung der Probe, eine Konzentration von 3,55 mg/mL bis 4,09 mg/mL (siehe Abbildung 40). Es lagen 2 mL der Probe vor, sodass ca. 7,6 mg gereinigtes IgE Fc Fragment zur Verfügung standen.

Das gereinigte IgE Fc Fragment wurde als Standardmaterial für den spezifischen IgE REAST zur Konzentrationsbestimmung von sIgE in humanem Serum oder Plasma eingesetzt (siehe Kapitel 4.5.8). Das Konzentrat wurde zuerst mit PBS auf 0,84 mg/mL ($1 \text{ IU/mL} \approx 0,84 \text{ ng/mL IgE Fc}$) verdünnt und dann analog zu den international verwendeten Konzentrationen (siehe Tabelle 34) in PBS mit 5 % (w/v) BSA weiter verdünnt. Der Einsatz des IgE Fc Fragments im REAST zeigte eine prozentuale Abweichung $< 10 \%$ zu einem am WHO-Standard kalibriertem humanem Serum.

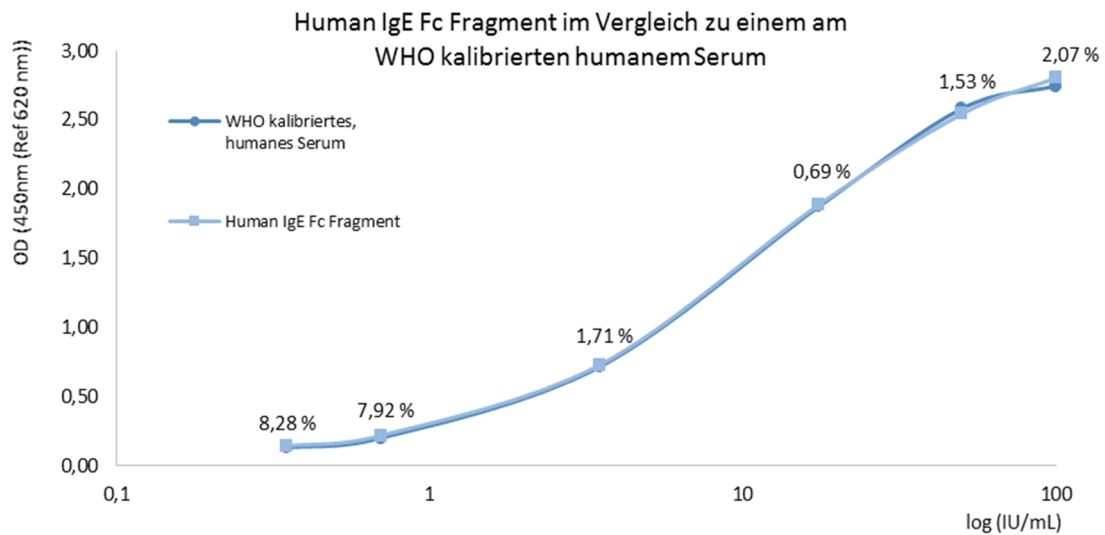


Abbildung 41: Graphische Darstellung zweier Standardkurven gemessen im REAST. Die Kurven beschreiben die gemessenen ODs (450 nm, Ref 620nm) gegen den log der Konzentrationen in IU/mL. Das IgE Fc Fragment wurde äquimolar zu den international verwendeten Konzentrationen eingestellt und die prozentuale Abweichung der ODs (450 nm) zu den ODs eines WHO kalibrierten Serums bestimmt. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und zur Kalkulation der prozentualen Abweichung der Mittelwert verwendet.

5.5.2 Charakterisierung der Spezifität der CD64 Region als Komponente des CD64-IgE Fc Konstrukts

Das gereinigte CD64-IgE Fc Konstrukt wurde hinsichtlich der Reaktivität und Spezifität gegenüber Antikörpern unterschiedlicher Spezies, verschiedener Isotypen und Subklassen im ELISA überprüft.

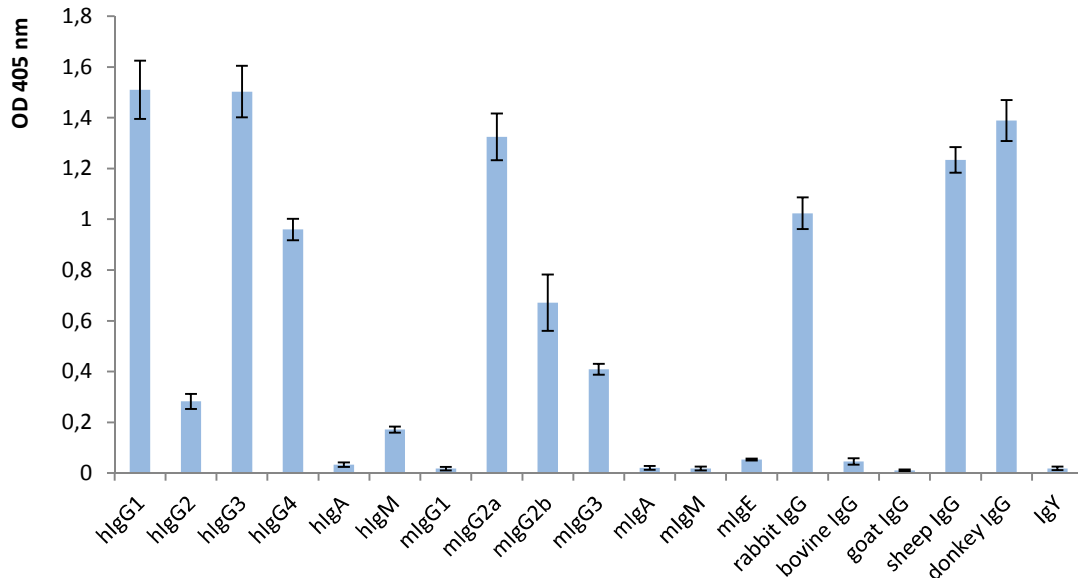


Abbildung 42: Analyse der Reaktivität des CD64-IgE Fc Konstrukts gegen Antikörper unterschiedlicher Spezies, verschiedener Isotypen und Subklassen im ELISA. Die Bindung des CD64-IgE Fc Konstrukts an die an der Platte immobilisierten Antikörper (je 100 µg/mL) wurde mittels goat anti-human IgE AP (1/20.000) und pNPP visualisiert. Dargestellt ist der Mittelwert der ODs aus drei Bestimmungen [entnommen aus (122)].

Das CD64-IgE Fc Konstrukt zeigte deutliche Reaktionen gegen die meisten IgG-Antikörper. Die Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebenen Bindungsaffinitäten zu den humanen Subklassen IgG1, IgG3 und IgG4.

Tabelle 48: Eigenschaften der IgG-Subklassen und die Bindungsaffinitäten zu dem FcγRI Rezeptor [entnommen aus (45)].

Fc Rezeptoren	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
FcγRI	+++	-	++++	++

Der humane CD64 Rezeptor bindet ebenfalls die IgG2a, IgG2b und IgG3 Subklassen der Maus, jedoch konnte keine Bindung zwischen dem Rezeptor und Maus-IgG1 nachgewiesen werden. Die Immunreaktionen des CD64 Rezeptors zu IgGs anderer Spezies fallen unterschiedlich aus, wobei ausgeprägte Reaktionen zum IgG aus Kaninchen, Schaf und Esel nachgewiesen werden konnten. Die Reaktionen sind vergleichbar mit denen zu den humanen Subklassen IgG1, IgG3 und IgG4, wodurch sich eine vergleichbare Bindungsaffinität vermuten lässt. Die Dissoziationskonstante

zwischen dem Rezeptor und humanem IgG wird in der Literatur im nano- bis pikomolaren Bereich angegeben (123-125). Aufgrund der nachgewiesenen Affinität des CD64 Rezeptors zu Kaninchen-IgG und zu den gewonnenen antigenspezifischen Kaninchenseren (siehe Kapitel 5.2) sollen artifizielle humane Seren aus diesen beiden Komponenten etabliert werden.

Humanes IgM, IgA und IgE als auch bovines IgG und avianes IgY zeigen keine nachweisbaren Reaktionen mit dem CD64 Rezeptor. Die fehlende Reaktivität von bovinem IgG ist vorteilhaft bei der Verwendung von FKS-haltigem Medium während der Expression des CD64-IgE Fc Konstrukts.

5.5.3 Initiale Versuche zur Kopplung von allergenspezifischem Kaninchen-IgG mit CD64-IgE Fc

Wie bereits in Kapitel 5.5.2 beschrieben, bindet der humane Fc γ RI Rezeptor (CD64) Kaninchen-IgG-Antikörper mit hoher Affinität. Bei dem Einsatz des Adapter-Moleküls (CD64-IgE Fc) fungiert der CD64 Rezeptor als Linker zwischen den Kaninchen-IgG-Antikörpern und der konstanten Region (Fc Fragment) des humanen IgEs.

Zur Herstellung initialer Konstrukte, bestehend aus Kaninchen-IgG-Antikörper und dem CD64-IgE Fc Molekül, wurden drei verschiedene Serumverdünnungen immunisierter Kaninchen mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen des CD64-IgE Fc Moleküls für 1 h in PBS inkubiert. Die Bindung zwischen dem CD64 Rezeptor des Adapter-Moleküls und Kaninchen-IgG-Antikörper wurde in einem ELISA zur Konzentrationsbestimmung von sIgE (Spezifisches IgE REAST, siehe Kapitel 4.5.8) überprüft. Exemplarisch wurde die Funktionalität des CD64-IgE Fc Moleküls mit Serumproben von Kaninchen, immunisiert mit f76, analysiert. Zum Vergleich wurden Serumproben der Kaninchen vor der Immunisierung und 28 sowie 91 Tage nach der initialen Immunisierung getestet. Zudem wurde die Abweichung zwischen der Verwendung von IMAC gereinigtem CD64-IgE Fc Molekül und IMAC gereinigtem CD64-IgE Fc Molekül mit anschließender Gelfiltration berechnet. Beide Proben wurden im ELISA mit 1 μ g/mL und 2 μ g/mL eingesetzt, wobei sich die Ausgangskonzentration nicht auf die Gesamtprotein-konzentration bezog, sondern auf die IgE Konzentration ermittelt im ELISA zur Bestimmung von humanem IgE.

Tabelle 49: Initiale Konstrukte aus Kaninchenserum und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungen der Kaninchenserum vor, 28 Tage und 91 Tage nach der 1. Immunisierung mit f76 mit jeweils zwei Konzentrationen des CD64-IgE Fc Moleküls getestet. Es wurde die prozentuale Abweichung zwischen der Verwendung unterschiedlich gereinigter CD64-IgE Fc Moleküle (IMAC und IMAC + Gelfiltration) berechnet.

Serum	Serum- verdünnung (1/)	CD64-IgE Fc: 2 µg/mL			CD64-IgE Fc: 1 µg/mL			
		IMAC	Gel- filtration	Abweichung (%)	IMAC	Gel- filtration	Abweichung (%)	
IU/mL		IU/mL			IU/mL			
23458-0	50	0,01	0,03	Nicht berechnet, da unterhalb der Nachweisgrenze	0,03	0,02	Nicht berechnet, da unterhalb der Nachweisgrenze	
	100	0,01	0,03		0,02	0,02		
	200	0,01	0,03		0,02	0,02		
23458-28	50	7,80	5,15	33,97	4,12	4,11	0,24	
	100	7,57	4,76	37,12	3,69	3,41	7,59	
	200	6,87	4,69	31,73	3,52	3,43	2,56	
23458-91	50	> 100	> 100	Nicht berechnet, da oberhalb der Nachweisgrenze	> 100	> 100	Nicht berechnet, da oberhalb der Nachweisgrenze	
	100	> 100	> 100		92,13	90,56		1,70
	200	> 100	> 100		81,76	93,06		13,82

Das Kaninchenserum 23458-0 (Abnahme vor Immunisierung) lieferte bei den getesteten Verdünnungen (1/50, 1/100 und 1/200) in Kombination mit 1 µg/mL und 2 µg/mL CD64-IgE Fc bei der Aufreinigung Konzentrationen von < 0,35 IU/mL (cut-off des ELISAs, siehe Tabelle 34). Daher wurden die Abweichungen dieser initialen Konstrukte nicht berechnet. Ebenfalls wurde keine prozentuale Abweichung für die Werte > 100 IU/mL (obere Nachweisgrenze) kalkuliert. Dies gilt für alle Verdünnungen des Serums 23458-91 (Serumgewinnung 91 Tage nach 1. Immunisierung und Gesamt-IgG-Aufreinigung) mit 2 µg/mL CD64-IgE Fc und für die Verdünnung 1/50 des Serums 23458-91 mit 1 µg/mL CD64-IgE Fc. Die prozentuale Abweichung zwischen den gereinigten Adapter-Molekülen, inkubiert mit Serum 23458-28 (Serumgewinnung 28 Tage nach 1. Immunisierung ohne Gesamt-IgG-Aufreinigung) reichte von 31,73 % bis 37,12 % für 2 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül und von 0,24 % bis 7,59 % für 1 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül. Das Serum 23458-91 (Verdünnung 1/100 und 1/200) lieferte prozentuale Abweichungen zwischen den gereinigten Adapter-Molekülen von 1,70 % und 13,82 % bei einer CD64-IgE Fc Konzentration von 1 µg/mL. Insgesamt zeigten alle initialen Konstrukte, bestehend aus Kaninchenserum nach der Immunisierung mit f76 und beiden CD64-IgE Fc Aufreinigungen, eindeutige Reaktionen im REAST oberhalb von 0,35 IU/mL.

Es wurden initiale Versuche zur Überprüfung der Stabilität von Kaninchen-IgG-Antikörpern gekoppelt an CD64-IgE Fc durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen von Kaninchen-IgG-Antikörpern (exemplarisch von einem Kaninchen, das mit f76 immunisiert wurde) und

dem CD64-IgE Fc Molekül für 1 h in PBS inkubiert und unmittelbar sowie nach 24 h, gelagert bei 2-8 °C, im spezifischen IgE REAST getestet. Es wurde sowohl IMAC gereinigtes CD64-IgE Fc Molekül als auch IMAC gereinigtes CD64-IgE Fc Molekül mit anschließender Gelfiltration verwendet. Die Ergebnisse sowie die prozentuale Abweichung der Messwerte nach 24 h sind in Tabelle 50 dargestellt.

Tabelle 50: Initiale Stabilitätsuntersuchung von Kaninchen-IgG-Antikörper gekoppelt an CD64-IgE Fc (Aufreinigung: IMAC und IMAC + Gelfiltration) im spezifischen IgE REAST. Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungen der Kaninchen-Antikörper (Immunsierung mit f76) und zwei Konzentrationen des CD64-IgE Fc Moleküls eingesetzt. Es wurde die prozentuale Abweichung zwischen der Testung unmittelbar nach der Präinkubation (1 h in PBS) und nach 24 h, gelagert bei 2-8 °C, berechnet.

Kaninchen-IgG lot	Verdünnung Kaninchen-IgG (1/)	Aufreinigung CD64-IgE Fc	CD64-IgE Fc Konzentration (µg/mL)	Startmessung	Messung nach 24 h	Abweichung (%)
				IU/mL	IU/mL	
23457-91	50	IMAC	0,50	10,53	4,40	58,21
	100			14,37	2,41	83,23
	200		0,25	10,17	0,60	94,10
23458-91	50	IMAC und Gelfiltration	0,50	12,50	6,69	46,48
	100		0,25	16,31	3,25	80,07
	200		0,25	9,42	0,56	94,06

Die getesteten Verdünnungen von Kaninchen-IgG-Antikörpern gekoppelt an CD64-IgE Fc Moleküle zeigten bereits nach 24 h, gelagert bei 2-8 °C, eine prozentuale Abweichung zwischen 46,48 % und 94,10 % getestet im spezifischen IgE REAST. Die zusätzliche Gelfiltration des CD64-IgE Fc Moleküls bewirkte keine signifikant bessere Reproduzierbarkeit der Werte nach 24 h. Da die zusätzliche Gelfiltration des CD64-IgE Fc Moleküls keine besseren Stabilitätsdaten zeigte, keine höheren Signale im ELISA lieferte (siehe Tabelle 49) und zudem der zusätzliche Reinigungsschritt mit einem hohen Verlust des Zielproteins verbunden war, wurde auf eine Gelfiltration des CD64-IgE Fc Moleküls nach IMAC verzichtet.

Die prozentualen Abweichungen der Messwerte nach 24 h (siehe Tabelle 50) stiegen mit zunehmender Verdünnung der Kaninchen-IgG-Antikörper. Zur Stabilisierung der artifiziellen humanen Seren, wurden diese anstatt in PBS, in PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen BSA (5,0 %, 2,5 % und 1,25 % (w/v) BSA) verdünnt. Es wurde eine Probe der Kaninchen-IgG-Antikörper 1/100 mit 0,5 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül für 1 h in PBS mit BSA inkubiert und unmittelbar sowie nach 24 h und nach einem Monat, gelagert bei 2-8 °C, im spezifischen IgE REAST getestet.

Tabelle 51: Zugabe von BSA zum Verdünnungspuffer artifizierender humaner Seren und Testung im spezifischen IgE REAST. Kaninchen-Antikörper (Immunisierung mit f76) wurden 1/100 mit 0,5 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül in PBS mit 5,0 %, 2,5 % und 1,25 % (w/v) BSA verdünnt. Es wurde die prozentuale Abweichung zwischen der Testung unmittelbar nach der Präinkubation (1 h) und nach einem Monat, gelagert bei 2-8 °C, berechnet.

Kaninchen-IgG lot	Verdünnung Kaninchen-IgG (1/)	CD64-IgE Fc Konzentration (µg/mL)	Anteil BSA in PBS (%)	Startmessung	Messung nach 1 Monat	Abweichung (%)
				IU/mL	IU/mL	
23458-91	100	0,5	5,0	74,35	72,20	2,89
			2,5	77,23	66,52	13,87
			1,25	77,83	65,00	16,49

Die getesteten Verdünnungen von Kaninchen-IgG-Antikörpern gekoppelt an CD64-IgE Fc Moleküle zeigten nach einem Monat, verdünnt in PBS mit BSA und gelagert bei 2-8 °C, eine prozentuale Abweichung zwischen 2,89 % und 16,49 % getestet im spezifischen IgE REAST. Diese Abweichungen waren deutlich niedriger als die Abweichungen, die mit PBS ohne BSA als Verdünnungspuffer nach 24 h erzielt wurden (siehe Tabelle 50). Die prozentualen Abweichungen der Messwerte nach einem Monat stiegen mit abnehmender Konzentration an BSA im Verdünnungspuffer (siehe Tabelle 51). Das artifizielle humane Serum, verdünnt in PBS mit 5 % (w/v) BSA zeigte die beste Reproduzierbarkeit nach einem Monat gelagert bei 2-8 °C. Daher wurden alle weiteren artifizierender humanen Seren in PBS mit 5 % (w/v) BSA verdünnt.

5.6 Herstellung artifizierender humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro* Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgE

Es wurde das CD64-IgE Fc Molekül, dessen Herstellung und Charakterisierung in Kapitel 5.5 beschrieben ist, zur Herstellung artifizierender humaner Seren eingesetzt. Die ermittelte Konzentration betrug 145,15 µg/mL. Das CD64-IgE Fc Molekül hat ein MG von 69,45 kDa bzw. 138,90 kDa in Form des Dimers (siehe Kapitel 3.4). Damit lagen nach Aufreinigung 1,1 mmol/mL CD64-IgE Fc Molekül vor. Da ein CD64-IgE Fc Molekül theoretisch zwei Moleküle Kaninchen-IgG binden kann (siehe Abbildung 35), wurden die IgG-gereinigten Kaninchenserum ca. in einem zweifach molaren Verhältnis zu dem CD64-IgE Fc Molekül eingesetzt. Kaninchen-IgG-Antikörper besitzen ein MG von 150 kDa. Es wurden für alle Immunisierungen IgG-Ausbeuten zwischen 6,81 mg/ml und 16,52 mg/ml ermittelt (siehe Tabelle 38). Umgerechnet lagen damit zwischen 45 mmol/ml und 110 mmol/ml Kaninchen-Ig-Antikörper vor. Es wurden für die Untersuchung im ELISA alle IgG-gereinigten Kaninchenserum 1/50, 1/100 und 1/200 verdünnt, sodass zwischen 0,23 mmol/ml und 2,2 mmol/ml IgG-Antikörper eingesetzt wurden. Das CD64-IgE Fc Molekül wurde daher auf 1,0 mmol/ml, 0,5 mmol/ml und 0,1 mmol/ml verdünnt und

jeweils mit den verschiedenen Verdünnungen IgG-gereinigter Kaninchenserum für 1 h in PBS mit 5 % (w/v) BSA inkubiert, bevor 50 µL dieser artifiziellen Kontrollen in einem ELISA eingesetzt wurden. Die Bindung zwischen dem CD64 Rezeptor des Adapter-Moleküls und Kaninchen-IgG-Antikörper wurde in einem ELISA zur Konzentrationsbestimmung von sIgE (Spezifisches IgE REAST, siehe Kapitel 4.5.8) überprüft. Exemplarisch wurde das CD64-IgE Fc Molekül mit IgG-Antikörpern von Kaninchen, immunisiert mit f77, f78, Bet v 1 und c1, analysiert.

Das Antiserum aus einem mit Bet v 1-immunisierten Kaninchen (22164-105) konnte aufgrund eines zu geringen Volumens von Biogenes nicht IgG-spezifisch gereinigt werden. Obwohl die IgG-Konzentration nicht bekannt war, wurde dieses Serum analog zu den restlichen IgG-gereinigten Kaninchenserum verdünnt.

Tabelle 52: Artifizielle humane Seren aus IgG-gereinigten Kaninchenserum und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungen der IgG-gereinigten Kaninchenserum (immunisiert mit f77, f78, Bet v 1, c1) mit jeweils drei Konzentrationen des CD64-IgE Fc Moleküls getestet.

Allergen	Kaninchen-IgG lot	Verdünnung Kaninchen-IgG (1/)	CD64-IgE Fc Molekül		
			1,0 mmol/mL	0,5 mmol/mL	0,1 mmol/mL
			IU/mL		
f77	23459-91	50	14,76	9,40	3,96
		100	14,08	7,00	3,94
		200	12,44	7,28	3,36
	23460-91	50	15,38	12,01	6,31
		100	17,04	10,01	5,72
		200	16,31	8,89	3,45
F78	22057-140	50	1,38	0,85	0,52
		100	1,41	1,00	0,62
		200	1,16	1,00	0,54
	22058-140	50	0,83	0,60	0,38
		100	0,84	0,68	0,39
		200	0,73	0,57	0,36
Bet v 1	22163-133	50	24,86	12,45	5,66
		100	24,00	13,76	4,62
		200	26,18	12,68	4,24
	22164-105*	50	7,38	2,89	1,55
		100	6,10	2,87	1,57
		200	6,25	2,94	1,55
c1	23455-91	50	49,30	22,22	10,96
		100	36,11	16,41	9,38
		200	28,22	15,44	7,41
	23456-91	50	55,26	38,27	16,38
		100	45,73	32,19	14,00
		200	48,15	25,84	12,00

* Anstelle von gereinigten IgG-Antikörpern handelt sich um ein Antiserum.

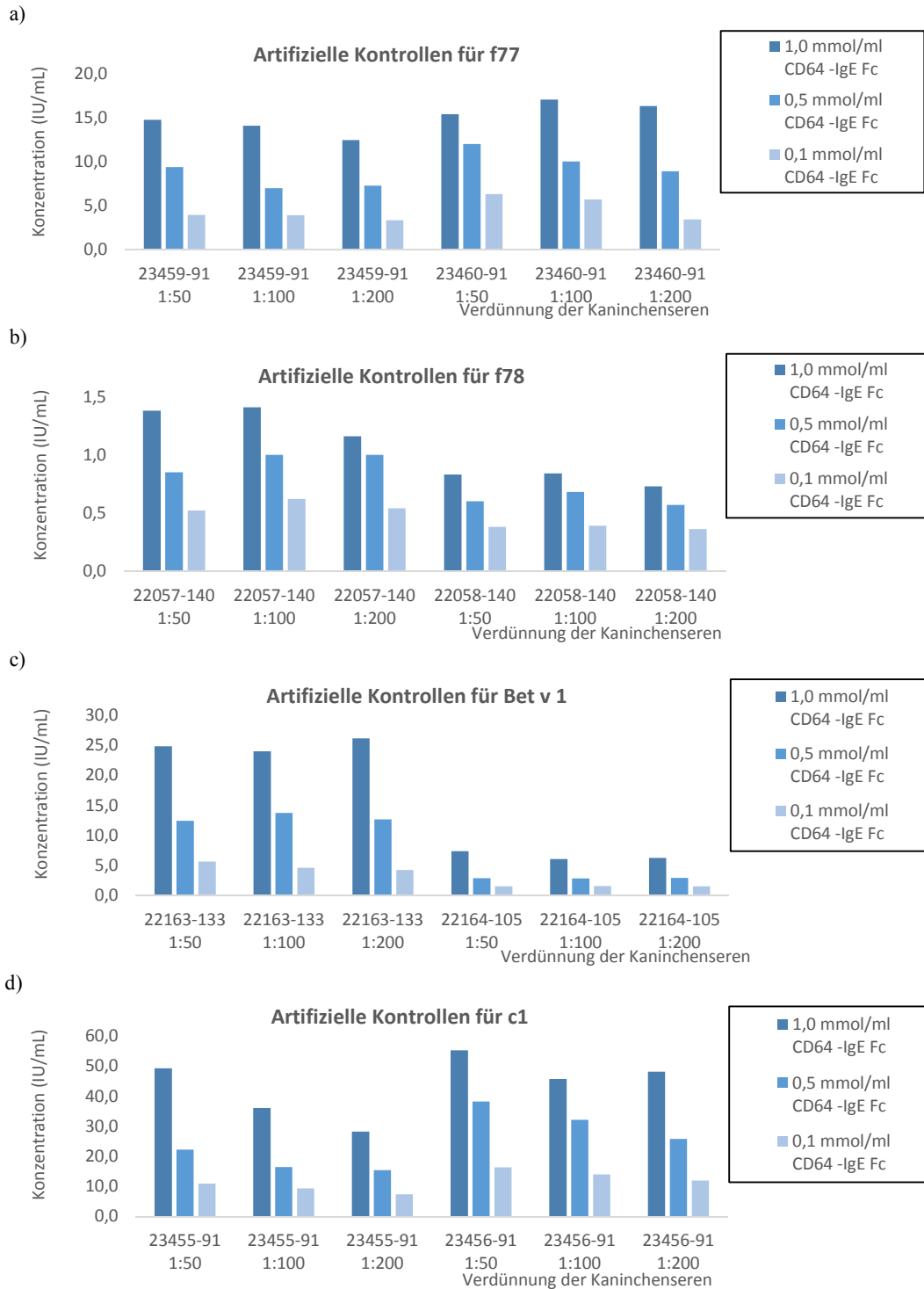


Abbildung 43: Grafische Darstellung der Ergebnisse artifizierlicher humaner Seren getestet im spezifischen IgE REAST (siehe Tabelle 52). Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungen der IgG-gereinigten Kaninchenserum mit jeweils drei Konzentrationen des CD64-IgE Fc Moleküls getestet. Es wurde die ermittelte sIgE-Konzentration gegen die Verdünnung der Kaninchenserum aufgetragen. Die Ergebnisse sind für jedes Allergen in einem separaten Diagramm dargestellt: Humane artifizierliche Kontrollen für f77 (a), für f78 (b), für Bet v 1 (c) und für c1 (d).

Alle getesteten IgG-gereinigten Kaninchenserum zeigten nach Präinkubation mit dem Adapter-Molekül eine deutliche Reaktion gegen das jeweilige Allergen, wobei die Intensität der Reaktion

zwischen den Kaninchenproben variierte. Alle getesteten Verdünnungen der Kaninchen-IgG-Antikörper lieferten mit steigender Konzentration des Adapter-Moleküls auch höhere Signale gegen das jeweilige Allergen (siehe Abbildung 43). Die Ergebnisse der beiden Kaninchenseren getestet mit Bet v 1 variierten stark, wobei es sich bei der Probe 22163-133 um gereinigte IgG-Antikörper handelte und bei der Probe 22164-105 um ein nicht gereinigtes Antiserum.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass prinzipiell für die aufgeführten Allergene artifizielle humane Seren aus allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül hergestellt werden können, die Ausbeuten aber vermutlich durch weitere Aufreinigungen und Titrationen noch optimiert werden könnten.

5.6.1 Steigerung der Reaktivität artifizieller humaner Seren durch allergenspezifische Aufreinigung der Kaninchen-Antikörper

Die Gesamt-IgG-Fraktion immunisierter Kaninchen wurde nochmals allergenspezifisch aufgereinigt. Die Durchführung der Kopplung des jeweiligen Allergens an eine 1 mL „HiTrap™ NHS-activated HP“ Säule sowie die allergenspezifische Aufreinigung der Kaninchen-IgG-Antikörper ist in Kapitel 4.4.2.2 beschrieben.

Nach der allergenspezifischen Aufreinigung der IgG-gereinigten Kaninchenseren wurden die Fraktionen, die im Chromatogramm einen Peak zeigten, dialysiert (siehe Kapitel 4.4.4) und die Proteinkonzentration photometrisch bei 280 nm mittels NanoDrop bestimmt (Extinktionskoeffizient für IgG: $1,35 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (126)). Die Ergebnisse der Proteinbestimmung sowie der Anteil gereinigter IgG-Antikörper (fraktioniert à 0,5 mL) bezogen auf die Gesamt-IgG-Konzentration vor der Aufreinigung (Aufreinigung von 2 mL IgG-Antikörper) sind in Tabelle 53 dargestellt. Die Gesamt-IgG-Fraktion von einem Kaninchen, das mit 4 Allergenen aus *Hevea brasiliensis* (Hev b 5- 8) immunisiert wurde, wurde mittels gekoppelten k82 Extrakt aufgereinigt. Bei den restlichen Aufreinigungen wurde immer das Allergen der Immunisierung verwendet.

Der Anteil gereinigter IgG-Antikörper bezogen auf die Gesamt-IgG-Konzentration vor der Aufreinigung lag zwischen 0,30 % und 4,99 % für die oben beschriebenen Aufreinigungen. Die Anzahl der analysierten Fraktionen variierte von einer bis zu drei Fraktionen und wurde abhängig von der Lage und Breite des Peaks im Chromatogramm gewählt. Die IgG-Konzentrationen nach Aufreinigung lagen zwischen 0,1 mg/mL und 1,62 mg/mL für alle Fraktionen.

Tabelle 53: Analyse Kaninchen-IgG-Antikörper nach allergenspezifischer Aufreinigung. Proteinkonzentrationen der Kaninchen-IgG-Antikörper nach allergenspezifischer Aufreinigung (0,5 mL je Fraktion) sowie Berechnung des prozentualen Anteils an allergen-gereinigten IgG-Antikörpern im Verhältnis zu der Gesamt-IgG-Konzentration vor der Aufreinigung (Aufreinigung von je 2 mL).

Aufgereinigt mit	Kaninchen-IgG lot	IgG-Konzentration vor Aufreinigung (mg/mL)	Ausgewählte Fraktion nach Aufreinigung	OD Messung nach Dialyse (280 nm)	IgG-Konzentration nach allergenspezifischer Aufreinigung (mg/mL)	Anteil gereinigter Antikörper (%)
f76	23457-91	14,53	4	2,2	1,62	3,13%
			5	0,27	0,20	
f77	23459-91	16,52	4	1,3	0,96	1,60%
			5	0,13	0,10	
f78	22057-140	13,32	7	0,49	0,36	0,68%
Bet v 1	22163-133	11,68	6	0,5	0,37	1,01%
			7	0,13	0,10	
c1	23455-91	7,76	4	0,12	0,09	0,61%
			5	0,13	0,10	
f17	25297-49	11,84	6	0,9	0,66	4,99%
			7	0,67	0,49	
			8	0,25	0,18	
d1	24936-49	6,81	6	0,36	0,26	2,46%
			7	0,56	0,41	
	24937-49	7,95	7	0,46	0,34	2,33%
			8	0,55	0,40	
m3	24938-49	6,99	7	0,56	0,41	2,15%
			8	0,26	0,19	
	24939-49	10,64	7	1,1	0,81	2,30%
			8	0,23	0,17	
k82	25295-49	12,66	6	0,21	0,15	0,30%

Exemplarisch wurde vor und nach der f76- und f77-spezifischen Aufreinigung die Reaktivität gegen das jeweilige Allergen im ELISA gemessen. Es wurde ein IgG-ELISA zur quantitativen Bestimmung von spezifischem IgG in humanem Serum oder Plasma (siehe Kapitel 4.5.9) verwendet, jedoch wurde das anti-human IgG-HRP gegen ein anti-rabbit IgG-HRP ausgetauscht (siehe Abbildung 44). Nach der f76-spezifischen Aufreinigung war die Reaktivität gegen f76 signifikant höher, als vor der Aufreinigung. Der Unterschied der Reaktionen vor und nach f77-spezifischer Aufreinigung war deutlich geringer, wobei die f77-spezifischen Antikörper bereits vor der Aufreinigung höhere Werte liefert im Vergleich zu der nicht-allergen gereinigten f76 Probe.

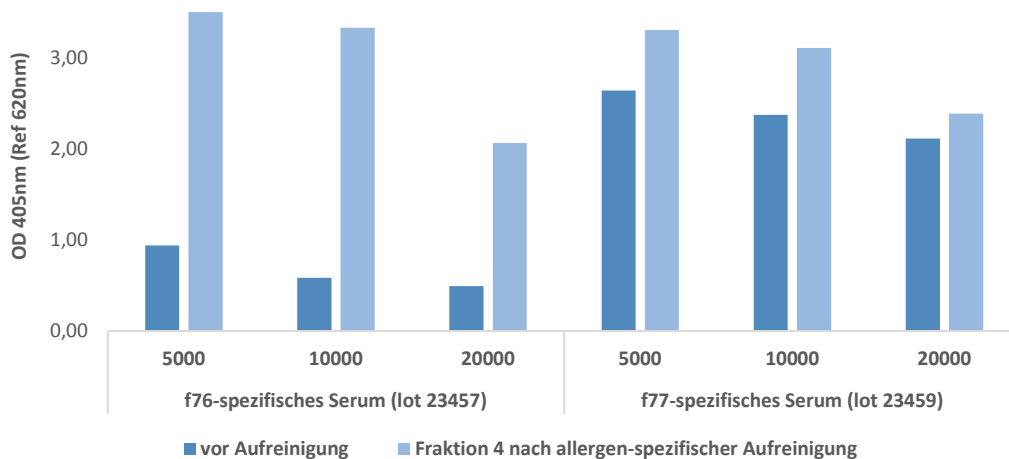


Abbildung 44: Vergleichende Darstellung der Reaktionen vor und nach f76- und f77-spezifischer Aufreinigung von Kaninchen-IgG. Der Nachweis erfolgte im IgG ELISA unter Verwendung von anti-rabbit IgG HRP (1/5000) anstatt anti-human IgG.

Es blieb zu prüfen, ob die Aufreinigungen, unabhängig von der Reaktivität der gereinigten Antikörper, die Reaktivität in Kombination mit dem CD64-IgE Fc Konstrukt begünstigt. Es war denkbar, dass die Abtrennung nicht allergenspezifischer IgG-Antikörper dazu führt, dass überwiegend die allergenspezifischen IgGs von dem Konstrukt gebunden werden und folglich das Verhältnis von eingesetzter Konstrukt-Konzentration zur allergenspezifischen Reaktion steigen müsste. Daher wurden zur Herstellung artifizierender humaner Seren, bestehend aus allergen-gereinigten Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül, die Komponenten für 1 h in PBS mit 5 % (w/v) BSA inkubiert. Zum Vergleich wurde die Gesamt-IgG-Probe sowie zwei Fraktionen der f76-spezifischen Aufreinigung im spezifischen IgE REAST analysiert (siehe Tabelle 54).

Tabelle 54: Artificielle humane Seren unter Verwendung von Kaninchen-Gesamt-IgG-Antikörpern und allergen-gereinigten IgG-Antikörpern im spezifischen IgE REAST. Es wurde die Probe 23457-91 (Immunisierung mit f76) vor und nach der allergenspezifischen Aufreinigung mit dem CD64-IgE Fc Molekül getestet. Es wurden serielle Verdünnungen der Ansätze mit allergenspezifischem IgG getestet.

Allergen	Kaninchen-IgG-Probe	Verdünnung Kaninchen-IgG (1/)	CD64 IgE Fc (ng/mL)	IU/mL
f76	23457-91 Gesamt-IgG gereinigt	100	2.500	43,47
f76	23457-91 Fraktion 4 der allergen-spezifischen Aufreinigung	1.000	250,0	> 100,00
		2.000	125,0	> 100,00
		4.000	62,5	67,10
		8.000	31,3	16,66
		16.000	15,6	5,95
		32.000	7,8	2,25
		64.000	3,9	1,01
f76	23457-91 Fraktion 5 der allergen-spezifischen Aufreinigung	128.000	2,0	0,46
		1.000	250,0	> 100,00
		2.000	125,0	> 100,00
		4.000	62,5	30,19
		8.000	31,3	9,69
		16.000	15,6	3,22
		32.000	7,8	1,45
64.000	3,9	0,59		
		128.000	2,0	0,27

Alle getesteten f76-gereinigten Kaninchen-IgG-Antikörper zeigten nach Präinkubation mit dem Adapter-Molekül eine deutliche Reaktion gegen f76, wobei die Intensität der Reaktion mit der Konzentration des Adapter-Moleküls und der Verdünnung der f76-spezifischen Antikörper korrelierte. Es wurde eine Verdünnung der Gesamt-IgG-Antikörper von 1/100 mit einer Konzentration von 2,5 µg/mL CD64-IgE Fc getestet. Im REAST wurde mit diesem Ansatz 43,47 IU/mL erzielt. Im Vergleich lieferten die Fraktionen der allergenspezifischen Aufreinigung deutlich höhere Werte, obwohl die Antikörper sowie das Adapter-Molekül stärker verdünnt eingesetzt wurden. Es wurden die Fraktionen 1/1.000 verdünnt und jeweils mit 0,25 µg/mL CD64-IgE Fc inkubiert. Diese Ansätze wurden bis zu einer Antikörperverdünnung von 1/128.000 und einer CD64-IgE Fc Konzentration von 2,0 ng/mL seriell verdünnt. Ab einer Verdünnung von 1/4.000 der allergenspezifisch gereinigten Antikörper und 62,5 ng/mL CD64-IgE Fc konnten Werte innerhalb des Messbereichs des ELISAs ermittelt werden. Es handelte sich bei diesen Ansätzen um eine 40-fach stärkere Verdünnung im Vergleich zu dem Ansatz mit nicht allergen-gereinigten Antikörpern. Bedingt durch die Aufreinigung wurden die Antikörper zweifach aufkonzentriert, da zur Aufreinigung 2 mL Gesamt-IgG eingesetzt wurde und die allergenspezifischen Antikörper in 2 Fraktionen à 0,5 mL eluiert wurden. Dennoch ist der Reaktionsanstieg nach Aufreinigung, bezüglich der Antikörperkonzentration vor und nach Aufreinigung (siehe Tabelle 53), deutlich.

Dies ist ein Indiz dafür, dass ein Großteil der von dem CD64-IgE Fc gebundenen Antikörper vor der Aufreinigung nicht allergenspezifisch war. Für die Evaluierung artifizieller humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro* Allergiediagnostik wurden daher im weiteren Verlauf ausschließlich allergen-gereinigte Kaninchen-Antikörper verwendet.

5.7 Evaluierung artifizieller humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro* Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgE

In diesem Kapitel werden Titrationsanalysen zur Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses von allergen-gereinigten Antikörpern und dem rekombinanten Adapter-Molekül beschrieben. Danach wurde die Stabilität der artifiziellen humanen Seren überprüft. Der Validierungsprozess umfasste beschleunigte und Real-Time-Stabilitätsuntersuchungen, Untersuchungen der Langzeitstabilität sowie den Einfluss von Konservierungstoffen gegen mikrobielle Verunreinigungen. Kombinationen aus Adapter-Molekül und Antikörpern, die den Anforderungen in initialen Analysen entsprachen, wurden anschließend erzeugt und in weiteren Assay-Formaten auf ihre Funktionalität hin überprüft.

5.7.1 Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses von allergenspezifischen Antikörpern und CD64-IgE Fc

Das optimale Mengenverhältnis von allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörper und dem rekombinant hergestellten Adapter-Molekül CD64-IgE Fc wurde im REAST, einem ELISA zur Konzentrationsbestimmung von humanem sIgE, bestimmt. Dazu wurden Kreuztitrationen der allergen-gereinigten Antikörper und dem CD64-IgE Fc Molekül durchgeführt. Die Ergebnisse der Kreuztitrationen sind exemplarisch für die Proben der d1-, m3-, f17- und k82-spezifischen Aufreinigungen in Tabelle 55 bis Tabelle 58 beschrieben. Das optimale Mengenverhältnis aller allergen-gereinigten Antikörper zu dem Adapter-Molekül ist in Tabelle 60 dargestellt.

Tabelle 55: Untersuchung artifizierlicher humaner Seren unter Verwendung von d1-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurde die Probe der d1-spezifischen Aufreinigung (siehe Tabelle 53) seriell verdünnt (1/100 bis 1/12.800) und mit 1 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül inkubiert. Zudem wurde das CD64-IgE Fc Molekül seriell verdünnt (2,5 µg/mL bis 19,5 ng/mL) und mit einer konstanten Verdünnung der d1-spezifischen Antikörper (1/1.000) inkubiert.

Verdünnung allergen-spezifischer Antikörper (1/)	CD64-IgE Fc (ng/mL)	24936-49, Fraktion 6 (IU/mL)	24936-49, Fraktion 7 (IU/mL)	24937-49, Fraktion 7 (IU/mL)	24937-49, Fraktion 8 (IU/mL)
100	1.000,0	100,00	100,00	100,00	100,00
200		100,00	100,00	100,00	100,00
400		100,00	100,00	100,00	100,00
800		100,00	100,00	100,00	100,00
16.00		90,66	100,00	100,00	100,00
32.00		16,31	37,71	100,00	65,36
64.00		11,06	16,30	47,63	17,06
128.00		8,94	9,00	20,64	10,21
1.000	2.500,0	32,97	37,84	100,00	43,97
	1.250,0	76,60	100,00	100,00	100,00
	625,0	100,00	100,00	100,00	100,00
	312,5	100,00	100,00	100,00	99,83
	156,3	34,55	42,28	74,16	60,86
	78,1	13,02	16,17	25,79	25,12
	39,1	4,42	6,95	9,38	9,64
	19,5	2,05	3,09	3,61	3,50

Alle getesteten d1-spezifischen Antikörper-Verdünnungen zeigten nach Präinkubation mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktion gegen d1. Bei konstanter CD64-IgE Fc Konzentration (1,0 µg/mL) nahm die Reaktion mit steigender Verdünnung der spezifischen Antikörper ab. Bis zu einer Antikörper-Verdünnung von 1/800 wurden für alle Proben Werte oberhalb der Nachweisgrenze (100 IU/mL) ermittelt. Die Proben lieferten ab Verdünnungen von 1/1.600 bis 1/6.400, abhängig von der Antikörper-Charge und -Fraktion, Werte im zulässigen Messbereich. Ab dieser Verdünnung war die Konzentration an d1-spezifischen Antikörpern nicht mehr ausreichend, um alle Bindungsplätze der CD64-IgE Fc Moleküle, gebunden an der anti-IgE-immobilisierten Mikrotiterplatte, zu besetzen.

Bei dem Einsatz einer konstanten Konzentration von d1-spezifischen Antikörpern nahm die Reaktion bei drei von vier Proben bis zur Nachweisgrenze zu, bis sie dann mit sinkender Konzentration des Adapter-Moleküls wieder abnahm. Bei diesen drei Proben lag das Adapter-Molekül (bei einer Konzentration von 2,5 µg/mL) vermutlich im Überschuss vor, sodass die Mikrotiterplatte von freiem CD64-IgE Fc blockiert war. Die stärkste Verdünnung von spezifischen Antikörpern und CD64-IgE Fc Molekül, bei der noch die maximale Reaktion erreicht wurde, wird als optimales Mengenverhältnis bezeichnet. Als maximale Reaktion wurden Konzentrationen ab 90 IU/mL bezeichnet, da ab diesem Wert die Standardkurve in ein Plateau (Sättigung) verläuft

(siehe Abbildung 41). Zur Herstellung artifizieller Kontrollen für d1 wäre das optimale Mengenverhältnis für alle vier gereinigten Antikörper-Fractionen folgendermaßen: 312,5 ng/mL CD64-IgE Fc und 1/1.000 Verdünnung der spezifischen Antikörper. Die Konzentrationsverhältnisse zwischen Adapter-Molekül und spezifischem Antikörper, berechnet anhand der Konzentration nach Aufreinigung und der eingesetzten Verdünnung, sind in Tabelle 60 dargestellt. Diese lagen, abhängig von der Fraktion, zwischen 0,8 und 1,3 bezogen auf die Menge an CD64-IgE Fc zu d1-spezifischen Antikörpern. Dieses Mengenverhältnis wurde für die weiteren Ansätze artifizieller humaner Seren verwendet, unabhängig von der eingesetzten Konzentration beider Komponenten. In Tabelle 56 sind die Ergebnisse der Kreuztitrationen der m3-spezifisch gereinigten Antikörper mit dem CD64-IgE Fc Molekül dargestellt. Alle m3-gereinigten Antikörper-Fractionen zeigten nach Präinkubation mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktionen gegen m3. Auch bei zwei von vier m3-spezifischen Fractionen nahm die Reaktion bei konstanter CD64-IgE Fc Konzentration (1,0 µg/mL) mit steigender Verdünnung der spezifischen Antikörper ab. Bei den anderen zwei Fractionen wurden bei allen Antikörper-Verdünnungen Werte oberhalb der Nachweisgrenze (100 IU/mL) ermittelt.

Tabelle 56: Untersuchung artifizieller humaner Seren unter Verwendung von m3-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurde die Probe der m3-spezifischen Aufreinigung (siehe Tabelle 53) seriell verdünnt (1/400 bis 1/3.200) und mit 1 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül inkubiert. Zudem wurde das CD64-IgE Fc Molekül seriell verdünnt (1,0 µg/mL bis 125,0 ng/mL) und mit einer konstanten Verdünnung der m3-spezifischen Antikörper (1/1.000) inkubiert.

Verdünnung allergenspezifischer Antikörper (1/)	CD64-IgE Fc (µg/mL)	24938-49, Fraktion 7 (IU/mL)	24938-49, Fraktion 8 (IU/mL)	24939-49, Fraktion 7 (IU/mL)	24939-49, Fraktion 8 (IU/mL)
400	1,0	100,00	100,00	100,00	100,00
800		100,00	100,00	100,00	100,00
1.600		100,00	45,94	100,00	41,16
3.200		100,00	16,41	100,00	14,68
1.000	1,00	100,00	79,10	100,00	100,00
	0,50	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,25	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,125	99,90	95,93	94,70	47,35

Bei dem Einsatz einer konstanten Konzentration von m3-spezifischen Antikörpern nahm die Reaktion bei einer Probe bis zur Nachweisgrenze zu, bis sie dann mit sinkender Konzentration des Adapter-Moleküls wieder abnahm. Bei den anderen drei Proben wurden bei der höchsten CD64-IgE Fc Konzentration Werte oberhalb des Messbereichs ermittelt. Alle drei Proben lieferten ab einer CD64-IgE Fc Konzentration von 125,0 ng/mL Werte im zulässigen Messbereich. Zur Herstellung einer artifiziellen Kontrolle für m3 aus der Probe 24939-49, Fraktion 8

wurde folgendes Mengenverhältnis ermittelt: 250,0 ng/mL CD64-IgE Fc und 1/1.000 Verdünnung der spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 56). Für die restlichen drei Fraktionen m3-spezifischer Antikörper galt folgendes Mengenverhältnis: 125,0 ng/mL CD64-IgE Fc und 1/1.000 Verdünnung der spezifischen Antikörper. Die Konzentrationsverhältnisse zwischen Adapter-Molekül und m3-spezifischem Antikörper lagen, abhängig von der Fraktion, zwischen 0,7 und 6,5 bezogen auf die Menge an CD64-IgE Fc zu m3-spezifischem Antikörper. Dieses Mengenverhältnis wurde für die weiteren Ansätze artifizieller humaner Seren verwendet, unabhängig von der eingesetzten Konzentration beider Komponenten.

In Tabelle 57 sind die Ergebnisse der Kreuztitrationen der f17-spezifisch gereinigten Antikörper mit dem CD64-IgE Fc Molekül dargestellt. Alle f17-gereinigten Antikörper-Fraktionen zeigten nach Präinkubation mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktion gegen f17. Bei allen drei f17-spezifischen Fraktionen nahm die Reaktion bei konstanter CD64-IgE Fc Konzentration (0,5 µg/mL) mit steigender Verdünnung der spezifischen Antikörper ab. Ebenfalls nahmen die Reaktionen bei dem Einsatz einer konstanten Konzentration von f17-spezifischen Antikörpern mit sinkender Konzentration des Adapter-Moleküls ab.

Tabelle 57: Untersuchung artifizieller humaner Seren unter Verwendung von f17-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurde die Probe der f17-spezifischen Aufreinigung (siehe Tabelle 53) seriell verdünnt (1/800 bis 1/6.400) und mit 0,5 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül inkubiert. Zudem wurde das CD64-IgE Fc Molekül seriell verdünnt (250,0 ng/mL bis 31,3 ng/mL) und mit einer konstanten Verdünnung der f17-spezifischen Antikörper (1/800) inkubiert.

Verdünnung allergen-spezifischer Antikörper (1/)	CD64-IgE Fc (ng/mL)	25297-49, Fraktion 6 (IU/mL)	25297-49, Fraktion 7 (IU/mL)	25297-49, Fraktion 8 (IU/mL)
800	500,0	100,00	100,00	94,67
1.600		100,00	100,00	31,07
3.200		100,00	77,00	12,19
6.400		45,55	18,26	4,57
800	250,0	100,00	100,00	82,73
	125,0	63,11	49,15	37,86
	63,5	17,68	15,95	13,90
	31,3	9,34	7,43	7,16

Zur Herstellung einer artifiziellen Kontrolle für f17 aus der Probe 25297-49, Fraktion 8 wurde folgendes Mengenverhältnis ermittelt: 500,0 ng/mL CD64-IgE Fc und 1/800 Verdünnung der spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 57). Für die restlichen zwei Fraktionen f17-spezifischer Antikörper galt folgendes Mengenverhältnis: 250,0 ng/mL CD64-IgE Fc und 1/800 Verdünnung der spezifischen Antikörper. Die Konzentrationsverhältnisse zwischen Adapter-Molekül und spezifischem Antikörper lagen, abhängig von der Fraktion, zwischen 0,9 und 3,3 bezogen auf die Menge an CD64-IgE Fc zu f17-spezifischem Antikörper.

Tabelle 58 beschreibt die Ergebnisse der Kreuztitrationen der k82-spezifisch gereinigten Antikörper mit dem CD64-IgE Fc Molekül. Es wurde lediglich die Gesamt-IgG-Fraktion eines Kaninchens aufgereinigt. Aus dieser Aufreinigung wurde nur eine Fraktion weiter verwendet. Bei dieser k82-spezifischen Fraktion nahm die Reaktion bei konstanter CD64-IgE Fc Konzentration (0,5 µg/mL) mit steigender Verdünnung der spezifischen Antikörper ab. Ebenfalls nahmen die Reaktionen bei dem Einsatz einer konstanten Konzentration von k82-spezifischen Antikörpern mit sinkender Konzentration des Adapter-Moleküls ab. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Kreuztitrationen lieferte die Titration der k82-spezifischen Antikörper mit dem CD64-IgE Fc Molekül deutlich niedrigere Reaktionen. Anstatt Werte oberhalb der Nachweisgrenze wurde bei der höchsten Konzentration beider Komponenten lediglich 1,88 IU/mL erzielt.

Tabelle 58: Untersuchung artifizieller humaner Seren unter Verwendung von k82-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurde die Probe der k82-spezifischen Aufreinigung (siehe Tabelle 53) seriell verdünnt (1/800 bis 1/6.400) und mit 0,5 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül inkubiert. Zudem wurde das CD64-IgE Fc Molekül seriell verdünnt (250,0 ng/mL bis 31,3 ng/mL) und mit einer konstanten Verdünnung der k82-spezifischen Antikörper (1/800) inkubiert.

Verdünnung allergenspezifischer Antikörper (1/)	CD64-IgE Fc (ng/mL)	25295-49, Fraktion 6 (IU/mL)
800	500,0	1,88
1.600		0,77
3.200		0,31
6.400		0,20
800	250,0	1,73
	125,0	1,41
	63,5	0,92
	31,3	0,43

Aufgrund der niedrigen Reaktion der k82-spezifischen artifiziellen humanen Seren wurden die k82-spezifischen Kaninchen-Antikörper stärker konzentriert eingesetzt (siehe Tabelle 59). Zudem wurden die artifiziellen humanen Seren auch auf die Komponenten Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8 getestet. Mit diesen vier Proteinen wurden die Kaninchen immunisiert, die Gesamt-IgG-Fraktion wurde jedoch anhand einer k82-immobilisierten Säule aufgereinigt. Die Testung auf k82 zeigte, dass eine höhere Antikörper-Konzentration zu einer Erhöhung der Reaktion führte, dennoch wurden nicht annähernd Werte oberhalb der Nachweisgrenze erreicht. Die Reaktion gegen Hev b 6 fiel deutlich höher aus, während die Reaktion gegen Hev b 5 und Hev b 7 wieder niedriger, aber vergleichbar war. Es konnte keine Reaktion der artifiziellen Kontrollen gegen Hev b 8 ermittelt werden. Obwohl keine maximale Reaktion (> 90 IU/mL) erreicht wurde, wurde zur weiteren Herstellung artifizieller Kontrollen für k82 die Probe 25295-49, Fraktion 6 verwendet. Es wurde folgendes Mengenverhältnis eingesetzt: 250,0 ng/mL CD64-

IgE Fc und eine 1/100 Verdünnung der spezifischen Antikörper. Daraus resultierte ein Konzentrationsverhältnis von Adapter-Molekül zu spezifischem Antikörper von 6,0.

Tabelle 59: Untersuchung artifizieller humaner Seren unter Verwendung von k82-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül im spezifischen IgE REAST. Es wurde die Probe der k82-spezifischen Aufreinigung (lot 25295-49, Fraktion 6) 1/100 verdünnt und mit 0,25 µg/mL CD64-IgE Fc Molekül inkubiert. Dieser Ansatz wurde seriell weiter verdünnt (3 Verdünnungsstufen). Alle Ansätze wurden auf k82, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8 getestet.

Verdünnung allergenspezifischer Antikörper (1/)	CD64 IgE Fc (ng/mL)	IU/mL				
		k82	Hev b 5	Hev b 6	Hev b 7	Hev b 8
100	250,0	10,03	1,89	72,13	2,40	0,31
200	125,0	3,42	0,86	21,46	1,14	0,21
400	62,5	1,49	0,42	9,53	0,56	0,17

Es wurden für alle allergen-gereinigten Kaninchen-Antikörper Kreuztitrationen mit dem Adapter-Molekül durchgeführt. Die Verdünnungen von spezifischen Antikörpern und dem CD64-IgE Fc Molekül, bei der noch die maximale Reaktion (> 90 IU/mL) erreicht wurde, sind in Tabelle 60 dargestellt. Zudem sind in dieser Tabelle die optimalen Mengenverhältnisse aller allergenspezifischer Antikörper zu dem Adapter-Molekül aufgeführt. Ähnlich wie die Kreuztitration von k82-spezifischen Kontrollen, fielen auch die Ergebnisse für f78 aus. Auch hier lag lediglich eine gereinigte Fraktion vor, die nach der Präinkubation mit dem CD64-IgE Fc Molekül keine maximale Reaktion lieferte. Auch bei dieser Probe wurde die Kombination von Adapter-Molekül und spezifischen-Antikörper festgelegt, die die höchste Reaktion lieferte.

Die Konzentrationsverhältnisse zwischen Adapter-Molekül und allen allergen-gereinigten Kaninchen-IgG-Antikörper lagen zwischen 0,7 und 14,4 (siehe Tabelle 60). Diese Mengenverhältnisse wurden für die weiteren Ansätze artifizieller humaner Seren, unabhängig von der eingesetzten Konzentration beider Komponenten, verwendet.

Tabelle 60: Übersicht der optimalen Mengenverhältnisse des CD64-IgE Fc Moleküls zu allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern zur Herstellung artifizierlicher humaner Seren.

Allergen	Kaninchen-IgG Lot nach allergenspezifischer Aufreinigung	Optimale Menge allergen-gereinigter IgGs ($\mu\text{g/mL}$)	Optimale Menge CD64-IgE Fc (ng/mL)	Verhältnis CD64-IgE Fc zu Antikörper (1/)
f76	23457-91, Fr. 4	0,8	125,0	6,5
	23457-91, Fr. 5	0,1	125,0	0,8
f77	23459-91, Fr. 4	1,0	250,0	3,8
	23459-91, Fr. 5	0,1	250,0	0,4
f78	22057-140, Fr. 7	3,6	250,0	14,4*
Bet v 1	22163-133, Fr. 6	0,4	125,0	3,0
	22163-133, Fr. 7	0,1	125,0	0,8
c1	23455-91, Fr. 4	0,5	125,0	3,6
	23455-91, Fr. 5	0,5	125,0	4,0
f17	25297-49, Fr. 6	0,8	250,0	3,3
	25297-49, Fr. 7	0,6	250,0	2,5
	25297-49, Fr. 8	0,2	500,0	1,8
d1	24936-49, Fr. 6	0,3	312,5	0,8
	24936-49, Fr. 7	0,4	312,5	1,3
	24937-49, Fr. 7	0,3	312,5	1,1
	24937-49, Fr. 8	0,4	312,5	1,3
m3	24938-49, Fr. 7	0,4	125,0	3,3
	24938-49, Fr. 8	0,2	125,0	1,5
	24939-49, Fr. 7	0,8	125,0	6,5
	24939-49, Fr. 8	0,2	250,0	0,7
k82	25295-49, Fr. 6	1,5	250,0	6,0*

* Maximale Reaktion ($> 90 \text{ IU/mL}$) wurde nicht erreicht

5.7.2 Stabilitätsstudie artifizierlicher humaner Seren

Nachdem das Verfahren zur Herstellung artifizierlicher humaner Seren etabliert war, wurde die Stabilität dieser Seren überprüft. Der Validierungsprozess umfasste beschleunigte und *Real-Time*-Stabilitätsuntersuchungen. Beschleunigte Stabilitätsuntersuchungen werden in der Regel dazu verwendet, die Stabilität von Komponenten der *in vitro* Diagnostik (IVD) vor Beendigung der *Real-Time*-Stabilitätsuntersuchungen abzuschätzen. Dazu werden die Produkte extremen Bedingungen, in der Regel hohen Temperaturen, ausgesetzt. Basierend auf einer Annäherung mittels Arrhenius-Gleichung, ergibt sich für die beschleunigte Stabilitätsprüfung ein „simulierter“ Testzeitraum. Näherungsweise wird dieser „simulierte“ Testzeitraum durch die Multiplikation der Dauer der Stabilitätsuntersuchung mit dem Faktor, um den die Temperatur erhöht wurde, kalkuliert. Erhöht man die Lagertemperatur beispielsweise von $5 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und kann man nach

drei Monaten keine veränderten Reaktionen messen, so würde man eine Haltbarkeit des Produkts von 12 Monaten, gelagert bei 5 °C vermuten. Die Ergebnisse der *Real-Time*-Stabilitätsuntersuchungen definieren jedoch die endgültige *shelf-life* der IVD Komponente.

Zur Konservierung der artifiziellen humanen Seren gegen mikrobielle Verunreinigungen wurde Natriumazid (NaN₃) verwendet. Der bereits etablierte Verdünnungspuffer (PBS mit 5 % (w/v) BSA) wurde nach der Zugabe von 0,05 % NaN₃ zur Verdünnung des CD64-IgE Fc Moleküls und der allergenspezifischen Antikörper verwendet.

Die Kombination aus CD64-IgE Fc Molekül und allergenspezifischen Antikörpern für den Ansatz artifizieller humaner Seren, die für die Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 61 beschrieben.

Tabelle 61: Ansatz artifizieller humaner Seren (ARTHUS) unterschiedlicher Spezifität für die Stabilitätsuntersuchung.

Charge (ARTHUS)	Spezifität der ARTHUS	Kaninchen-IgG Lot nach allergenspezifischer Aufreinigung	Allergen-gereinigte IgG-Konzentration (ng/mL)	CD64-IgE Fc Konzentration (ng/mL)
Probe 1	d1	24936-49, Fr.6	62,5	78,1
Probe 2	d1	24936-49, Fr.6	31,3	39,1
Probe 3	Bet v 1	22163-133, Fr 7	25,0	31,3
Probe 4	Bet v 1	22163-133, Fr 7	12,5	15,6
Probe 5	f17	25297-49, Fr. 6	206,3	62,5
Probe 6	f17	25297-49, Fr. 6	51,5	15,6
Probe 7	m3	24938-49, Fr. 8	187,5	125,0
Probe 8	m3	24939-49, Fr. 7	101,4	15,6

Es wurden für vier Allergene (d1, Bet v 1, f17 und m3) jeweils zwei artifizielle Kontrollen angesetzt. Das Hauptkriterium für die Bewertung der Stabilität war der prozentuale Variationskoeffizient. Der Variationskoeffizient der Testergebnisse ermittelt im REAST (IU/ml) sollte $\leq 15\%$ für die Kontrollen \geq Klasse 3 sein und $\leq 30\%$ für die Kontrolle $<$ Klasse 3. Für den Einsatz der artifiziellen humanen Seren als Kontrollmaterial sollte eine Haltbarkeit von mindestens 3 Monaten, basierend auf *Real-Time*-Stabilitätstests gewährleistet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Spezifikationen der Stabilitätsuntersuchung wurden in Anlehnung der Spezifikationen für Kontrollen der Dr. Fooke-Laboratorien festgelegt.

Tabelle 62: Ergebnisse der beschleunigten Stabilitätsuntersuchung der artifiziellen humanen Seren getestet im REAST nach 1 und 2 Wochen und nach 1, 2 und 3 Monaten. Die Serumröhrchen wurden geschlossen bei Raumtemperatur (25 °C) gelagert.

Kontrolle	Allergen	Start	1 Woche	2 Wochen	1 Monat	2 Monate	3 Monate	Variationskoeffizient [%]
		IU/ml						
Probe 1	d1	5,43	6,49	6,72	5,86	5,29	4,74	11,94
Probe 2	d1	1,51	1,57	1,69	1,64	1,41	1,65	6,04
Probe 3	Bet v 1	7,18	8,06	8,12	7,45	7,18	8,32	6,01
Probe 4	Bet v 1	3,24	3,29	2,94	2,96	2,78	2,93	5,99
Probe 5	f17	12,90	14,82	13,19	12,47	12,24	12,69	6,48
Probe 6	f17	3,17	3,71	3,22	3,41	3,36	3,73	6,35
Probe 7	m3	30,28	37,52	33,57	27,22	27,53	32,27	11,38
Probe 8	m3	4,10	5,21	4,96	4,35	4,50	5,02	8,49

Tabelle 63: Ergebnisse der Real-Time-Stabilitätsuntersuchung der artifiziellen humanen Seren getestet im REAST nach 2 Wochen und 1, 2 und 3 Monaten. Die Serumröhrchen wurden geschlossen bei 2-8 °C gelagert.

Kontrolle	Allergen	Start	2 Wochen	1 Monat	2 Monate	3 Monate	Variationskoeffizient [%]
		IU/ml					
Probe 1	d1	5,43	6,35	5,87	7,80	6,46	12,51
Probe 2	d1	1,51	1,42	1,58	1,63	1,56	4,63
Probe 3	Bet v 1	7,18	8,06	8,05	9,31	7,98	8,41
Probe 4	Bet v 1	3,24	4,26	4,53	4,45	4,75	12,41
Probe 5	f17	12,90	13,13	12,90	14,79	13,29	5,29
Probe 6	f17	3,17	3,31	3,53	4,05	3,76	8,83
Probe 7	m3	30,28	33,03	31,51	39,42	28,91	11,21
Probe 8	m3	4,10	4,87	4,73	4,74	4,90	6,26

Sowohl bei der beschleunigten Stabilitätsprüfung als auch bei der *Real-Time*-Lagerstabilitätsprüfung wurden Variationskoeffizienten < 15 % erzielt. Basierend auf einer Annäherung mittels Arrhenius-Gleichung, ergibt sich für die beschleunigte Stabilitätsprüfung ein „simulierter“ Testzeitraum von ca. 12 Monaten. Mittels *Real-Time*-Stabilitätsprüfung konnte bislang eine Haltbarkeit von 3 Monaten nachgewiesen werden.

5.7.3 Überprüfung der artifiziellen humanen Seren in verschiedenen Testsystemen zum Nachweis von sIgE

Es wurde für jedes Allergen, welches zur Immunisierung verwendet wurde, artifizielle humane Seren für die Verwendung in Testsystemen zum Nachweis von sIgE hergestellt. Alle Proben wurden gemäß den in Tabelle 60 beschriebenen Verhältnissen von CD64-IgE Fc Molekül zu

allergen-gereinigten Antikörpern angesetzt. Allgemein werden Ergebnisse ab Klasse 2 als positiv gewertet (siehe Tabelle 34), wobei ab Klasse 5 die Standardkurve in ein Plateau (Sättigung) verlaufen kann (siehe Abbildung 41). Daher wurden die Konzentrationen beider Komponenten (CD64-IgE Fc Molekül und allergenspezifische Antikörper) dementsprechend gewählt, dass die Ergebnisse, ermittelt im spezifischen IgE REAST, zwischen Klasse 2 und Klasse 4 (0,7 IU/mL-50 IU/mL) lagen.

Tabelle 64: Artificielle humane Seren wurden gemäß der in Tabelle 60 beschriebenen Verhältnissen von CD64-IgE Fc Molekül zu allergenspezifischen Antikörpern angesetzt und in drei Testsystemen zum Nachweis von sIgE gegen unterschiedliche Allergene getestet. Es sind sowohl die ermittelten Konzentrationen (kU/L für ImmunoCAP®, IU/mL für REAST und U/mL für ALFA) und die daraus resultierenden Klassen als auch die Variationskoeffizienten (Standardabweichung dividiert durch Mittelwert) zwischen den drei Ergebnissen aufgeführt.

Allergen	Kaninchen-IgG nach allergenspezifischer Aufreinigung		CD64-IgE Fc ng/mL	ImmunoCAP®		REAST		ALFA		Variationskoeffizient
	lot	ng/mL		KU/L	Klasse	IU/mL	Klasse	U/mL	Klasse	
f76	23457-91, Fr. 5	25,0	31,25	4,07	3	6,36	3	5,78	3	17,99%
		12,5	15,63	1,88	2	1,16	2	2,28	2	26,13%
f77	23459-91, Fr. 4	237,5	62,50	16,80	3	12,89	3	19,31	4	16,17%
		118,8	31,25	7,57	3	4,66	3	8,74	3	24,54%
f78	22057-140, Fr. 7	3600,0	250,0	75,10	5	1,33	2	8,88	3	116,54%
Bet v 1	22163-133, Fr. 7	25,0	31,25	7,70	3	4,31	3	9,37	3	29,54%
		12,5	15,63	3,10	2	1,09	2	1,76	2	42,13%
t3	22163-133, Fr. 7	25,0	31,25	8,86	3	4,05	3	6,86	3	29,94%
		12,5	15,63	3,98	3	1,43	2	1,57	2	50,31%
c1	23455-91, Fr. 5	250,0	62,50	11,40	3	16,84	3	13,97	3	15,79%
		125,0	31,25	4,84	3	5,47	3	3,49	2	17,96%
f17	25297-49, Fr. 6	206,3	62,50	8,22	3	21,96	4	6,52	3	56,51%
		103,1	31,25	3,77	2	8,02	3	1,57	2	60,12%
d1	24936-49, Fr. 6	62,5	78,10	13,30	3	33,31	4	18,48	4	39,08%
		15,6	19,53	3,61	3	14,61	3	6,78	3	55,48%
d2	24936-49, Fr. 7	25,4	19,53	4,39	3	17,25	3	4,70	3	68,23%
		62,5	78,10	12,50	3	12,26	3	6,33	3	27,54%
		15,6	19,53	3,00	2	6,12	3	2,68	2	39,45%
m3	24938-49, Fr. 7	103,1	31,25	2,74	2	8,69	3	4,12	3	49,06%
		51,6	15,63	0,83	2	3,20	2	1,16	2	60,59%
k82	25295-49, Fr. 6	1500,0	250,0	23,30	4	10,03	3	16,37	3	32,71%
		750,0	125,0	6,93	3	3,42	2	2,38	2	45,87%

Die artifizierten humanen Seren wurden in drei etablierten Testsystemen zum Nachweis von sIgE getestet (Beschreibung der Testsysteme in Kapitel 4.5.7 bis Kapitel 4.5.10). Die Ergebnisse

ermittelt im REAST, ALFA und ImmunoCAP® sind in Tabelle 64 dargestellt. Es sind sowohl die ermittelten Konzentrationen und die daraus resultierenden Klassen als auch die Variationskoeffizienten (Standardabweichung dividiert durch Mittelwert) zwischen den drei Ergebnissen aufgeführt.

Die Ergebnisse von 22 der insgesamt 23 artifiziellen humanen Seren, ermittelt in den drei Testsystemen, weichen um maximal eine Klasse voneinander ab. Die Abweichungen zwischen den Ergebnissen für die f78-spezifische Kontrolle waren deutlich höher und lieferten einen Variationskoeffizient von 116,54 %. Die Variationskoeffizienten der restlichen artifiziellen Kontrollen lagen zwischen 15,79 % und 68,23 % und ergaben einen Mittelwert von 38,28 %. Die besten Übereinstimmungen wurden für die c1-, f76-, f77- und Bet v 1-spezifischen Kontrollen erzielt, gefolgt von den artifiziellen humanen Seren für die Allergenextrakte (k82, m3, f17 und d1). Die Bet v 1-spezifischen Kontrollen zeigten ebenfalls deutliche Reaktionen gegen den gesamten Birkenextrakt (t3), sowie die *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1) -spezifischen artifiziellen humanen Seren auch eindeutig mit dem Extrakt aus *Dermatophagoides farinae* (d2) reagierten. Zum Vergleich wurden ebenfalls humane Seren in den drei etablierten Testsystemen zum Nachweis von sIgE getestet. Es handelte sich um Seren mit sIgE gegen d1, f78, m3 und f17. Es lagen keine klinischen Daten zu diesen Seren vor, lediglich die ermittelten sIgE-Konzentrationen als auch die Variationskoeffizienten zwischen den drei Ergebnissen sind in Tabelle 65 aufgeführt. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 23,77 % und 52,71 % für die einzelnen Seren. Der Mittelwert der Variationskoeffizienten betrug 38,00 %.

Tabelle 65: Humane Seren wurden in drei Testsystemen zum Nachweis von sIgE gegen unterschiedliche Allergene getestet. Es sind sowohl die ermittelte Konzentrationen (kU/L für ImmunoCAP®, IU/mL für REAST und U/mL für ALFA) als auch die Variationskoeffizienten zwischen den drei Ergebnissen aufgeführt.

Allergen	Humane Seren			Variationskoeffizient
	ImmunoCAP® (kU/L)	REAST (IU/mL)	ALFA (U/mL)	
d1	5,71	21,80	10,74	52,71%
	6,85	15,50	9,70	33,69%
	4,71	14,54	6,92	48,27%
f78	87,90	50,70	90,36	23,77%
	0,40	0,46	0,69	24,19%
m3	0,56	2,03	2,75	51,20%
	0,60	1,30	0,59	40,04%
f17	11,50	6,50	14,35	30,09%

Artifizielle humane Seren spezifisch für d1, f17, Bet v 1 und c1 wurden titriert und in den drei etablierten Testsystemen gegen das jeweilige Allergen bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 45 mittels einer Pearson-Korrelation dargestellt. Da das Allergen c1 nicht für den ALFA erhältlich ist, konnten die titrierten Kontrollen im ALFA nicht gegen c1 getestet werden.

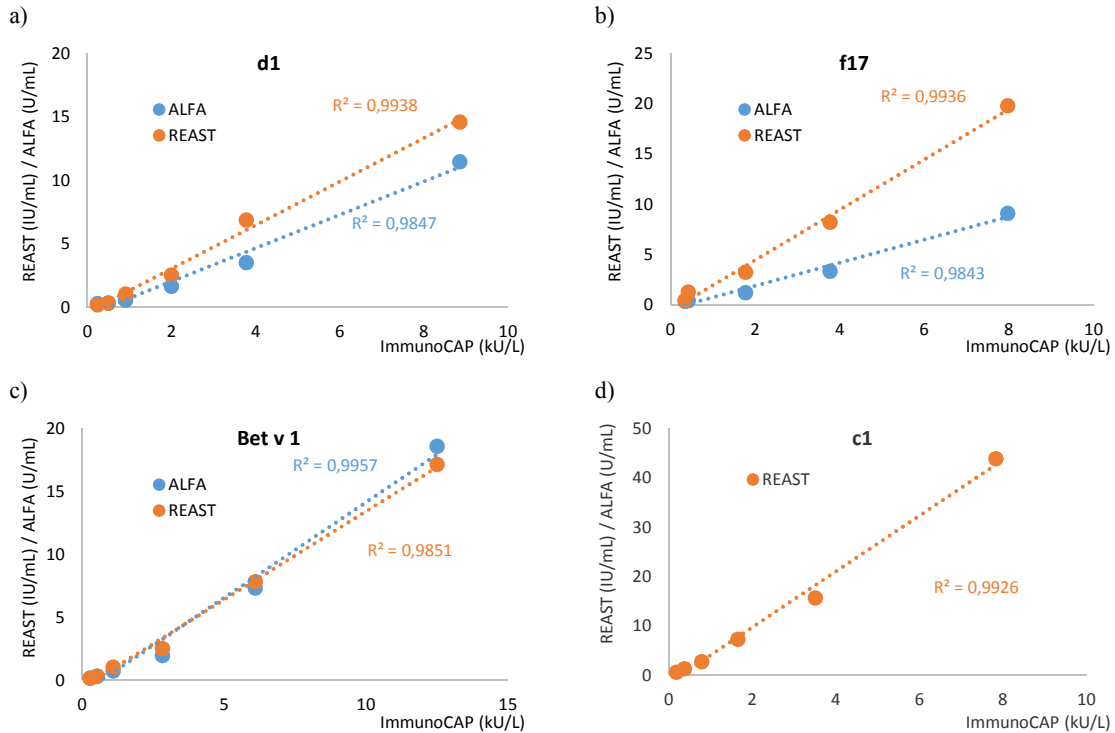


Abbildung 45: Pearson-Korrelation titrierter artifizierender humaner Seren spezifisch für d1 (a), f17 (b), Bet v 1 (c) und c1 (d). Es wurde der Korrelationskoeffizient der Ergebnisse erzielt im ImmunoCAP[®] gegen die Ergebnisse erzielt im REAST und ALFA kalkuliert. Das Allergen c1 ist nicht für den ALFA erhältlich.

Obwohl die Ergebnisse der artifizierten Kontrollen (dargestellt in Tabelle 64) ermittelt im ImmunoCAP[®], REAST und ALFA voneinander abweichen, lieferten alle Kontrollen Korrelationskoeffizienten (Pearson's r) von > 0,98, wodurch sich ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Werten eindeutig bestätigen lässt.

Zur Überprüfung, ob eine Immunisierung mit einzelnen Allergenen eine bessere Übereinstimmung der Ergebnisse verschiedener Testsysteme im Vergleich zur Immunisierung mit Allergenextrakten liefert, wurden Kaninchen mit einer Mischung aus rekombinant hergestellten Allergenen sowie mit einem Allergenextrakt immunisiert. Es wurden Kaninchen mit Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8 immunisiert und die daraus resultierenden artifizierten Kontrollen auf sowohl diese Allergene (außer Hev b 8) als auch auf Latextrakt (k82) getestet. Ebenfalls wurden Kaninchen mit Haselnussextrakt (f17) immunisiert und sowohl die f17-spezifische Reaktion als auch die Reaktion gegen einzelne Allergene der Haselnuss bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.

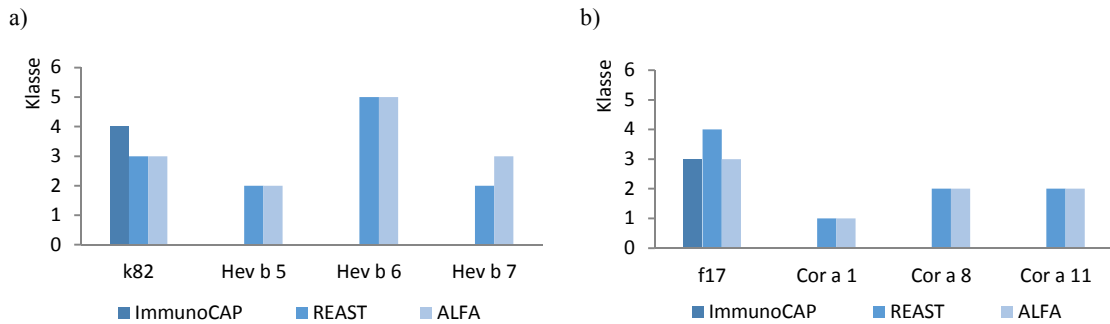


Abbildung 46: Vergleichende Darstellung artifizierender humaner Seren gegen Latexkomponenten und Haselnussextrakt. a) Testung eines artifizierten humanen Serums auf k82 (im ImmunoCAP®, REAST und ALFA) und auf Hev b 5, Hev b 6 und Hev b 7 (im REAST und ALFA). Es wurde die korrespondierende Klasse der ermittelten Konzentration dargestellt. Das artifizierende humane Serum wurde aus IgG-Antikörpern von Kaninchen, die mit Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7 und Hev b 8 immunisiert worden waren, hergestellt. **b)** Testung eines artifizierten humanen Serums auf f17 (im ImmunoCAP®, REAST und ALFA) und auf Cor a 1, Cor a 8 und Cor a 11 (im REAST und ALFA). Es wurde die korrespondierende Klasse der ermittelten Konzentration dargestellt. Das artifizierende humane Serum wurde aus IgG-Antikörpern von Kaninchen, die mit f17-Extrakt immunisiert worden waren, hergestellt.

Die Ergebnisse der Testung artifizierter Kontrollen auf Allergenextrakte und einzelne Allergene zeigten eine maximale Abweichung von einer Klasse, unabhängig von der Immunisierung mit einem Allergenextrakt oder einer Mischung rekombinant hergestellter Allergene. Das artifizierende humane Serum aus IgG-Antikörpern von Kaninchen, die mit einer Mischung von rekombinanten Latexallergenen immunisiert wurden, zeigte deutliche Reaktionen gegen die verfügbaren rekombinanten Allergene im REAST und ALFA. Zudem konnten vergleichbare Ergebnisse aller drei Testsysteme für die Bestimmung der sIgE-Antikörper gegen den gesamten Extrakt (k82) ermittelt werden. Ebenso zeigte das artifizierende humane Serum, welches durch die Immunisierung mit f17-Extrakt produziert wurde, zusätzlich zu den Reaktionen gegen den Extrakt auch vergleichbare Reaktionen gegen die verfügbaren rekombinanten Allergene (Cor a 1, Cor a 8, und Cor a 11) im REAST und ALFA.

5.8 Rekombinante Herstellung und Evaluierung der humanen IgG1 und IgG4 Fc Regionen und des humanen FcγRI Rezeptors

Zur Herstellung von Adapter-Molekülen, bestehend aus den konstanten Regionen der IgG Subklassen 1 oder 4 und der extrazellulären Domäne des humanen FcγRI Rezeptors, wurden die Komponenten zunächst separat in HEK293-Zellen exprimiert und mittels IMAC gereinigt. Ziel war es, den humanen FcγRI Rezeptor auf Mikrotiterplatten zu immobilisieren und die Funktionalität mit den IgG1 Fc und IgG4 Fc Regionen zu überprüfen. Die etablierten FcγRI-beschichteten Mikrotiterplatten wurden im weiteren Verlauf zur Analyse der Affinität von mutierten Fc Fragmenten verwendet.

Die DNA-Sequenzen, die für die humane IgG1 und IgG4 Fc Region codieren, wurden bei Eurofins Genomics bestellt, während die DNA für den humanen CD64 Rezeptor direkt aus der CD64-IgE Fc DNA-Sequenz amplifiziert wurde. Alle Sequenzen wurden mittels kombinierter 3-Schritt / 2-Schritt-PCR amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide verfügten am 3'- und 5'-Ende über homologe Sequenzen zu dem pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis, sprich homologe Sequenzen zur Signalsequenz und His-Tag-Sequenz (siehe Tabelle 22). Die DNA der Plasmid-Präparationen, die mit der theoretischen DNA-Sequenz übereinstimmten, wurden zur Transfektion von HEK293-Zellen verwendet. Die Transfektionen von HEK293-Zellen mit den Expressionsvektoren pcDNA3.1/zeo_Signal_4xHis_IgG1 Fc, _IgG4 Fc und _ECD Fc γ RI wurden in Analogie zu den beschriebenen Parametern in Tabelle 44 durchgeführt. Es wurde jeweils eine Rollerflasche mit der gesamten Zellzahl einer zu ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche angeimpft, bevor die Proteine aus dem Zellkulturüberstand anhand des Polyhistidin-Tags mittels IMAC aufgereinigt wurden.

Das Chromatogramm der Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem IgG1 Fc Fragment zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) von Fraktion 16 bis Fraktion 19. Die Fraktionen 16-19 wurden im PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert und anhand eines Markers mit definiertem MG identifiziert. Alle Fraktionen zeigten die intensivste Bande zwischen 50 kDa und 70 kDa. Weitere schwächere Banden sind zwischen 100 kDa und 150 kDa zu sehen. Die Fraktionen 16-19 wurden gepoolt und dialysiert. Danach wurde die gepoolte Probe mittels Western Blot hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-IgG-Antikörper analysiert.

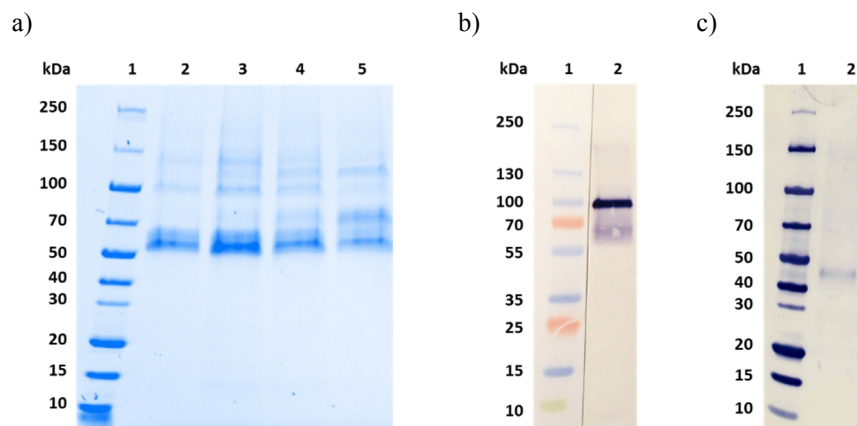


Abbildung 47: Analyse der Fraktionen der IMAC von IgG1 Fc im PAGE-Gel und Western Blot. a) Fraktionen 16-19, aufgetragen in einem 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Es wurde von allen Proben 5 μ L je Tasche aufgetragen. Spur 1: Protein Standard, PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Fraktion 16, Spur 3: Fraktion 17, Spur 4: Fraktion 18, Spur 5: Fraktion 19. b) Gepoolte Fraktionen 16-19, aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blot. Es wurde 5 μ L Probe je Tasche aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit anti-IgG-HRP (1/500) und präzipitierendem TMB inkubiert (Streifen 2). Streifen 1: Protein Standard: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (3 μ L aufgetragen). c) Gepoolte Fraktionen 16-19, aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blot. Es wurde 5 μ L Probe je Tasche aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit anti-Polyhistidin-Tag-HRP (1/2.000) und präzipitierendem TMB inkubiert (Streifen 2). Streifen 1: Protein Standard: PageRuler™ Broad Range Protein Ladder (5 μ L aufgetragen).

Das Gemisch der Fraktionen 16 - 19 der IgG1 Fc Aufreinigung zeigte im Western Blot, inkubiert mit anti-human IgG-HRP, lediglich eine Bande bei ca. 100 kDa. Eine Bande dieser Größe war auch im PAGE-Gel (siehe Abbildung 47a) sichtbar, jedoch handelte es sich bei dieser Bande nicht um die prominenteste Bande. Das humane IgG1 CH₁ - CH₃ Fragment besitzt je Polypeptidkette ein MG von 36,11 kDa. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen liegt das Fragment als Dimer vor und müsste demnach ein MG von ca. 72 kDa aufweisen. Zur Überprüfung, ob es sich bei der 100 kDa Bande in Abbildung 47b) um das IgG1 Fc Fragment handelte, wurde eine Fraktion im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen analysiert (siehe Abbildung 47c). Der Blot mit einem anti-Polyhistidin-Tag-HRP zeigte eine Bande ca. 10 kDa größer im Vergleich zum theoretischen MG des Fragments. Vermutlich weicht das Laufverhalten, aufgrund der Glykosylierung, von dem theoretischen MG des IgG1 Fc Fragments ab.

Das Chromatogramm der Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem IgG4 Fc Fragment zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) von Fraktion 11 bis Fraktion 18. Die Fraktionen 11-18 sowie eine Probe des Zellkulturüberstands vor Aufreinigung und eine Probe des Durchlaufs wurden im PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Fraktionen 14 - 17 wurden gepoolt und dialysiert. Danach wurde die gepoolte Probe mittels Western Blot hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-IgG-Antikörper analysiert.

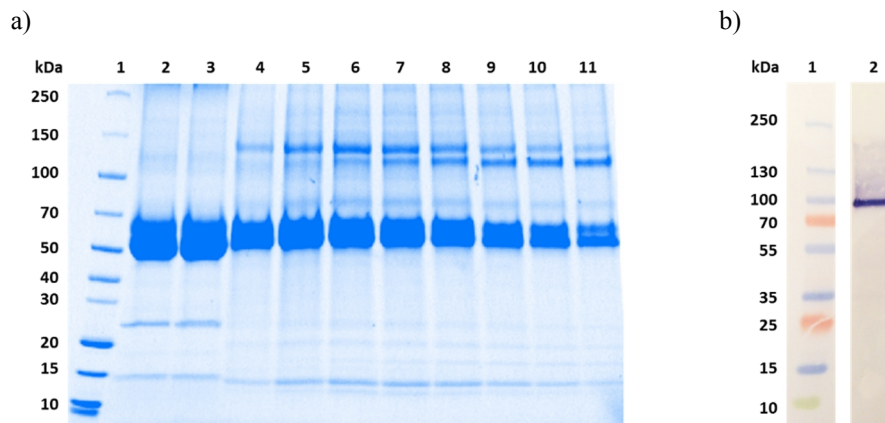


Abbildung 48: Analyse der Fraktionen der IMAC von IgG4 Fc im PAGE-Gel und Western Blot. a) Fraktionen 11-18 sowie des Zellkulturüberstands vor Aufreinigung und Durchfluss, aufgetragen in einem 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Es wurde von allen Proben 5 µL je Tasche aufgetragen. Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, Spur 3: Durchfluss, Spur 4: Fraktion 11, Spur 5: Fraktion 12, Spur 6: Fraktion 13, Spur 7: Fraktion 14, Spur 8: Fraktion 15, Spur 9: Fraktion 16, Spur 10: Fraktion 17, Spur 11: Fraktion 18. b) Gepoolte Fraktionen 14-17, aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blot. Es wurde 5 µL Probe aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit anti-IgG-HRP (1/500) und präzipitierendem TMB inkubiert (Streifen 2). Streifen 1: Protein Standard: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (3 µL aufgetragen).

Alle Fraktionen zeigten die intensivste Bande zwischen 50 kDa und 70 kDa. Die Intensität dieser Bande nahm mit steigender Fraktionsnummer ab. Fraktion 18 macht deutlich, dass es sich um zwei Banden handelte, die aufgrund der Intensität in den vorherigen Fraktionen visuell nicht zu trennen waren. Zwei weitere Banden waren zwischen 100 kDa und 150 kDa zu sehen, wobei die Intensität der unteren Bande mit steigender Fraktionsnummer zunahm und die Intensität der höheren Bande mit steigender Fraktionsnummer abnahm. Weitere schwächere Banden waren zwischen 10 kDa und 30 kDa zu sehen.

Das Gemisch der Fraktionen 14 - 17 der IgG4 Fc Aufreinigung zeigte im Western Blot, inkubiert mit anti-human IgG-HRP, lediglich eine Bande bei ca. 100 kDa. Eine Bande dieser Größe war auch im PAGE-Gel (siehe Abbildung 48) sichtbar, jedoch handelte es sich bei dieser Bande nicht um die prominenteste Bande. Das humane IgG4 CH₁ - CH₃ Fragment besitzt je Polypeptidkette 35,94 kDa. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen liegt das Fragment als Dimer vor und müsste demnach ebenfalls ein MG von ca. 72 kDa aufweisen. Vermutlich weicht das Laufverhalten ebenfalls aufgrund der Glykosylierung von dem theoretischen MG des IgG4 Fc Fragments ab.

5.8.1 Etablierung des humanem FcγRI Rezeptors im ELISA zur Bindung der IgG1 Fc und IgG4 Fc Region

Das Chromatogramm der IMAC von Polyhistidin-markiertem FcγRI Rezeptor zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) von Fraktion 15 bis Fraktion 19. Zudem war ein deutlicher Peak in der Waschfraktion zu erkennen. Die Fraktionen 15 - 19, eine Probe des Zellkulturüberstands vor der Aufreinigung, eine Probe des Durchlaufs sowie eine Probe der Waschfraktion wurden im PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Mittels Western Blot wurden die Fraktionen hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-human-rabbit-IgG-HRP analysiert.

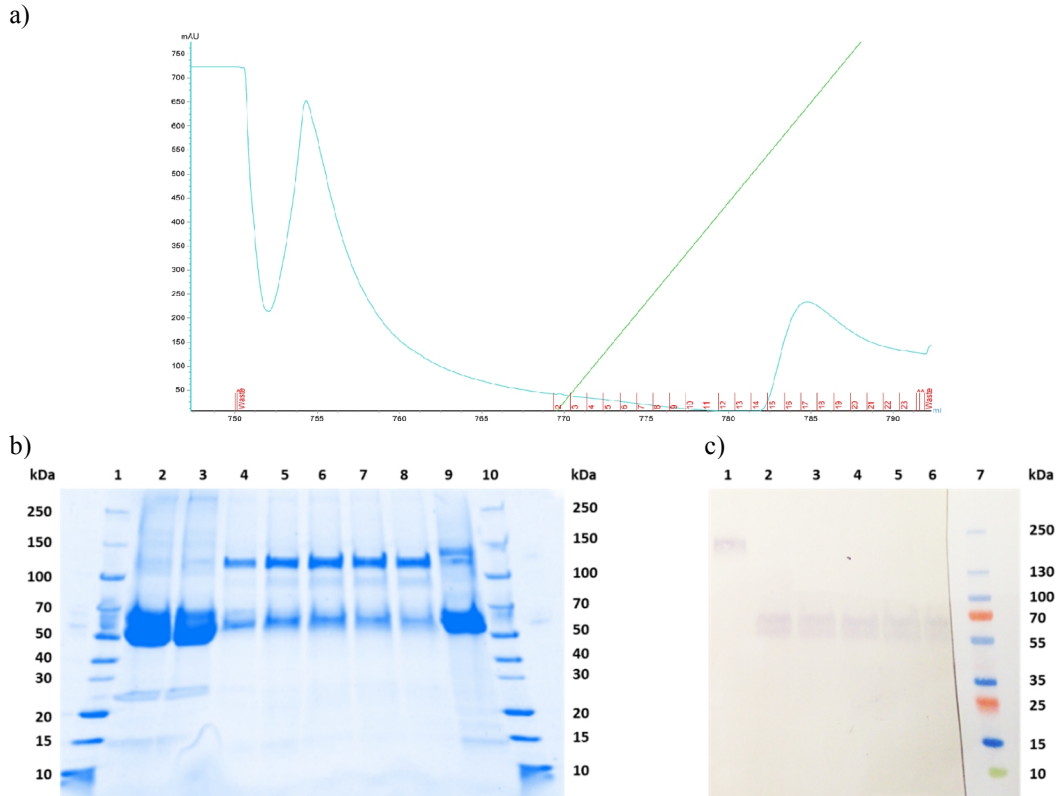


Abbildung 49: Chromatogramm der IMAC von FcγRI und Analyse einzelner Fraktionen im PAGE-Gel und Western Blot. **a)** Ausschnitt des Chromatogramms der IMAC von FcγRI aus 750 mL Zellkulturüberstand mittels gebrauchsfertiger Nickel-Sepharose-Säule „HisTrap™ excel“ mit 1 mL Säulenvolumen. **b)** Fraktionen 15-19 sowie der Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, der Durchfluss und die Waschfraktion, aufgetragen in einem 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Es wurde von allen Proben 5 µL je Tasche aufgetragen. Spur 1 und Spur 10: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, Spur 3: Durchfluss, Spur 4: Fraktion 15, Spur 5: Fraktion 16, Spur 6: Fraktion 17, Spur 7: Fraktion 18, Spur 8: Fraktion 19, Spur 9: Waschfraktion. **c)** Fraktionen 15-19 und die Waschfraktion der IMAC, aufgetragen in einem 4 - 20 % Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blot. Es wurden 5 µL Probe je Tasche aufgetragen. Die Nitrozellulose-membran wurde mit rabbit anti-human-IgG-HRP (1/500) und präzipitierendem TMB inkubiert. Spur 1: Waschfraktion, Spur 2: Fraktion 15, Spur 3: Fraktion 16, Spur 4: Fraktion 17, Spur 5: Fraktion 18, Spur 6: Fraktion 19, Spur 7: Protein Standard: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (3 µL aufgetragen).

Alle Fraktionen zeigten die intensivste Bande zwischen 100 kDa und 150 kDa im PAGE-Gel. Die Intensität dieser Bande nahm mit steigender Fraktionsnummer zu. Zudem war eine zweite Bande zwischen 50 kDa und 70 kDa in allen Fraktionen sichtbar. Der Zellkulturüberstand vor der Aufreinigung, der Durchlauf sowie die Waschfraktion zeigten ebenfalls Banden in diesem Bereich. Alle getesteten Fraktionen zeigten eine Bande ähnlicher Intensität zwischen 55 kDa und 70 kDa im Western Blot. Eine Bande dieser Größe war auch im Gel sichtbar, jedoch handelte es sich bei dieser Bande nicht um die prominenteste Bande. Eine Bande der Waschfraktion zwischen 130 kDa und 250 kDa reagierte ebenfalls mit dem rabbit-IgG-HRP-Konjugat. Die Fraktionen 15 - 19 wurden gepoolt, dialysiert und adsorptiv an den Kavitäten von Mikrotiterplatten, gemäß der Durchführung in Kapitel 4.4.5, gebunden. Es wurde die bei 280 nm bestimmte optische Dichte der Lösung näherungsweise als Konzentration verwendet, wobei die Charakterisierung zeigte,

dass die Lösung weitere Proteine beinhaltet. Dennoch wurde die ermittelte Konzentration von 0,22 mg/mL als Ausgangskonzentration zur Beschichtung von Mikrotiterplatten angesehen. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Rezeptors (2 µg/mL, 4 µg/mL und 8 µg/mL), verdünnt in PBS, zur Beschichtung verwendet.

Die aufgereinigten IgG Fc Fragmente wurden sowohl unverdünnt als auch verdünnt in den FcγRI-beschichteten Kavitäten inkubiert. Der Verdünnungspuffer wurde zur Bestimmung des Hintergrundsignals ebenfalls inkubiert. Da im weiteren Verlauf der Arbeit die Affinität des FcγRI Rezeptors zu mutierten IgG Fc Regionen direkt aus dem Zellkulturüberstand bestimmt werden sollte, wurde auch nicht gereinigter Zellkulturüberstand beider IgG Fc Moleküle analysiert. Diese Zellkulturüberstände sowie Zellkulturüberstand nicht transfizierter HEK293-Zellen wurden unverdünnt in den Kavitäten mit der höchsten Beschichtungskonzentration (8 µg/mL) inkubiert.

Tabelle 66: Analyse der mit FcγRI Rezeptor beschichteten Mikrotiterplatten mit aufgereinigten IgG1 Fc und IgG4 Fc Fragmenten sowie Zellkulturüberständen. Der Nachweis erfolgte mittels anti-human IgG-HRP (1/1.000) und TMB.

Probe	Verdünnung der Probe 1/	Beschichtungskonzentration		
		2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL
OD 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm)				
Zellkulturüberstand IgG1-Fc	-	-	-	0,437
IgG1-Fc nach Aufreinigung	-	0,986	1,631	2,083
	2	0,724	1,482	1,902
	4	0,385	1,316	1,825
	8	0,289	1,066	1,615
Zellkulturüberstand IgG4-Fc	-	-	-	0,278
IgG4-Fc nach Aufreinigung	-	0,275	0,528	0,720
	2	0,188	0,385	0,548
	4	0,139	0,281	0,401
	8	0,088	0,191	0,300
Verdünnungspuffer	-	0,024	0,018	0,018
Zellkulturüberstand nicht transfizierter HEK293-Zellen	-	-	-	0,106

Bei allen inkubierten Proben stieg die gemessene OD mit zunehmender Beschichtungskonzentration an. Die Reaktionen mit dem Verdünnungspuffer waren deutlich geringer, als mit den gereinigten IgG Fc Fragmenten, sodass eine unspezifische Reaktion des Konjugats mit der immobilisierten Proteinlösung auszuschließen war. Ebenfalls nahmen die ODs der gereinigten Antikörperfragmente mit steigender Verdünnung ab. Insgesamt fielen die Reaktionen des gereinigten IgG4 Fragments geringer aus, als die Reaktionen mit dem gereinigten IgG1 Fragment, wobei keine Proteinkonzentration der beiden Präparationen vorlag.

Die Reaktion mit Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen war zwar deutlich höher, als mit Verdünnungspuffer, dennoch lieferten die Zellkulturüberstände der transfizierten Zellen doppelt

bis vierfach höhere Werte. Auch bei den analysierten Zellkulturüberständen waren die ermittelten ODs mit dem IgG1 Fragment höher, als mit dem IgG4 Fragment, wobei auch hier keine Beurteilung der spezifischen Konzentration beider Fragmente im Zellkulturüberstand vorlag. Insgesamt lässt sich festhalten, dass beide IgG Fragmente mit dem Fc γ RI, beschichtet auf Mikrotiterplatten, deutliche Reaktionen in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen aller Komponenten lieferten. Die Reaktionen des IgG4 Fc Moleküls waren geringer, als die Reaktionen des IgG1 Fc Moleküls mit dem Fc γ RI, wobei keine Konzentration der Antikörperfragmente in den jeweiligen Lösungen vorlag. Die Zellkulturüberstände der transfizierten Zellen zeigten signifikant höhere Ergebnisse im Vergleich zu dem Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden daher zur Analyse der Bindungsaffinitäten mutierter IgG Fragmente die Zellkulturüberstände eingesetzt. Es wurden für diese Analysen die Mikrotiterplatten mit 8 μ g/mL der Fc γ RI Präparation beschichtet.

5.9 Rekombinante Herstellung und Evaluierung des humanen CD64-IgG4 Fc Moleküls

Zur Herstellung des CD64-IgG4 Fc Fragments wurde die für den Fc γ RI Rezeptor codierende DNA mittels PCR an die für das IgG4 Fc Fragment codierende DNA fusioniert. Dazu wurde die DNA-Sequenz des Fc γ RI Rezeptors mit komplementären Sequenzen zu der humanen IgG4-Sequenz und die humane IgG4-Sequenz mit komplementären Sequenzen zu dem Fc γ RI-Rezeptor flankiert.

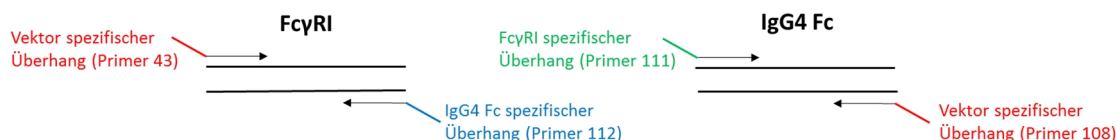


Abbildung 50: Schematische Darstellung: Flankierung des Fc γ RI Rezeptors mit komplementären Sequenzen zu der humanen IgG4-Sequenz und die humane IgG4-Sequenz mit komplementären Sequenzen zu dem Fc γ RI.

Die PCR zur Herstellung der Amplifikate mit komplementären Überhängen wurden bei einer Annealingtemperatur von 60 °C und Extensionszeit von 20 s durchgeführt. Danach wurden die gereinigten Amplifikate mittels einer Megaprimer-PCR miteinander verbunden und vervielfältigt. Zur Bindung der komplementären Überhänge wurde zuerst eine Annealingtemperatur von 60 °C eingestellt und nach der Zugabe der flankierenden Oligonukleotide eine Annealingtemperatur von 72 °C gewählt. Das PCR-Produkt wurde isoliert und dann mittels SLIC Methode in den mittels SfoI linearisierten pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis kloniert. One Shot® OmniMax™ 2T1^R-Zellen

wurden mit den SLIC Reaktionsansätzen transformiert. DNA der Plasmid-Präparationen, die mit der theoretischen DNA-Sequenz übereinstimmten, wurden zur Transfektion von HEK293-Zellen mit dem pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis_CD64-IgG4 Fc verwendet.

Es wurde eine Rollerflasche mit der gesamten Zellzahl einer zu ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche angeimpft, bevor die Proteine aus 300 mL Zellkulturüberstand anhand des Polyhistidin-Tags mittels IMAC aufgereinigt wurden. Das Chromatogramm der Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem CD64-IgG4 Fc Fragment zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) von Fraktion 11 bis Fraktion 14. Fraktion 10 wurde bei ca. 17 % Elutionspuffer eluiert und Fraktion 14 bei ca. 38 % Elutionspuffer. Die Fraktionen 10-20 wurden in zwei PAGE-Gelen analysiert. Zudem wurde mittels Western Blot das Bandenmuster der Fraktionen hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-Polyhistidin-Tag-HRP-Antikörper analysiert.

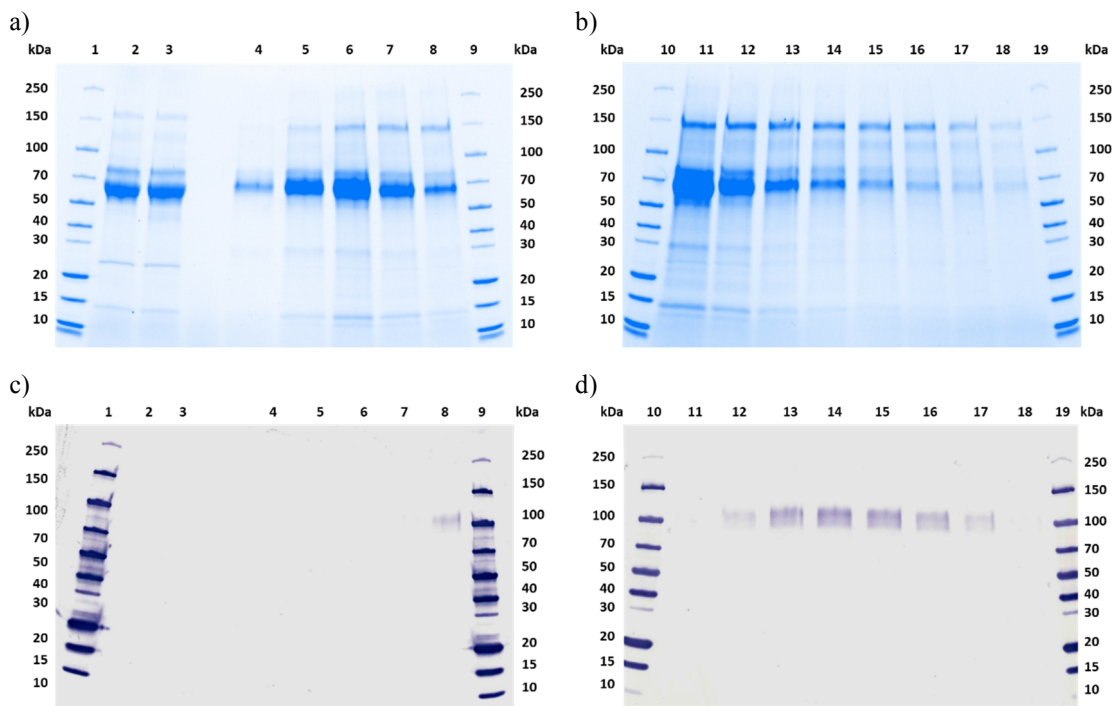


Abbildung 51: Analyse der Fraktionen der IMAC von CD64-IgG4 Fc im PAGE-Gel und Western Blot. a), b) Fraktionen 10-20 sowie der Zellkulturüberstand vor Aufreinigung und der Durchfluss, aufgetragen in zwei 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gele unter reduzierenden Bedingungen. c) ,d) Western Blot der PAGE-Gele, Nachweis mit anti-Polyhistidin-Tag-HRP (1/2.000) und präzipitierendem TMB. Je Probe wurden 5 µL aufgetragen. Spur 1, 9, 10 und 19: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, Spur 3: Durchfluss, Spur 4: Fraktion 10, Spur 5: Fraktion 11, Spur 6: Fraktion 12, Spur 7: Fraktion 13, Spur 8: Fraktion 14, Spur 11: Fraktion 13, Spur 12: Fraktion 14, Spur 13: Fraktion 15, Spur 14: Fraktion 16, Spur 15: Fraktion 17, Spur 16: Fraktion 18, Spur 17: Fraktion 19, Spur 28: Fraktion 20.

Alle Fraktion zeigten in den Gelen die intensivste Bande zwischen 50 kDa und 70 kDa. Weitere Banden waren zwischen 100 kDa und 150 kDa, bei ca. 30 kDa und 15 kDa zu sehen. Ein nahezu identisches Bandenmuster zeigten auch die Probe vor Aufreinigung und eine Probe des Durch-

flusses. Im Western Blot konnten jedoch keine reaktiven Banden in diesen zwei Proben nachgewiesen werden. Fraktion 14 bis Fraktion 19 zeigten jeweils eine Bande bei ca. 100 kDa, die mit dem anti-Polyhistidin-Tag-HRP-Antikörper reagierte. Im Gel ist eine Bande dieser Größe lediglich zu erahnen. Aufgrund der geringen Reinheit des Zielproteins wurde die Aufreinigung modifiziert, indem dem Waschpuffer Imidazol hinzugefügt wurde und eine isokratische Elution gewählt wurde. Nach der Aufgabe von 200 mL Zellkulturüberstand über die „HisTrap™ excel“-Säule, wurde der Waschpuffer mit 7,5 % Elutionspuffer versetzt und die Säule mit 20 Säulenvolumina gewaschen, bevor das Zielprotein isokratisch mit 100 % Elutionspuffer eluiert wurde. Das Chromatogramm dieser Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem CD64-IgG4 Fc Fragment mit stringenteren Waschbedingungen zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) in den Waschfraktionen 2 und 3 und einen weiteren Peak in den Elutionsfraktionen 9 bis Fraktion 12. Die Fraktionen 2, 3 und 8-13 wurden im PAGE-Gel analysiert. Zudem wurde mittels Western Blot das Bandenmuster der Fraktionen wieder hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-Polyhistidin-Tag-HRP-Antikörper analysiert.

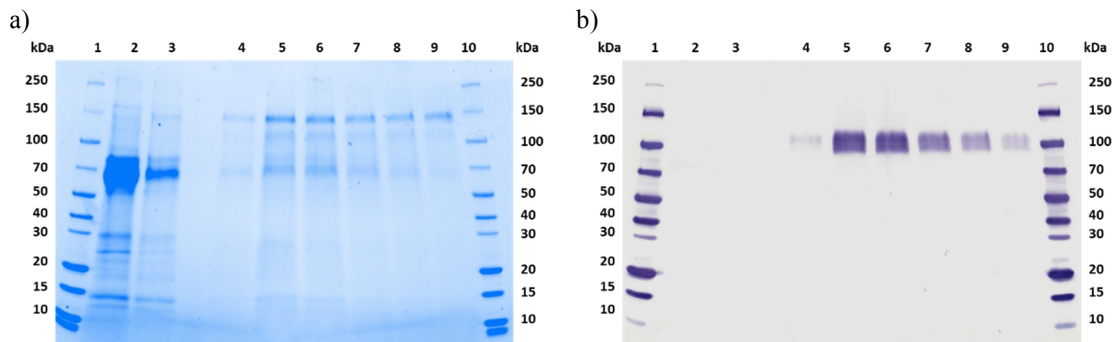


Abbildung 52: Analyse der Fraktionen der IMAC (7,5% Elutionspuffer im Waschschrift) von CD64-IgG4 Fc im PAGE-Gel und Western Blot. a) Fraktionen 2, 3 und 8-13, aufgetragen in einem 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen. b) Western Blot des PAGE-Gels, Nachweis mit anti-Polyhistidin-Tag-HRP (1/2.000) und präzipitierendem TMB. Je Probe wurden 5 µL aufgetragen. Spur 1 und Spur 10: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Fraktion 2, Spur 3: Fraktion 3, Spur 4: Fraktion 8, Spur 5: Fraktion 9, Spur 6: Fraktion 10, Spur 7: Fraktion 11, Spur 8: Fraktion 12, Spur 9: Fraktion 13.

Die Analyse der Waschfraktionen 2 und 3 im Western Blot zeigten, dass auch bei stringenter Waschbedingungen kein Polyhistidin-markiertes CD64-IgG4 Fc Fragment von der Säule abgelöst wird. Die Fraktionen 8-13 der Elution zeigten hingegen jeweils eine Bande bei ca. 100 kDa auf der Nitrozellulosemembran. Im Gel ist eine Bande dieser Größe zwar zu erkennen, jedoch sind zwei weitere Banden (ca. 150 kDa und 70 kDa) intensiver gefärbt.

Es wurden die Fraktionen, die im Western Blot Reaktionen mit dem anti-Polyhistidin-Tag-HRP zeigten (Fraktion 8 - 13), gepoolt und dialysiert und daraufhin hinsichtlich der Fähigkeit allergenspezifisches Kaninchen-IgG zu binden analysiert (siehe Kapitel 5.9.1).

5.9.1 Initiale Versuche zur Kopplung von allergenspezifischen Kaninchen-IgG mit CD64-IgG4 Fc

Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, bindet der humane Fc γ RI Rezeptor (CD64) Kaninchen-IgG-Antikörper mit hoher Affinität. Bei dem Einsatz des Adapter-Moleküls (CD64-IgG4 Fc) sollte der CD64 Rezeptor als Linker zwischen den Kaninchen-IgG-Antikörpern und der konstanten Region der humanen IgG4-Subklasse fungieren.

Mittels Dot Blot wurde geprüft, ob das CD64-IgG4 Fc Molekül einerseits Kaninchen-IgG-Antikörper bindet und andererseits von einem anti-human IgG4-HRP detektiert werden kann.

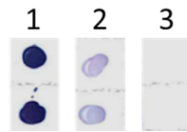


Abbildung 53: Analyse der Bindung zwischen Kaninchen-IgG-Antikörper, CD64-IgG4 Fc und anti-human-IgG4-HRP im Dot Blot. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Kaninchen-IgG (je 0,1 μ g) in Doppelbestimmung bespottet, mit CD64-IgG4 Fc (Streifen 1: 1/100, Streifen 2: 1/1.000), anti-human-IgG4-HRP (1/750) und präzipitierendem TMB inkubiert (Streifen 3: Konjugatkontrolle).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei Kaninchen-IgG-Spots (je 0,1 μ g), die nach der Inkubation mit dem CD64-IgG4 Fc Molekül und der nachfolgenden Detektion mit anti-human-IgG4-HRP eindeutige Reaktionen, in Abhängigkeit der Verdünnung des CD64-IgG4 Fc Moleküls, zeigten. Keine Reaktionen der Kaninchen-IgG-Spots mit dem anti-human-IgG4-HRP wurden nachgewiesen (Streifen 3).

Daraufhin wurde das CD64-IgG4 Fc Konstrukt, in Kombination mit allergenspezifischen Kaninchen-Antikörpern, in einem ELISA zur Bestimmung von sIgG4 (Dr. Fooke Laboratorien) überprüft. Es wurden zwei Verdünnungen der Kaninchen-Antikörper mit zwei Verdünnungen der CD64-IgG4 Fc Aufreinigung aus Kapitel 5.9 getestet. Beide Komponenten wurden in PBS verdünnt. Anstatt humanen Serums oder Plasma wurden zuerst die verdünnten d1-spezifischen Kaninchen-Antikörper in d1-immobilisierten Kavitäten inkubiert, nicht gebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und anschließend das verdünnte CD64-IgG4 Fc Konstrukt inkubiert. Danach wurde der ELISA gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

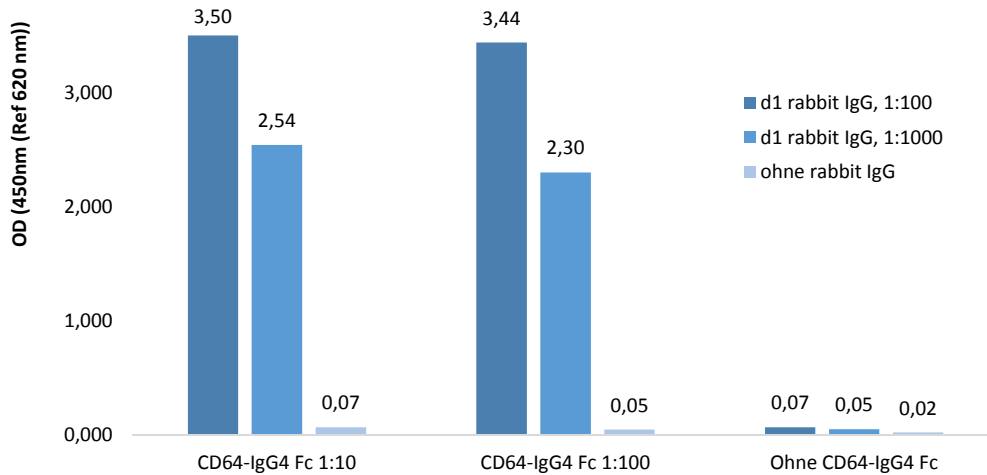


Abbildung 54: Analyse von d1-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern in Kombination mit aufgereinigtem CD64-IgG4 Fc Molekül im ELISA zur Bestimmung von sIgG4. Es wurden zwei Verdünnungen der Kaninchen-Antikörper in d1-immobilisierten Kavitäten vorinkubiert und mit jeweils zwei Verdünnungen CD64-IgG4 Fc inkubiert. Zudem wurden die Kaninchen-Antikörper ohne Zugabe des Konstrukts inkubiert und das Konstrukt ohne Zugabe der Kaninchen-Antikörper (Konjugatkontrolle).

Bei dem Einsatz der höchsten Konzentration der d1-spezifischen Kaninchen-Antikörper und der höchsten Konzentration des CD64-IgG4 Fc Konstrukts wurde ein Wert $> 3,50$ OD (450 nm) erzielt. Die restlichen Kombinationen aus Kaninchen-Antikörper und dem CD64-IgG4 Fc Konstrukt lieferten ODs zwischen 2,30 und 3,44. Die Inkubation von Kaninchen-Antikörper ohne Zugabe des Konstrukts lieferte Werte $< 0,07$ OD, sodass eine Reaktion der Kaninchen-IgG-Antikörper mit dem verwendeten anti-IgG4-HRP-Konjugat auszuschließen war. Die Inkubation des Konstrukts ohne vorherige Inkubation der Kaninchen-Antikörper in den Kavitäten zeigte ebenfalls ODs $< 0,07$, sodass auch eine unspezifische Bindung des Konstrukts mit den d1-immobilisierten Kavitäten zu vernachlässigen war. Daher wurde dieses Konstrukt zur Herstellung artifizierlicher humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro*-Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgG4 verwendet.

5.9.2 Herstellung artifizierlicher humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro*-Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgG4

In diesem Kapitel werden Titrationsanalysen zur Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses von allergenspezifischen Antikörpern und dem rekombinanten Adapter-Molekül beschrieben. Das optimale Mengenverhältnis von allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörper und dem rekombinant hergestellten Adapter-Molekül CD64-IgG4 Fc wurde in einem ELISA zur Konzentrationsbestimmung von humanem sIgG4 (Dr. Fooke Laboratorien) bestimmt. Dazu wurden

Kreuztitrationen der allergenspezifischen Antikörper und dem CD64-IgG4 Fc Molekül durchgeführt und diese für 1h bei RT inkubiert. Es wurden d1- und Bet v 1 - spezifische Antikörper verwendet, da u.a. Immuntherapiepräparate von Hausstaubmilben und Birkenpollen zur Verfügung stehen. Die d1-spezifischen IgG4-Kontrollen wurden ebenfalls auf d2 getestet, da Antikörper in der Regel aufgrund von Kreuzreaktionen gegen beide Hausstaubmilben-Gattungen reagieren. Es wurden die artifiziellen Bet v 1 IgG4-Kontrollen auf Reaktionen gegen den Birkenextrakt (t3) untersucht, da keine Antikörper von t3-immunisierten Tieren vorlagen.

Tabelle 67: Analyse artifizierlicher humaner IgG4-Seren unter Verwendung von d1-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgG4 Fc Molekül auf d1 und d2 im ELISA zum Nachweis von sIgG4. Es wurden die Probe der allergenspezifischen Aufreinigung (siehe Tabelle 53) seriell verdünnt (1/500 bis 1/4.000) und mit einer konstanten Verdünnung (1/100) des CD64-IgG4 Fc Moleküls inkubiert. Zudem wurde das CD64-IgG4 Fc Molekül seriell verdünnt (1/25 bis 1/200) und mit einer konstanten Verdünnung der d1-spezifischen Antikörper (1/1.000) inkubiert.

d1-gereinigte Kaninchen-IgG-Antikörper				CD64-IgG4 Fc Verdünnung 1/	getestet auf d1	getestet auf d2
lot	Konzentration (mg/mL)	Verdünnung 1/	Endkonzentration (µg/mL)		ODs 450 nm (Ref. 620 nm)	
24936-49, Fr.6	0,26	500	0,52	100	1,644	0,459
		1.000	0,26		1,230	0,372
		2.000	0,13		0,950	0,242
		4.000	0,07		0,497	0,162
		1.000	0,26	25	2,017	0,641
		50		1,794	0,565	
		100		1,284	0,355	
		200		0,711	0,208	

Alle getesteten d1-spezifischen Antikörper-Verdünnungen zeigten nach Präinkubation mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktion gegen d1. Bei gleicher Antikörper- und Konstrukt-Konzentration fielen die Reaktionen gegen d2 drei- bis vierfach geringer aus. Bei konstanter CD64-IgG4 Fc Verdünnung (1/100) nahmen die Reaktionen mit steigender Verdünnung der spezifischen Antikörper ab. Ebenfalls nahmen die Reaktionen bei konstanter Antikörper-Konzentration und steigender Verdünnung des Adapter-Moleküls ab.

Tabelle 68: Analyse artifizierlicher humaner IgG4-Seren unter Verwendung von Bet v 1-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem CD64-IgG4 Fc Molekül auf t3 im ELISA zum Nachweis von sIgG4. Es wurden die Probe der allergenspezifischen Aufreinigung (siehe Tabelle 53) seriell verdünnt (1/500 bis 1/4.000) und mit einer konstanten Verdünnung (1/100) des CD64-IgG4 Fc Moleküls inkubiert. Zudem wurde das CD64-IgG4 Fc Molekül seriell verdünnt (1/25 bis 1/200) und mit einer konstanten Verdünnung der t3-spezifischen Antikörper (1/1.000) inkubiert.

Bet v 1-gereinigte Kaninchen-IgG-Antikörper				CD64-IgG4 Fc Verdünnung 1/	getestet auf t3
lot	Konzentration (mg/mL)	Verdünnung 1/	Endkonzentration (µg/mL)		ODs 450 nm (Ref. 620 nm)
22163-133, Fr.6	0,37	500	0,74	100	0,147
		1.000	0,37		0,152
		2.000	0,19		0,140
		4.000	0,09		0,128
		1.000	0,37	25	0,333
				50	0,245
				100	0,150
				200	0,097

Die getesteten Bet v 1-spezifischen Antikörper-Verdünnungen zeigten nach Präinkubation mit dem Adapter-Molekül insgesamt deutlich niedrigere Reaktionen gegen t3, als die d1-spezifischen artifizierlichen IgG4-Kontrollen gegen d1 zeigten. Bei konstanter Antikörper-Verdünnung (1/1.000) nahmen die Reaktionen mit steigender Verdünnung des Adapter-Moleküls ab. Hingegen lieferten die seriellen Antikörper-Verdünnungen ODs zwischen 0,128 und 0,152 bei konstanter Konzentration des Adapter-Moleküls. Der Anteil an Bet v 1 im immobilisierten t3-Extrakt ist nicht bekannt, sodass ein Überschuss an Bet v 1-spezifischen Antikörpern, gemessen an der Bet v 1 immobilisierten Konzentration, nur zu vermuten ist.

Es wurden für die weiteren Ansätze artifizierlicher humaner IgG4-Seren die Komponenten in folgendem Verhältnis, unabhängig von der eingesetzten Verdünnung beider Komponenten, verwendet:

- 1/25 Verdünnung des CD64-IgG4 Fc Konstrukts,
- 1/1.000 Verdünnung der allergenspezifischen Kaninchen-Antikörper.

5.9.3 Evaluierung artifizierlicher humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro*-Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgG4

Es wurden für d1, Bet v 1, f76 und f77 artifizierliche humane Seren für die Verwendung in einem Testsystem zum Nachweis von sIgG4 hergestellt. Alle Proben wurden gemäß den in Kapitel 5.9.2 beschriebenen Verhältnissen von CD64-IgG4 Fc Molekül zu allergenspezifischen Antikörpern angesetzt. Zusätzlich wurden zwei weitere serielle Verdünnungen der Proben getestet. Die d1-spezifischen Proben wurden gegen d1 und d2 getestet und die Bet v 1-spezifischen Proben

wurden auf Reaktionen gegen t3 untersucht. Bei dem verwendeten ELISA von Dr. Fooke Laboratorien werden die sIgG4-Konzentrationen in U/mL angegeben, wobei Konzentrationen bis 100 U/mL negativ, von 100 U/mL bis 250 U/mL grenzwertig und Werte > 250 U/mL positiv gewertet werden.

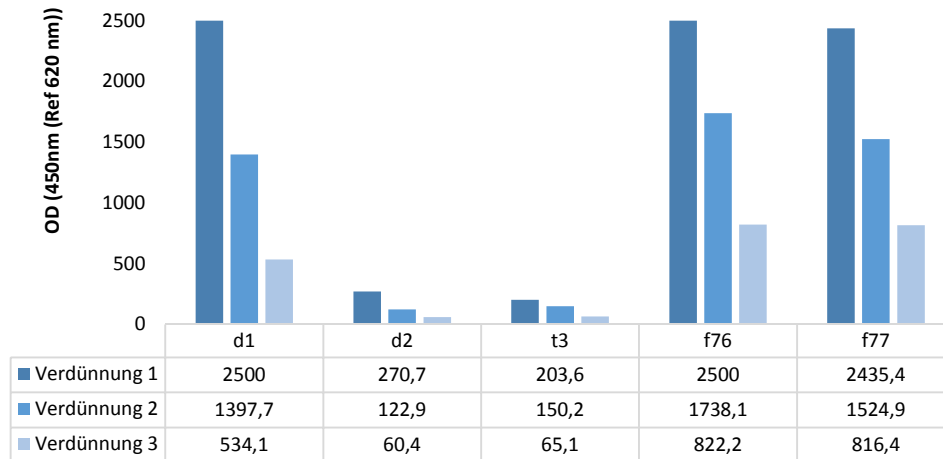


Abbildung 55: Artificielle humane IgG4-Seren wurden in einem ELISA zum Nachweis von sIgG4 gegen d1, d2, t3, f76 und f77 getestet. Es wurden die Ergebnisse serieller Verdünnungsreihen (Verdünnung 1: 1/25 Verdünnung des CD64-IgG4 Fc Konstrukt und 1/1.000 Verdünnung der allergenspezifische Kaninchen-Antikörper) in U/mL dargestellt.

Die artifiziellen humanen IgG4-Seren mit der höchsten Konzentration d1- und f76-spezifischer Kaninchen-Antikörper und CD64-IgG4 Fc Konstrukt (Verdünnung 1) lieferten Konzentrationen > 2500 U/mL im ELISA zur Bestimmung von sIgG4-Antikörpern. Ähnliche Reaktionen lieferten auch die f77-spezifischen artifiziellen Kontrollen. Die d1-spezifischen Proben wurden ebenfalls auf Reaktionen gegen d2 getestet und lieferten deutlich niedrigere Reaktion. Die artifiziellen humanen IgG4-Seren, bei denen Bet v 1-spezifische Kaninchen-Antikörper eingesetzt wurden, zeigten in Abhängigkeit der Verdünnung zwei grenzwertige und ein negatives Ergebnis zur Konzentrationsbestimmung von sIgG4-Antikörpern gegen t3. Alle Reaktionen nahmen mit zunehmender Verdünnung der Proben ab.

5.10 Mutationen der IgG1 Fc Region zur Reduktion der Affinität zu dem FcγRI Rezeptor

Der FcγRI bindet IgG1 mit ähnlich hoher Affinität wie IgG3, gefolgt von IgG4. IgG2 wird von diesem Rezeptor hingegen nicht gebunden (127). Die Interaktion zwischen den FcγRs und den zwei IgG-Fc-Ketten ist auf mehrere Rezeptor- und Antikörper-Regionen verteilt. Die relevanten Sequenzen sind in Abbildung 56 dargestellt. Die Hinge-Region der α-Kette der IgG-Antikörper

interagiert mit den Fc γ Rs über ihre C-Region, C'-Region und dem C'E-loop der D2 Domäne, während die Hinge-Region der β -Kette der IgG-Antikörper sowohl mit der D1-D2 Hinge-Region als auch mit dem BC-loop der D2 Domäne der Rezeptoren wechselwirkt. Fc-Glykosylierungen werden ausschließlich von dem hochaffinen Fc γ RI über den FG-loop in der D2 Domäne gebunden. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, unterscheidet sich in diesem Bereich die Sequenz des Fc γ RI von den übrigen Rezeptoren (55).

Die Glutaminsäure an der Position 233 (siehe Abbildung 56) liegt bei IgG1, IgG3 und IgG4 konserviert vor, während sie bei IgG2 durch Prolin ersetzt ist. Dadurch kann die Wasserstoffbrückenbindung, die zwischen dem Fc γ RI (Tyrosin, Position 133) und der Glutaminsäure bei IgG1, IgG3 und IgG4 vorliegt, nicht zwischen IgG2 und dem hoch affinen Rezeptor gebildet werden. Die fehlende Glu-233 / Tyr-133-Bindung könnte ein Indiz für die mangelnde Affinität von IgG2 zu Fc γ RI sein. Dennoch existieren weitere Sequenzunterschiede zwischen der Hinge-Region im IgG2 und den anderen IgG-Subklassen, welche jedoch in den Untersuchungen von Lu *et al.* keine Wechselwirkungen mit den Fc γ Rs zeigten (55). Aufgrund dieser Studie wurden die Positionen 233-237 (siehe Abbildung 56) mutiert, indem jede einzelne AS durch Alanin ausgetauscht wurde. Des Weiteren wurden alle fünf AS durch die Aminosäurenabfolge ersetzt, die die humane IgG2-Region in diesem Bereich aufweist, da bisher in der Literatur keine Interaktionen zwischen IgG2 und dem CD64 Rezeptor nachgewiesen werden konnten. Die mutierten Sequenzen sind in Tabelle 26 beschrieben.

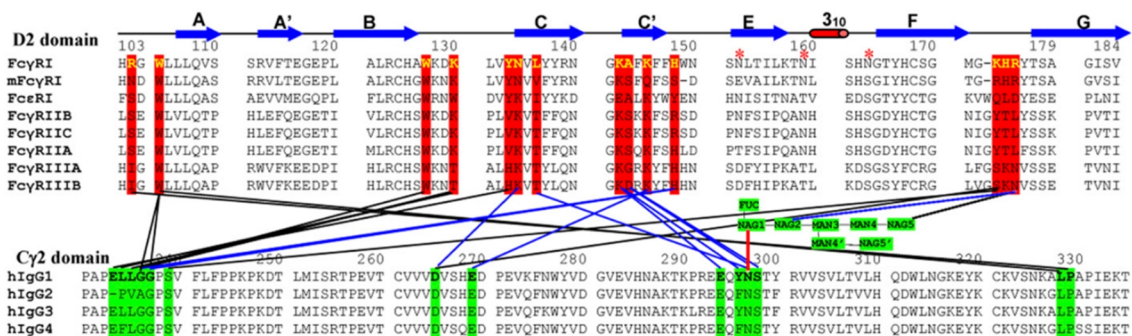


Abbildung 56: Sequenzen von Fc-Rezeptoren und IgG-Fc-Regionen, die miteinander interagieren. Interaktionen der Rezeptoren mit der α -Kette der Fc-Regionen sind in blau und mit der β -Kette in schwarz dargestellt [entnommen aus (55)].

Die Methode zur Mutation der DNA-Sequenzen ist in Kapitel 4.2.3 (Site-directed mutagenesis mit Megaprimer PCR) beschrieben. Die PCR zur Herstellung von jeweils zwei Amplifikaten mit komplementären Überhängen im zu mutierenden Bereich wurden bei einer Annealingtemperatur von 55 °C und Extensionszeit von 15 s durchgeführt. Danach wurden die gereinigten Amplifikate

mittels einer Megaprimer PCR miteinander verbunden und vervielfältigt. Zur Bindung der komplementären Überhänge wurde zuerst eine Annealingtemperatur von 55 °C eingestellt und nach der Zugabe der flankierenden Oligonukleotide eine Annealingtemperatur von 60 °C gewählt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 12 dargestellt. DNA der Plasmid-Präparationen, die mit der theoretischen DNA-Sequenz übereinstimmten, wurden zur Transfektion von HEK293-Zellen verwendet. Die Transfektionen von HEK293-Zellen mit den mutierten IgG1-Fc tragenden Vektoren wurden in Analogie zu den beschriebenen Parametern in Tabelle 44 durchgeführt.

5.10.1 Affinitätsuntersuchung der mutierten IgG1 Fc Regionen zu dem humanem FcγRI Rezeptor

Nach der Stabilisierungsphase wurden die Zellkulturüberstände von ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flaschen analysiert, indem die Bindung zu dem FcγRI Rezeptor, beschichtet in Kavitäten von Mikrotiterplatten (siehe Kapitel 5.8.1), überprüft wurde. Die mutierten IgG Fc Regionen wurden für diese Analysen nicht aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt.

Zuerst wurden die Zellkulturüberstände mit mutierten IgG1-Sequenzen transfizierter HEK293-Zellen im PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Zur Identifizierung der Bande des Zielproteins wurde zusätzlich Zellkulturüberstand nicht transfizierter HEK293-Zellen aufgetragen sowie Zellkulturüberstand transfizierter Zellen mit IgG1 Fc (Wildtyp-Sequenz). In Kapitel 5.8 wurde das IgG1 Fc Molekül bereits mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Auf der Nitrozellulosemembran war eine reaktive Bande (mit anti-IgG-HRP) bei ca. 100 kDa sichtbar.

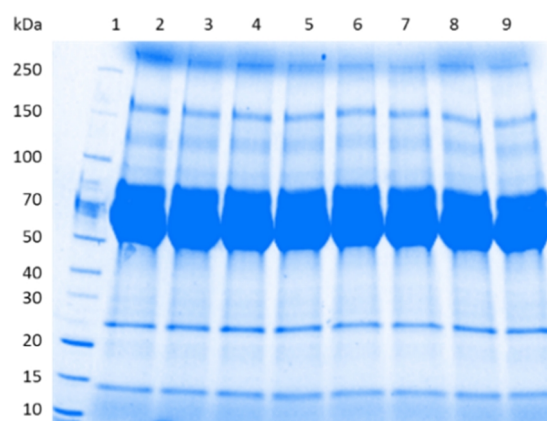


Abbildung 57: Zellkulturüberstände aus zu ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche mit HEK293-Zellen, die mit mutierten IgG1 Fc Sequenzen transfiziert wurden, aufgetragen in einem 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Es wurde von allen Proben 10 µL je Tasche aufgetragen. Spur 1: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, 5 µL, Spur 2: Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen, Spur 3: Zellkulturüberstand von IgG1 Fc transfizierten Zellen, Spur 4-9: Zellkulturüberstände der Zellen transfiziert mit mutierten IgG1 Fc Sequenzen (Mutation 1 bis Mutation 6).

Das Bandenmuster der Zellkulturüberstände transfizierter Zellen (Spur 3-9) unterschied sich visuell nicht von den Banden des Zellkulturüberstands nicht transfizierter Zellen (Spur 2). Weder bei dem Wildtyp-IgG1-Molekül noch bei den mutierten Fragmenten ist eine zusätzliche Bande des Zielproteins in den Zellkulturüberständen der transfizierten Zellen zu erkennen. Ein Western Blot, bei dem die Nitrozellulosemembran mit anti-IgG-HRP inkubiert wurde, zeigte keine reaktiven Banden (Abbildung nicht dargestellt), obgleich in Kapitel 5.8 bereits eine Reaktion mit dem Wildtyp-IgG1 Fc Molekül nachgewiesen werden konnte. Dabei handelte es sich jedoch um IMAC gereinigtes Material.

Obwohl weder anhand des Gels noch anhand des Western Blots die Zielproteine identifiziert werden konnten, wurden die mit Fc γ RI Rezeptor immobilisierten Kavitäten einer Mikrotiterplatte zur Überprüfung der Affinität der mutierten IgG1 Fc Regionen verwendet. Es konnten bereits anhand dieser Mikrotiterplatten Wildtyp-IgG1 Fc Moleküle aus dem Zellkulturüberstand gebunden werden (siehe Tabelle 66).

Tabelle 69: Analyse von Zellkulturüberständen nicht transfizierter, IgG1 Fc-transfizierter und mutierter IgG1 Fc-transfizierter HEK293-Zellen auf Fc γ RI Rezeptor beschichteten Mikrotiterplatten. Der Nachweis erfolgte mittels anti-human-IgG-HRP (1/1.000) und TMB.

Probe	Beschichtungskonzentration 8 μ g/mL
	OD 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm)
Zellkulturüberstand nicht transfizierter Zellen	0,107
Zellkulturüberstand IgG1 Fc	0,363
Zellkulturüberstand IgG1 Fc, Mutation 1	0,258
Zellkulturüberstand IgG1 Fc, Mutation 2	0,086
Zellkulturüberstand IgG1 Fc, Mutation 3	0,184
Zellkulturüberstand IgG1 Fc, Mutation 4	0,268
Zellkulturüberstand IgG1 Fc, Mutation 5	0,098
Zellkulturüberstand IgG1 Fc, Mutation 6	0,140

Die stärkste Reaktion mit den Fc γ RI Rezeptor beschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte lieferte der Zellkulturüberstand von HEK293-Zellen, die mit der Wildtyp-IgG1 Fc Sequenz transfiziert wurden. Die schwächsten Reaktionen zeigten die Zellkulturüberstände der Mutation 2, 5 und 6. Die ermittelten ODs für diese Mutationen waren ähnlich zu der OD, die mit dem Überstand nicht transfizierter Zellen erzielt wurde. Daher wurden die DNA-Sequenzen der Mutation 2, 5 und 6 zur Herstellung von CD64-IgG1 Fc Konstrukten mit entsprechenden Mutationen in der IgG1 Fc Region verwendet.

5.11 Rekombinante Herstellung und Evaluierung des humanen CD64-IgG1 Fc Moleküls

Zur Herstellung von CD64-IgG1 Fc Fragmenten wurde die DNA des Fc γ RI Rezeptors (siehe Abbildung 10) mittels PCR an die mutierte DNA der IgG1 Fc Fragmente (siehe Abbildung 11) fusioniert. Es wurden drei Konstrukte kloniert, die sich lediglich durch die Mutationen im IgG1 Fc Fragment voneinander unterschieden. Es wurden die DNA-Sequenzen der Mutationen 2, 5 und 6 verwendet (siehe Tabelle 26). Diese Mutationen wurden in vorherigen Versuchen (siehe Kapitel 5.10.1) nicht oder mit einer geringeren Affinität vom Fc γ RI Rezeptor gebunden.

Die DNA-Sequenz des Fc γ RI Rezeptors wurde mit komplementären Sequenzen zu den mutierten humanen IgG1-Sequenzen und die humanen IgG1-Sequenzen mit komplementären Sequenzen zu dem Fc γ RI Rezeptor flankiert.

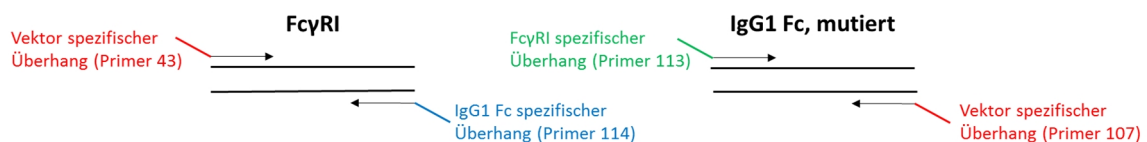


Abbildung 58: Schematische Darstellung: Flankierung des Fc γ RI Rezeptors mit komplementären Sequenzen zu der humanen IgG1-Sequenz und die humane IgG1-Sequenz mit komplementären Sequenzen zu dem Fc γ RI Rezeptor.

Die PCR zur Herstellung der Amplifikate mit komplementären Überhängen wurden bei einer Annealingtemperatur von 60 °C und Extensionszeit von 20 s durchgeführt. Es konnten für alle PCR die identischen Oligonukleotide verwendet werden (siehe Abbildung 58), da die IgG1-Fragmente nicht in der Region mutiert wurden, an der die Oligonukleotide binden. Danach wurden die gereinigten Amplifikate mittels einer Megaprimer PCR miteinander verbunden und vervielfältigt. Zur Bindung der komplementären Überhänge wurde zuerst eine Annealingtemperatur von 60 °C eingestellt und nach der Zugabe der flankierenden Oligonukleotiden eine Annealingtemperatur von 72 °C gewählt. Die PCR-Produkte wurden isoliert und dann mittels SLIC Methode in den mittels SfoI linearisierten pcDNA3.1/zeo_Signal_6xHis kloniert. One Shot[®] OmniMax[™] 2T1^R-Zellen wurden mit den SLIC Reaktionsansätzen transformiert. DNA der Plasmid-Präparationen, die mit der theoretischen DNA-Sequenz übereinstimmten, wurden zur Transfektion von HEK293-Zellen verwendet.

Die Mutation 2 und 6 der IgG1 Fc Region, die für das CD64-IgG1 Fc Konstrukt verwendet wurden, lieferten keine stabilen Transfektionen. Diese Transfektionen wurden jeweils viermal ohne Erfolg durchgeführt. Die eingesetzte Mutation 5 im CD64-IgG1 Fc Konstrukt wurde ebenfalls viermal, parallel zu den restlichen Transfektionen, verwendet. Diese Transfektionen verliefen hingegen immer erfolgreich. Daher wurde mit diesen transfizierten Zellen weiter

gearbeitet und eine Rollerflasche mit der gesamten Zellzahl einer zu ca. 90 % bewachsenen 75 cm² T-Flasche angeimpft, bevor die Proteine aus dem Zellkulturüberstand anhand des Polyhistidin-Tags mittels IMAC aufgereinigt und fraktioniert wurden. Ab sofort wird der Begriff „CD64-IgG1 M5“ für das Konstrukt, welches die Mutation 5 (siehe Tabelle 26) in der IgG1 Fc Region aufweist, verwendet.

Aufgrund der Erfahrung mit der Aufreinigung des CD64-IgG4 Fc Konstrukts wurde bei der Aufreinigung des CD64-IgG1 M5 Konstrukts ebenfalls der Waschpuffer mit 7,5 % Elutionspuffer versetzt, bevor das Zielprotein isokratisch mit 100 % Elutionspuffer eluiert wurde.

Das Chromatogramm dieser Aufreinigung von Polyhistidin-markiertem CD64-IgG1 M5 Fragment aus 500 mL Zellkulturüberstand zeigte einen deutlichen UV-Absorptionspeak (280 nm) in den Waschfraktionen 2 bis 3 und einen weiteren Peak in den Elutionsfraktionen 8 bis 14. Das Maximum des Peaks der Waschfraktion lag bei ca. 950 mAU und das Maximum des Elutionspeaks bei ca. 400 mAU. Die Fraktionen 2, 3 und 8 - 14 sowie eine Probe vor Aufreinigung und eine Probe des Durchflusses wurden im PAGE-Gel analysiert. Mittels wurde Western Blot das Bandenmuster hinsichtlich der Reaktivität mit einem anti-Polyhistidin-Tag-HRP-Antikörper analysiert.

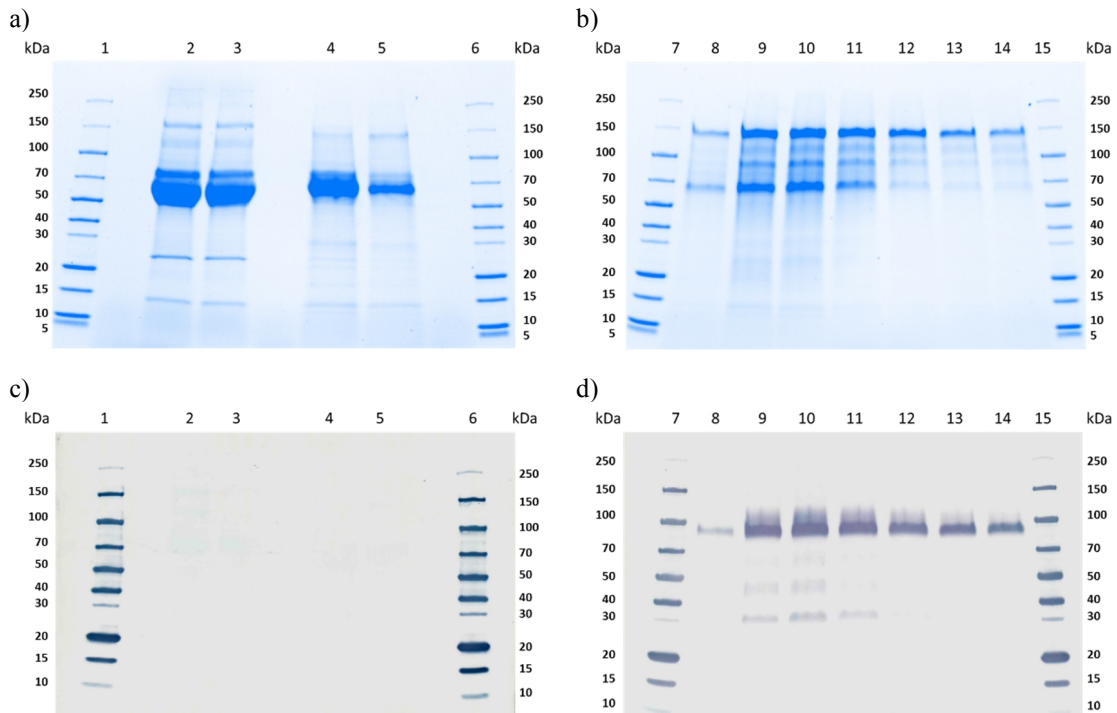


Abbildung 59: Analyse der Fraktionen der IMAC von CD64-IgG1 M5 im PAGE-Gel und Western Blot. a), b) Fraktionen 2, 3 und 8-14 sowie der Zellkulturüberstand vor Aufreinigung und der Durchfluss, aufgetragen in zwei 4 - 20 % Stain-free Gradienten PAGE-Gele unter reduzierenden Bedingungen. c), d) Western Blot der PAGE-Gele, Nachweis mit anti-Polyhistidin-Tag-HRP (1/2.000) und präzipitierendem TMB. Es wurden jeweils 5 µL Probe aufgetragen. Spur 1, 6, 7 und 15: Protein Standard: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spur 2: Zellkulturüberstand vor Aufreinigung, Spur 3: Durchfluss, Spur 4: Fraktion 2, Spur 5: Fraktion 3, Spur 8-14: Fraktion 8-14.

Ein nahezu identisches Bandenmuster im PAGE-Gel zeigten die Probe vor Aufreinigung und eine Probe des Durchflusses (siehe Abbildung 59a, Spur 2 und 3). Die Waschfraktionen 2 und 3 (Spur 4 und 5) zeigten die intensivsten Banden bei ca. 70 kDa und weitere Banden bei 150 kDa, 30 kDa und 15 kDa. Keine dieser Banden reagierte, geblottet auf eine Nitrozellulosemembran, mit dem anti-Polyhistidin-Tag-HRP-Antikörper (siehe Abbildung 59c). Die Elutionsfraktionen 8 bis 14 hingegen zeigten alle im Western Blot eine reaktive Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa (siehe Abbildung 59d). Schwache Reaktionen konnten ebenfalls bei ca. 70 kDa, 50 kDa und 30 kDa in Fraktion 9 und 10 nachgewiesen werden. Die 30 kDa Bande war auch in Fraktion 11 zu erkennen. Eine Bande bei ca. 100 kDa war zwar auch im zugehörigen PAGE-Gel (siehe Abbildung 59b) zu erkennen, jedoch handelte es sich nicht um die intensivste Bande. Die Bande bei ca. 150 kDa zeigte die stärkste Intensität, wobei diese im Western Blot nicht mit dem anti-Polyhistidin-Tag-HRP-Antikörper reagierte.

Es wurden die Fraktionen 9 bis 14 gepoolt und dialysiert, bevor sie dann hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Kaninchen-IgG zu binden, analysiert wurden (siehe Kapitel 5.11.1).

5.11.1 Initiale Versuche zur Kopplung von Kaninchen-IgG mit CD64-IgG1 M5

Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, bindet der humane Fc γ RI Rezeptor (CD64) Kaninchen-IgG-Antikörper mit hoher Affinität. Bei dem Einsatz des Adapter-Moleküls (CD64-IgG1 M5) sollte der CD64 Rezeptor als Linker zwischen den Kaninchen-IgG-Antikörpern und der mutierten, konstanten Region der humanen IgG1-Subklasse fungieren.

Mittels Dot Blot wurde geprüft, ob das CD64-IgG1 M5 Molekül einerseits Kaninchen-IgG-Antikörper bindet und andererseits von einem anti-human-IgG-HRP detektiert werden konnte.

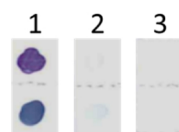


Abbildung 60: Analyse der Bindung zwischen Kaninchen-IgG-Antikörper, CD64-IgG1 M5 und anti-human-IgG-HRP im Dot Blot. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Kaninchen-IgG (je 0,1 μ g) in Doppelbestimmung bespottet, mit CD64-IgG1 M5 (Streifen 1: 1/100, Streifen 2: 1/1.000), anti-human-IgG-HRP (1/5.000) und präzipitierendem TMB inkubiert (Streifen 3: Konjugatkontrolle).

Auf jedem Streifen befanden sich zwei Kaninchen-IgG-Spots (je 0,1 μ g), die nach der Inkubation mit dem CD64-IgG1 M5 Moleküls und der nachfolgenden Detektion mit anti-human-IgG-HRP eindeutige Reaktionen, in Abhängigkeit der Verdünnung des Adapter-Moleküls, zeigten. Keine

Reaktionen der Kaninchen-IgG-Spots mit dem anti-human-IgG-HRP wurden nachgewiesen (Streifen 3).

Daraufhin wurde das CD64-IgG1 M5 Konstrukt, in Kombination mit allergenspezifischen Kaninchen-Antikörpern, in einem ELISA zur Bestimmung von sIgG überprüft. Das Konstrukt sollte zwar für die Entwicklung artifizieller humaner Seren für die Autoimmundiagnostik verwendet werden, wurde aber zuerst mit d1-spezifischen Kaninchen-Antikörpern ausgetestet, da die Reaktivität artifizieller humaner IgE- und IgG4-Seren, unter Verwendung dieser Antikörper bereits bestätigt wurde.

Es wurden zwei Verdünnungen der Kaninchen-Antikörper mit jeweils zwei Verdünnungen des gereinigten CD64-IgG1 M5 getestet. Beide Komponenten wurden in PBS mit 5 % (w/v) BSA verdünnt. Anstatt humanes Serum oder Plasma wurden zuerst die verdünnten d1-spezifischen Kaninchen-Antikörper in d1-immobilisierten Kavitäten inkubiert, nicht gebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und dann das verdünnte CD64-IgG1 M5 Konstrukt inkubiert. Danach wurde der ELISA gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

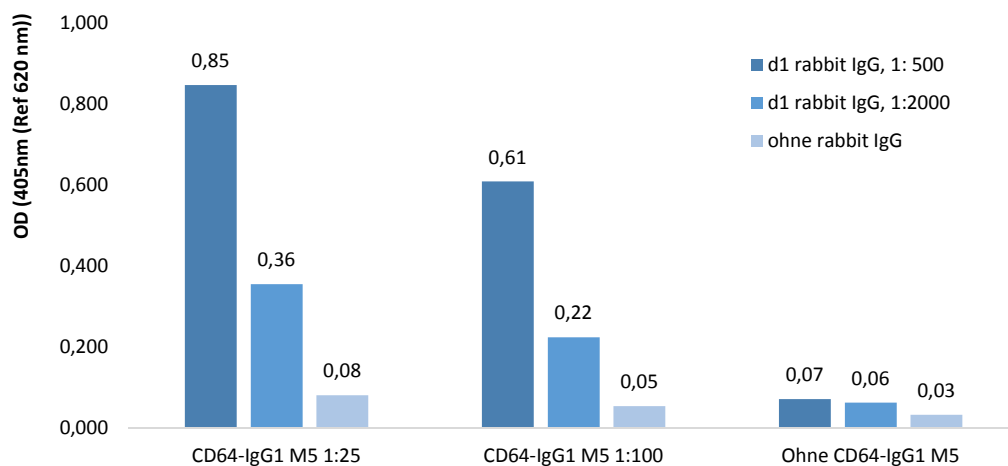


Abbildung 61: Analyse von d1-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern in Kombination mit aufgereinigtem CD64-IgG1 M5 Molekül im ELISA zur Bestimmung von sIgG. Es wurden zwei Verdünnungen der Kaninchen-Antikörper in d1-immobilisierten Kavitäten vorinkubiert und mit jeweils zwei Verdünnungen CD64-IgG4 Fc inkubiert. Zudem wurden die Kaninchen-Antikörper ohne Zugabe des Konstrukts inkubiert und das Konstrukt ohne Zugabe der Kaninchen-Antikörper (Konjugatkontrolle).

Bei dem Einsatz der höchsten Konzentration der d1-spezifischen Kaninchen-Antikörper und der höchsten Konzentration des CD64-IgG1 M5 Konstrukts wurde die stärkste Reaktion erzielt (0,85 OD). Die restlichen Kombinationen aus Kaninchen-Antikörper und dem CD64-IgG1 M5 Konstrukt lieferten ODs zwischen 0,22 und 0,61. Die Inkubation der Kaninchen-Antikörper ohne Zugabe des Konstrukts lieferten Werte < 0,07 OD, sodass eine Reaktion der Kaninchen-IgG-Antikörper mit dem verwendeten anti-IgG-AP-Konjugat auszuschließen war. Die Inkubation des

Konstrukts ohne vorherige Inkubation der Kaninchen-Antikörper in den Kavitäten zeigte ebenfalls ODs $< 0,08$, sodass auch eine unspezifische Bindung des Konstrukts mit den d1-immobilisierten Kavitäten zu vernachlässigen war. Daher wurde dieses Konstrukt zur Herstellung artifizieller humaner Seren zur Verwendung in der *in vitro*-Allergiediagnostik zum Nachweis von sIgG4 verwendet.

Da die Bindung des Konstrukts an Kaninchen-IgG-Antikörper und die Bindung des anti-human IgG-Konjugats an das Konstrukt gezeigt werden konnte, wurde dieses Konstrukt im nächsten Schritt zur Herstellung dsDNA-spezifischer, artifizieller humaner Seren verwendet.

5.11.2 Herstellung und Evaluierung dsDNA-spezifischer, artifizieller humaner Seren

Es sollte ein Kontrollserum, exemplarisch für den Autoimmunparameter „anti-dsDNA“, synthetisch hergestellt werden. Zur Immunisierung von zwei Kaninchen wurde ein kommerziell erhältliches, bakterielles dsDNA-Plasmid ohne weitere Prozessierung eingesetzt (siehe Tabelle 4). Dieses dsDNA-Plasmid diente als Antigen zur Diagnostik von anti-dsDNA-Antikörper, die als spezifische Marker für die Autoimmunerkrankung SLE gelten (128).

28 Tage nach der Immunisierung wurde durch Biogenes je 20 mL Serum von beiden Kaninchen gewonnen und der Titer gegen dsDNA, beschichtet auf Mikrotiterplatten, bestimmt. Biogenes konnte einen Titer von 1/15.000 für das Antiserum 26444 und 1/8.000 für das Antiserum 26445 bestimmen. Nach zwei weiteren Boosterungen mit dsDNA wurde von Biogenes 56 Tage nach Beginn der Immunisierung das gesamte Serum der Tiere gewonnen und die Gesamt-IgG-Fraktion aufgereinigt. Die Seren sowie die Gesamt-IgG-Fractionen wurden daraufhin in einem kommerziellen ELISA zur semi-quantitativen Detektion von anti-dsDNA-Antikörpern (Dr. Fooke Laboratorien, Ref 25005) analysiert. Es wurde das in dem Kit enthaltene Konjugat (anti-human-IgG-HRP) durch anti-rabbit-IgG-HRP (1/5.000) ersetzt.

Die gewonnenen Seren nach der Immunisierung mit dsDNA sowie die IgG-gereinigten Proben lieferten höhere ODs, als die Präimmunseren bei identischer Verdünnung. Die Seren, die 56 Tage nach der ersten Immunisierung gewonnen wurden, zeigten höhere Werte, als die Seren, die bereits nach 28 Tagen gewonnen wurden. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Seren, gewonnen nach 56 Tagen, und den daraus gereinigten Kaninchen-IgG-Antikörpern zu erkennen.

Tabelle 70: Charakterisierung der dsDNA-spezifischen Antikörper aus Kaninchenserum und IgG gereinigtem Material im ELISA. Der Nachweis erfolgte mittels anti-rabbit-IgG-HRP (1/5.000) und TMB.

Probe (Verdünnung der Proben:1/100)	OD 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm)
Präimmunserum 26444	0,185
26444-28	0,241
26444-56	0,680
26444-56, Gesamt-IgG-Fraktion	0,689
Präimmunserum 26445	0,265
26445-28	0,352
26445-56	0,608
26445-56, Gesamt-IgG-Fraktion	0,583
Konjugatkontrolle (keine Probeninkubation)	0,013

Das CD64-IgG1 M5 Konstrukt wurde in Kombination mit den IgG-gereinigten sowie nicht gereinigten Kaninchenserum in einem ELISA zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen dsDNA überprüft. Es wurden die verdünnten Kaninchen-Proben mit jeweils drei Verdünnungen des CD64-IgG1 M5 Moleküls getestet. Beide Komponenten wurden in PBS mit 5 % (w/v) BSA verdünnt. Es wurden zuerst die verdünnten Kaninchen-Proben (1/100) in dsDNA-immobilisierten Kavitäten inkubiert, nicht gebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und dann das verdünnte CD64-IgG1 M5 Konstrukt inkubiert. Danach wurde der ELISA gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

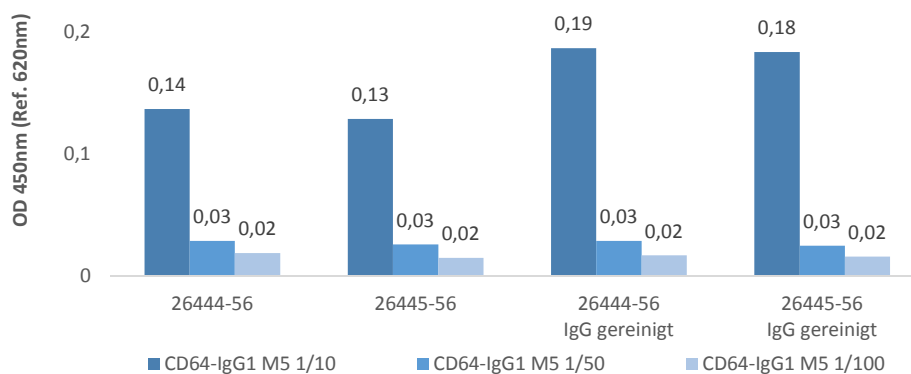


Abbildung 62: Analyse von dsDNA-spezifischen, IgG-gereinigten und nicht-gereinigten Kaninchenserum in Kombination mit dem CD64-IgG1 M5 Molekül im ELISA zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen dsDNA. Die Kaninchenproben wurden 1/100 verdünnt, in dsDNA-immobilisierten Kavitäten vorinkubiert und mit jeweils drei Verdünnungen des CD64-IgG1 M5 Moleküls inkubiert.

Die höchsten Werte wurden bei dem Einsatz der IgG-gereinigten Kaninchenproben in Kombination mit der niedrigsten Verdünnung des CD64-IgG1 M5 Konstrukts erzielt (0,19 OD und 0,18 OD). Bei dieser CD64-IgG1 M5 Verdünnung lagen die Ergebnisse der nicht IgG-gereinigten Kaninchenserum bei 0,14 OD und 0,13 OD. Mit steigender Verdünnung des CD64-IgG1 M5

Konstrukts nahmen die gemessenen Werte ab. Der Einsatz stärker konzentrierter Kaninchenproben (1/50 und 1/10) führte zu keiner signifikanten Steigerung der Werte. Die weiteren Immunisierungen in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Allergenen lieferten Reaktionen bei deutlich stärkeren Verdünnungen (siehe Kapitel 5.2.9). Daher wurde vermutet, dass die geringe Reaktivität auf die dsDNA-spezifischen Kaninchenproben zurückzuführen war. Die Funktionalität des CD64-IgG1 M5 Konstrukts konnte prinzipiell bereits in Kombination mit d1-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern bestätigt werden (siehe Abbildung 61). Daher wurde ein kommerziell-erhältlicher anti-dsDNA-Antikörper aus der Maus (IgG2a) eingesetzt. Die Bindung zwischen Maus-IgG2a und CD64 wurde bereits in Abbildung 42 bestätigt.

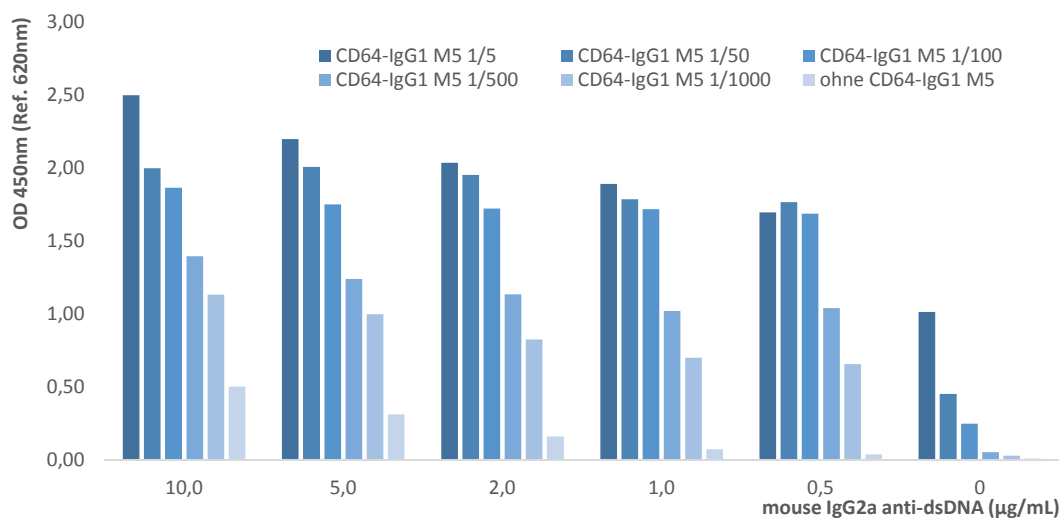


Abbildung 63: Analyse von einem monoklonalen dsDNA-spezifischen IgG2a-Antikörper aus der Maus in Kombination mit dem CD64-IgG1 M5 Molekül im ELISA zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen dsDNA. Es wurden fünf Verdünnungen des anti-dsDNA-Antikörpers in dsDNA-immobilisierten Kavitäten vorinkubiert und mit jeweils fünf Verdünnungen CD64-IgG1 M5 inkubiert. Zudem wurden der anti-dsDNA-Antikörper ohne Zugabe des Konstrukts inkubiert und das Konstrukt ohne Zugabe des anti-dsDNA-Antikörpers (Konjugatkontrolle).

Alle getesteten dsDNA-spezifischen Antikörper-Verdünnungen zeigten in Kombination mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktion gegen dsDNA. Bei konstanter CD64-IgG1 M5 Verdünnung nahmen die Reaktionen mit steigender Verdünnung der spezifischen Antikörper ab. Ebenfalls nahmen die Reaktionen bei konstanter Antikörper-Konzentration und steigender Verdünnung des Adapter-Moleküls ab. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass grundsätzlich artifizielle Kontrollen, bestehend aus dem CD64-IgG1 M5 Konstrukt und dem eingesetzten anti-dsDNA-Antikörper, hergestellt werden können. Zudem implizieren die Ergebnisse, dass ebenfalls Maus-IgG2a-Antikörper mit anderer Spezifität in Kombination mit dem Konstrukt eingesetzt werden können. Dadurch könnten beispielsweise artifizielle Kontrollen für Proteinase 3 oder Myeloperoxidase, unter Verwendung von spezifischen, monoklonalen Maus-IgG2a-Antikörper, vergleichbar zügig hergestellt werden.

6 Diskussion

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Evaluierung von artifiziellen humanen Seren für eine diagnostische Standardisierung. Die hergestellten artifiziellen IgE-, IgG4- und IgG1-Kontrollen bestehen jeweils aus einem Fc-spezifischen Konstrukt und antigenspezifischen, tierischen Antikörpern. Die Spezifität der, durch Immunisierung gewonnenen, spezifischen Antikörper wird im Zusammenhang mit den Antigenstrukturen diskutiert. Des Weiteren werden die Komponenten der Konstrukte, die Fc-Regionen und die Rezeptoren als Antikörper-bindende Strukturen, ausführlich analysiert. Schließlich wird die Eignung der hergestellten artifiziellen Seren als Instrument zur Standardisierung von *in vitro*-Diagnostik-Testsystemen betrachtet.

6.1 Analyse der Antigenstrukturen zur Erzeugung spezifischer, tierischer Antikörper

Zur Herstellung polyklonaler, allergenspezifischer Antikörper wurden rekombinant hergestellte und nativ gereinigte Allergene sowie Allergenextrakte eingesetzt. Die nativ gereinigten Kuhmilchallergene α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin und Casein, rekombinantes Bet v 1 als Haupt-Allergen der Birke und ein Penicilloyl G-LPH-Konjugat als immunogene Form des Penicillins wurden zur Immunisierung verwendet. Außerdem wurden spezifische Antikörper gegen folgende Allergenextrakte hergestellt: Haselnussextrakt (*Corylus avellana*), Hausstaubmilbenextrakt (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Schimmelpilzextrakt (*Aspergillus fumigatus*) und Latexextrakt (*Hevea brasiliensis*). Dazu wurde die Proteinzusammensetzung der Extrakte, vor Beginn der Immunisierung, mittels SDS-PAGE analysiert. Im Folgenden werden die ermittelten Reaktionen der resultierenden Antikörper in Verbindung mit den Antigenstrukturen analysiert. Die Reaktivität der polyklonalen Kaninchen-IgG-Antikörper gegen die Kuhmilch-Proteine fiel unterschiedlich aus. Trotz des identischen Immunisierungsprotokolls lieferten die IgG-Fractionen der mit α -Laktalbumin immunisierten Kaninchen Titer von 1/5.000 und 1/10.000, während die β -Laktoglobulin-spezifischen, IgG-gereinigten Fractionen bis zu einer Verdünnung von 1/40.000 deutliche Reaktionen gegen das Allergen zeigten. Das α -Laktalbumin der Kuhmilch ist mit 14,2 kDa kleiner, als das β -Laktoglobulin mit 18,3 kDa. Allgemein gilt die Regel, dass Proteine mit einem größeren MG immunogener sind. Jedoch ist diese Regel für Proteine im Bereich von 1 kDa bis 6 kDa zutreffend, da Proteine ab 6 kDa hinsichtlich ihres MGs generell als immunogen bezeichnet werden. Betrachtet man die Fremdartigkeit der Proteine im Bezug zum Protein-Repertoire eines Kaninchens, gibt es keinen Unterschied, da beide Proteine aus der Kuhmilch

stammen. Zudem sind Kaninchen reine Pflanzenfresser und sollten daher mit diesen Proteinen vor der Immunisierung nicht in Kontakt gekommen sein. Im Allgemeinen geht eine erhöhte strukturelle Komplexität einer Komponente mit einer höheren Immunogenität einher (129). Während die Polypeptidkette von α -Laktalbumin überwiegend aus α -Helices besteht, weist die β -Laktoglobulin Struktur größtenteils β -Faltblätter auf, wodurch diese Struktur als komplexer bezeichnet werden kann. Andererseits verfügt α -Laktalbumin im Gegensatz zu β -Laktoglobulin über eine Glykosylierungen sowie eine zusätzliche Disulfidbrücke (vier anstatt drei Disulfidbrücken). Trotz unterschiedlichen Titern, waren die Reaktivitäten der α -Laktalbumin- und β -Laktoglobulin-spezifischen Seren ausreichend zur weiteren Verwendung als Komponente artifizieller humaner Seren.

Die Kuhmilch enthält vier Casein-Subklassen (siehe Tabelle 36), die alle, im Gegensatz zu den bereits genannten Kuhmilch-Proteinen, ein höheres MG (21,2 kDa- 25,0 kDa) und eine größere strukturelle Komplexität aufweisen. Sie weisen mehreren Polypeptidketten, Glykosylierungen und Disulfidbrücken auf. Die vier Subklassen wurden als Casein-Gemisch, entsprechend dem Mengenverhältnis in der Kuhmilch, zur Immunisierung von zwei Kaninchen und einem Huhn verwendet. Die IgG-Fractionen, gereinigt aus den Antiseren zweier Kaninchen, zeigten bis zu einer Verdünnung von 1/20.000 deutliche Reaktionen gegen das Casein-Gemisch, gegen die α -Caseine und κ -Casein. Die Reaktivität beider IgG-gereinigten Antiseren gegen β -Casein fiel hingegen, ermittelt im Dot Blot, deutlich geringer aus. Eine der Proben zeigte lediglich eine Reaktion bis zu einer 1/5.000 Verdünnung. Die ersten Proben nach der initialen Immunisierung des Huhns zeigten zwar keine Reaktionen gegen α -Casein, dies änderte sich jedoch im Laufe des Immunisierungsprotokolls. Zum Ende der Immunisierung (vier Wochen nach der letzten Boosterung) reagierten die IgY-gereinigten Antikörper mit allen Casein-Subklassen sowie mit dem Casein-Gemisch bis zu einer Verdünnung von 1/500. Die Ausbeute an IgY-Antikörper während einer Immunisierung ist in der Literatur, bedingt durch die kontinuierliche Sekretion der Antikörper in das Hühnerei, als ertragreicher beschrieben im Vergleich zu der Ausbeute an Kaninchen-IgG-Antikörpern (130). Diese Aussage kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da von den Hühnerproben insgesamt 8,0 mL mit einem durchschnittlichen Titer von 1/500 gewonnen werden konnten, während von einer Kaninchenprobe 33,0 mL mit einem Titer von 1/20.000 zur Verfügung standen (siehe Tabelle 38). Die unterschiedlichen, spezies-abhängigen Titer könnten mehrere Gründe haben. Das Immunisierungsprotokoll der Kaninchen könnte effektiver, als das der Hühner gewesen sein. Details der Protokolle, sowie Wahl des Adjuvants als auch Konzentration, Volumen und Ort der Injektionen sind für beide Spezies nicht bekannt (130, 131). Das Casein-Gemisch könnte auf Kaninchen im Generellen immunogener wirken, als auf Hühner. Oder die Wahl der Tiere im Speziellen spielte eine Rolle, was schwer zu

ermitteln ist, da nur ein Huhn mit dem Casein-Gemisch immunisiert wurde. Des Weiteren könnten die für den Dot Blot verwendeten Sekundärantikörper die Titerbestimmung verfälschen. Die HRP-markierten Anti-chicken-IgY- und Anti-rabbit-IgG-Antikörper wurden zwar gemäß Herstellerangaben identisch verdünnt (1/5.000), was jedoch keine identische Performance garantiert. Die Hersteller geben weder Affinitäten der Konjugate zu den Antikörpern an, noch ist die Anzahl an HRP-Molekülen pro Molekül Antikörper bekannt. Eine zu konzentrierte Konjugat-lösung kann ausgeschlossen werden, da keine unspezifischen Reaktionen mit den Allergenspots zu detektieren waren. Eine zu gering konzentrierte Anti-chicken-IgY-Lösung wäre denkbar, wobei der Dot Blot in Abbildung 21 dagegen spricht, da der Einsatz der doppelten Allergen-Menge auch, rein visuell betrachtet, Spots mit einer nahezu doppelten Intensität lieferte.

Auch die Analyse der Proben von Bet v 1-immunisierten Kaninchen und eines Huhns zeigte, dass die IgG-gereinigten Antiseren der Kaninchen eine höhere Reaktivität gegenüber dem Allergen der Immunisierung aufwiesen. Bis zu einer Verdünnung von 1/400.000 der Kaninchenproben konnten eindeutige Reaktionen im Dot Blot nachgewiesen werden. Die Reaktion der Hühnerprobe fiel um ein 40-faches geringer aus, wobei auch die Präimmunprobe dieses Tieres eindeutig mit dem Hauptallergen der Birke reagierte. Während des gesamten Immunisierungsprozesses konnte die Reaktivität nur gering gesteigert werden. Anscheinend lagen bereits vor der Immunisierung IgY-Antikörper gegen Bet v 1 vor. Eine unspezifische Reaktion des Konjugats kann aufgrund der negativen Konjugatkontrolle ausgeschlossen werden. Bet v 1-homologe Proteine kommen gehäuft in pflanzlichen Nahrungsmitteln vor (132), sodass vor der Immunisierung IgY-Antikörper gegen homologe Strukturen hätten vorliegen können. Ob der Hersteller die Präimmunproben auf Reaktionen gegen das Allergen getestet hat, bevor mit der Immunisierung begonnen wurde, ist nicht bekannt.

Weiterhin bekräftigen die Ergebnisse der Immunisierungen mit Penicilloyl G, dass die Kaninchen-Immunisierungen eine höhere Ausbeute allergenspezifischer Antikörper in dieser Arbeit hervorbrachten, als die Hühner-Immunisierungen. Penicilloyl G wurde an LPH gekoppelt, um einen Hapten-Protein-Komplex zu bilden, der immunogen ist (80). Die Kaninchenproben lieferten Titer gegen eine Penicilloyl G-HSA-Konjugation von 1/5.000 und 1/10.000, während eindeutige Reaktionen der Hühnerprobe nur bis zu einer Verdünnung von 1/250 nachgewiesen werden konnten. Die unterschiedliche Reaktivität der Proben könnte in diesem Fall auf die Wahl des Carrier-Proteins zurückzuführen sein. Unter Umständen ist der Einsatz von LPH für Kaninchen besser geeignet, als für Hühner, wobei darüber keine Literatur existiert. Stattdessen sind in der Literatur neben LPH andere Hemocyanine wie z.B. *Keyhole limpet* Hemocyanin (KLH) (133) oder *Tachypleus tridentatus* Hemocyanin (TTH) (134) als Carrier-Proteine beschrieben, die theoretisch die Immunreaktion gegen das Hapten positiv beeinflussen können.

Für die *in vitro* Testung von humanem sIgE gegen Penicilloyl G wird in der Regel HSA als Carrier-Protein verwendet, da das Vorkommen von humanen Antikörpern gegen dieses Protein unwahrscheinlich ist (82). Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen Penicilloyl G in den Kaninchen- und Hühnerproben wurde ebenfalls eine Penicilloyl G-HSA-Konjugation verwendet, wodurch eine stärkere Reaktion der Kaninchenproben mit dem Vorkommen HSA-spezifischer Kaninchen-Antikörper in den Proben verbunden sein könnte. Kaninchen können durchaus Antikörper gegen HSA produzieren, da HSA für Kaninchen ein fremdartiges Protein darstellt (135). Jedoch sollten die eingesetzten Tiere zuvor nicht mit einem humanen Protein wie HSA in Kontakt gekommen sein, sodass das Vorliegen HSA-spezifischer Antikörper in allen Tierproben auszuschließen ist.

Die Ausbeuten allergenspezifischer Antikörper bei den betrachteten Kaninchen-Immunsierungen sind deutlich höher, als bei den Hühner-Immunsierungen (siehe Abbildung 31), obgleich mittels Student's t-test keine statistische Signifikanz belegt werden konnte (*p-Value*: 0,37). Als allgemeiner Grenzwert für die Signifikanz gilt ein Wahrscheinlichkeitswert (*p-Value*) von unter 0,05 als signifikant. Der hier ermittelte *p-Value* ist jedoch, aufgrund zu geringer Stichprobenzahl, nicht aussagekräftig (136). Dennoch wurden für die Herstellung polyklonaler, allergenspezifischer Antikörper gegen Allergenextrakte lediglich Kaninchen eingesetzt, da die Ausbeuten aus dieser Spezies bei den drei geschilderten Immunsierungen eindeutig dominierten.

Sussman *et al.* beschrieben 2002 13 Proteine aus *Hevea brasiliensis* und teilten sie in Haupt- und Nebenallergene ein, soweit diese Angaben in der „WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database“ zu diesem Zeitpunkt vorhanden waren (137, 138). Vier verschiedene Chargen Latexextrakt zeigten im PAGE-Gel, sowohl visualisiert mit Coomassie Blau-Färbung als auch mit einer Silberfärbung, jeweils nur eine Bande mit einem MG von ca. 15 kDa. Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6.03 und Hev b 8 weisen MGs in diesem Größenbereich auf. Keine weiteren Analysen wurden zur Identifizierung der Proteinbande durchgeführt, da diese Extrakte, aufgrund fehlender Proteine, eindeutig nicht für eine Immunsierung in Frage kamen. Stattdessen wurden Kaninchen mit einem Gemisch rekombinant hergestellter Proteine (Hev b 5, Hev b 6.02, Hev b 7 und Hev b 8) immunisiert. Die stärksten Reaktionen der Antiseren konnten gegen Hev b 6.02 detektiert werden, wobei auch die Präimmunsere schwache Reaktionen gegen dieses Protein zeigten. Eine Studie zur Quantifizierung der Allergene in Latexextrakten zeigte, dass Hev b 6 mit Abstand das am stärksten konzentrierte Allergen im Latexextrakt ist. Yeang *et al.* konnten jedoch nicht zwischen drei Hev b 6 Varianten unterscheiden (139). Hev b 6.01 besteht aus den zwei Fragmenten: Hev b 6.02 (N-terminale Sequenz) und Hev b 6.03 (C-terminale Sequenz) (137). Eine Immunsierung mit der N-terminalen Sequenz konnte daher keine Antikörperproduktion gegen die C-terminale Sequenz induzieren. Aufgrund der schwachen Reaktion eines Antiserums gegen den

Latexextrakt, könnte es sich bei der Proteinbande im Gel entweder um Hev b 5 oder Hev b 8 handeln, da diese Proteine zur Immunisierung verwendet wurden. Andererseits besteht doch die Möglichkeit, dass es sich um Hev b 6.03 handelt, wobei Hev b 6.02 lediglich nicht im Gel sichtbar war, da es kleiner als 10 kDa ist und somit bereits aus dem Gel heraus gelaufen sein könnte. Hev b 6.01 wäre, falls im Extrakt vorhanden, sowieso nicht im PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen sichtbar, da die N- und C-terminale Polypeptidkette über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (140). Im späteren Verlauf dieser Arbeit wird auf die Identifizierung der Proteine im Latexextrakt detaillierter eingegangen.

Die Proteinzusammensetzung zweier Haselnussextrakte zeigte, analysiert mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung, ein nahezu identisches Proteinmuster. Bei der Bande knapp unter 20 kDa könnte es sich um vier verschiedene Proteine handeln, die alle ein ähnliches MG besitzen. Darunter fällt das *Pathogenesis-related Protein* (Cor a 1), welches von Flinterman *et al.* als Hauptallergen der Haselnuss bezeichnet wurde. Die theoretischen Massen der Nebenallergene 2S Albumin (Cor a 14) und zwei Oleosine (Cor a 12 und Cor a 13) liegen ebenfalls in diesem Bereich (141). Zudem zeigten die Extrakte zwischen 20 kDa und 25 kDa und zwischen 25 kDa und 37 kDa Banden, die in der Literatur nicht beschrieben sind. Die Bande knapp unter 50 kDa macht das Vorhandensein des *7S seed storage globulin* (Cor a 11) wahrscheinlich (142). Die Bande bei ca. 15 kDa entspricht wahrscheinlich dem Hauptallergen Profilin (Cor a 2) und die ungefähr 10 kDa große Bande weist auf das *Non-specific lipid transfer protein 1* (Cor a 8) hin (141). Die IgG-gereinigten Antiseren zweier Kaninchen, immunisiert mit einem Haselnussextrakt, lieferten sowohl Reaktionen gegen den Extrakt als auch Reaktionen gegen zwei von vier verfügbaren rekombinanten Allergenen der Haselnuss (siehe Abbildung 26). Die Reaktionen gegen Cor a 1 und Cor a 11 fielen schwächer aus, als die Reaktionen gegen den gesamten Extrakt. Die Reaktion gegen Cor a 9 kann nicht beurteilt werden, da das verwendete Konjugat unspezifisch mit dem Allergen reagierte. Nur bei einem Antiserum und nur bei der niedrigsten Verdünnung dieses Serums konnten Antikörperreaktionen gegen Cor a 8 nachgewiesen werden, obwohl das PAGE-Gel eine Bande der entsprechenden Größe zeigte. Da Cor a 8 aber das kleinste, bekannte Allergen in der Haselnuss ist, könnte es aufgrund der Größe weniger immunogen sein im Vergleich zu den restlichen Proteinen der Haselnuss. Die Immunisierung mit dem Haselnussextrakt, bestehend aus mehreren Proteinen, führte folglich zu Antiseren mit unterschiedlichen Reaktivitäten gegen die einzelnen Proteine.

Dermatophagoides pteronyssinus-Extrakte zeigten im PAGE-Gel schwache und größtenteils unscharfe Banden über den gesamten Größenbereich (siehe Abbildung 17). Die einzige Proteinbande, die eindeutig zuweisbar ist, befindet sich knapp oberhalb von 150 kDa und weist auf das Allergen Apolipoprotein (Der p 14, 177 kDa) hin. Die beiden Hauptallergene Der p 1 (*cysteine*

protease) und Der p 2 (*Niemann Pick C2 homologue family*) mit MGs von 25 kDa und 14 kDa (143) sind im PAGE-Gel lediglich zu erahnen. Da in der Literatur ein derart unscharfes Bandenmuster als charakteristisch für Hausstaubmilbenextrakt beschrieben wird (144, 145), wurde einer dieser Extrakte zur Immunisierung verwendet. Die resultierenden Kaninchenserum zeigten Reaktionen gegen den für die Immunisierung verwendeten Extrakt bis zu einer Verdünnung von 1/10.000 und 1/20.000.

Die im PAGE-Gel analysierten Schimmelpilzextrakte zeigten zwischen ca. 10 kDa und 100 kDa ebenfalls größtenteils unscharfe Banden, die visuell kaum voneinander zu trennen waren (siehe Abbildung 17). 23 Allergene von *Aspergillus fumigatus* (m3) sind bereits bekannt (146). Auf die Zuordnung dieser Allergene zu den Banden im PAGE-Gel, wurde verzichtet, da polyklonale, m3-spezifische Antikörper generiert werden sollten, unabhängig von der Zusammensetzung des Extrakts. Zudem wäre eine Immunisierung mit rekombinanten oder nativ gereinigten Allergenen anstelle einer Immunisierung mit dem gesamten Extrakt nicht in Frage gekommen, da die meisten Allergene von *Aspergillus fumigatus* nicht kommerziell erhältlich sind. Letztendlich wurde eine Charge des Schimmelpilzextraktes zur Immunisierung verwendet, die bei 50 kDa eine zusätzliche Bande im Gegensatz zu anderen Chargen zeigte. Die Höhe dieser Proteinbande im PAGE-Gel korreliert mit dem MG von Asp f 22. In der Literatur ist eine 30 %-ige Prävalenz für diese Enolase, bezogen auf IgE-vermittelte Reaktionen, beschrieben (146). Die erzeugten IgG-gereinigten Kaninchen-Seren zeigten eindeutige Reaktionen bis zu Verdünnungen von 1/25.000 und 1/50.000 gegen den Schimmelpilzextrakt, sodass eine erfolgreiche Immunisierung festgehalten werden kann.

Insgesamt verliefen alle Kaninchen-Immunisierungen insofern erfolgreich, als immer eindeutige Reaktionen gegen das Allergen oder Allergen-Gemisch, mit dem immunisiert wurde, nachgewiesen werden konnten. Der Titer der Antiseren, ermittelt im Dot Blot, variierte dabei von 1/5.000 bis 1/2.000.000 (siehe Tabelle 38). Kein Zusammenhang konnte zwischen den ermittelten Titern und den Gesamt-IgG-Konzentrationen von den 17 IgG-gereinigten Antiseren ermittelt werden, sodass womöglich auch die allergenspezifischen Antikörperkonzentrationen nicht mit den Gesamt-IgG-Konzentrationen korrelierten. Diese Fragestellung wird im weiteren Verlauf der Arbeit detaillierter diskutiert. Da auch keine Korrelation zwischen den ermittelten Titern und der Dauer der Immunisierung nachgewiesen werden konnte, war der Erfolg der Immunisierung lediglich abhängig von der Immunogenität der eingesetzten Proteine. Die Parameter zur Abschätzung der Immunogenität eines Moleküls sind, wie bereits beschrieben, das MG, die Fremdartigkeit im Bezug zum Protein-Repertoire des Empfänger-Organismus und die chemische Komplexität der Komponente (129).

6.2 CD64-IgE Fc Konstrukt: Fusionsprotein aus Fc γ RI und IgE Fc Domäne

Das in dieser Arbeit beschriebene Adapter-Molekül CD64-IgE Fc stellte eine mögliche Variante zur Herstellung artifizieller humaner IgE-Seren dar. Darüber hinaus waren Kombinationen aus dem IgE Fc Molekül und anderen Bindungsmodulen denkbar. Das Bindungsmodul entscheidet dabei über die Spezies und Subklasse der eingesetzten antigenspezifischen Antikörper.

Tabelle 71: Mögliche Kombinationen zur Herstellung eines Konstrukts als Komponente artifizieller humaner IgE-Seren.

Spezifische Antikörper	Bindungsmodul	Kopplung von Bindungsmodul und IgE Fc Region
Leporide-IgG	CD64	Rekombinante Fusion
	Anti-rabbit-IgG	Chemische Kopplung oder Biotin/Streptavidin
	Protein A/G	
Aviane-IgY	CHIR	Rekombinante Fusion
	Anti-IgY	Chemische Kopplung oder Biotin/Streptavidin
Murine Hybridome	CD64	Rekombinante Fusion
	Protein G	Chemische Kopplung oder Biotin/Streptavidin
	Anti-Maus-IgG	

Anti-Spezies-Antikörper (anti-rabbit-IgG, anti-IgY und anti-Maus-IgG) können durch chemische Kopplung oder Biotin/Streptavidin-Wechselwirkungen mit dem IgE Fc verbunden werden. Bei einer chemischen Kopplung (z.B. NHS-, Maleimid, und Hydrazid-basierte Kopplungschemie) besteht die Gefahr, dass Bindungsstellen blockiert werden. Die Region an dem IgE Fc Molekül, die von den in der Diagnostik eingesetzten anti-IgE-Antikörpern erkannt werden soll, könnte nicht mehr zugänglich sein. Zudem können die Epitope der Bindungsmodule nicht mehr zugänglich sein, sodass der allergenspezifische Antikörper nicht mehr gebunden werden kann. Die Kopplung beider Komponenten mittels Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung würde in Testsystemen, in denen biotinylierte Reagenzien eingesetzt werden für Unwägbarkeiten sorgen. Testsysteme zum Nachweis von sIgE, bei denen zuerst das sIgE gebunden wird, mit biotinylierten Allergenen inkubiert wird und die Reaktionen mittels eines Streptavidin-Konjugats detektiert wird, sind kommerziell verfügbar. Würde eine Komponente (Bindungsmodul oder Detektionseinheit) an Streptavidin fusioniert vorliegen, könnte das biotinylierte Allergen direkt von dieser Komponente gebunden werden, ohne dass eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung stattfindet. Die Verwendung von Protein A/G würde die Verwendung von IgG-Antikörpern unterschiedlicher Spezies erlauben, sodass eine Großzahl kommerziell erhältlicher antigenspezifischer Antikörper eingesetzt werden könnten. Zeitgleich werden jedoch auch in der *in vitro*-Diagnostik größtenteils IgG-Antikörper als Fänger- und Detektionsantikörper eingesetzt, die mit den Proteinen A/G interagieren könnten. Zudem wurden in dieser Arbeit ebenfalls artifizielle humane IgG1- und

IgG4-Konstrukte hergestellt, deren Fc-Regionen ebenfalls von Protein A/G gebunden werden (147). Demnach würden die Konstrukt untereinander, anstatt mit dem antigenspezifischen Antikörper wechselwirken. Anti-Spezies-Antikörper als Bindungsmodul limitieren die allergenspezifischen Antikörper auf i.d.R. eine Spezies und Subklasse. Das würde die Wahl der spezifischen Antikörper deutlich einschränken. Die Kombination aus einem Rezeptor als Bindungsmodul (CHIR und CD64) und der humanen IgE Fc Region lässt sich mittels rekombinanter Fusion verwirklichen. Diese Kopplungen wurden bevorzugt, da bei einer rekombinanten Fusionierung nicht die Gefahr besteht, Bindungsstellen zu blockieren.

Ein CHIR-IgE Fc Konstrukt wurde zur Herstellung artifizieller humaner Seren eingesetzt. Der CHIR ist ein hoch affiner IgY-Rezeptor, der die Verwendung von Antikörpern anderer Spezies, aufgrund fehlender Spezifität, nicht zulässt (siehe Abbildung 33). Aufgrund der geringen Reaktivität mit den in dieser Arbeit hergestellten allergenspezifischen IgY-Proben, wurde daher ein kommerziell verfügbarer anti-Soja-IgY eingesetzt. Alle getesteten Soja-spezifischen Antikörper-Verdünnungen zeigten in Kombination mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktion gegen Soja-Extrakt. Die in drei Testsystemen (REAST, ImmunoCAP® und ALFA) ermittelten Ergebnisse der Soja-spezifischen Kontrollen belegten, dass das Konstrukt in Kombination mit IgY-Antikörpern zur Herstellung von ARTHUS geeignet ist. Da jedoch die in dieser Arbeit hergestellten, allergenspezifischen Hühnerproben geringe Reaktivitäten zeigten, kommerziell nur wenige allergenspezifische IgY-Antikörper verfügbar sind und die Spezifität des Rezeptors keine anderen Antikörper-Isotypen zulässt, konnte dieses Adapter-Molekül nicht zur Validierung verschiedener allergenspezifischer ARTHUS eingesetzt werden. Auch wenn das Spektrum artifizieller humaner Seren, bedingt durch den verwendeten Rezeptor, limitiert ist, konnte die Funktionalität des CHIR-IgE Fc Konstrukts durchaus bestätigt werden. Würden weitere Immunisierungen höhere Reaktivitäten liefern, wäre dieses Konstrukt eine denkbare Alternative zu humanen Seren.

Primär wurde daher der Fc γ RI Rezeptor (CD64) schließlich als Bindungsmodul eingesetzt. Humane IgG-Rezeptoren sind in der Lage Kaninchen-IgG zu binden (53), wobei der Fc γ RI IgG mit der höchsten Affinität im Vergleich mit den übrigen Fc γ Rezeptoren bindet (120). Ziel war es, damit artifizielle humane, IgE-spezifische Seren bestehend aus polyklonalen, allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem Adapter-Molekül herzustellen.

Die humane IgE Fc Region wurde in der vorliegenden Arbeit isoliert von dem CD64 Rezeptor charakterisiert. Diese, exprimiert in HEK293-Zellen, zeigte nach der IMAC im PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen lediglich eine Bande zwischen 40 kDa und 50 kDa (siehe Abbildung 40), was auf eine hohe Reinheit des Zielproteins hinweisen könnte. Die CH₂ - CH₄-Domänen besitzen ein theoretisches MG von 35,18 kDa. Des Weiteren weisen die CH₂ - CH₄-Domänen des

humanen IgEs drei Glykosylierungen auf, wodurch ein abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE möglich ist, da glykosylierte Proteine i.d.R. langsamer durch ein PAGE-Gel laufen, als es durch das MG begründet werden kann (148). Der Einsatz des gereinigten IgE Fc Fragments als Standardmaterial in einem ELISA zur Konzentrationsbestimmung von sIgE in humanen Proben demonstriert eine nahezu identische Performance im Vergleich zu einem WHO kalibrierten humanem Serum (siehe Kapitel 5.5.1). Abweichungen von < 10 % zwischen dem Material der WHO und der gereinigten Immunglobulin-Domäne, eingestellt auf identische IgE-Konzentrationen, belegen einen möglichen Einsatz dieser Komponente in Testsystemen zum Nachweis von sIgE. Die Erkennung durch anti-human-IgE Fc-Antikörper stellte die Voraussetzung zur Verwendung des IgE Fc Fragments als Komponente des Adapter-Moleküls CD64-IgE Fc dar. Die Untersuchung der Stabilität des gereinigten IgE Fc Fragments erlaubt die Vermutung, dass auch das Adapter-Molekül über einen längeren Zeitraum (z.B. 12 Monate, siehe Tabelle 62) stabil sein könnte. Jedenfalls könnte, aufgrund der Funktionalität und Stabilität, das IgE Fc Fragment als Alternative zu WHO kalibrierten humanen Seren eingesetzt werden.

Nicht gereinigter Zellkulturüberstand transfizierter HEK293-Zellen mit der DNA des CD64-IgE Fc Moleküls zeigte im Coomassie Blau-gefärbten PAGE-Gel keine zusätzliche Bande gegenüber Zellkulturüberstand nicht-transfizierter Zellen. HEK293-Zellen eignen sich gut dazu, humane Proteine inklusive der posttranslationalen Modifikationen zu exprimieren, sind hingegen aber mit einer geringen Proteinausbeute verbunden (71, 149). Die eindeutige Reaktion im Western Blot, der sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnet (34), bestätigte die Expression des CD64-IgE Fc Moleküls. Die Analyse von IMAC-gereinigtem Material mittels SDS-PAGE zeigte mehrere Banden, wobei die Intensität zweier Banden bei ca. 125 kDa und 200 kDa dominierte. Die Reaktion mit einem anti-human IgE-HRP-Konjugat im Western Blot verdeutlichte, dass es sich bei der 200 kDa Bande vermutlich um das Zielprotein handelte. Die geringe Reinheit des Konstrukts nach IMAC wirft Fragen auf, da die Aufreinigung der humanen IgE Fc Region ohne Fusionierung mit dem Rezeptor eine hervorragende Reinheit lieferte. Grundsätzlich ist die Aufreinigungseffizienz immer bedingt durch die Zugänglichkeit des Tags. Jedoch dürfte kein Unterschied in der Zugänglichkeit des His-Tags zwischen der IgE Fc Region und dem CD64-IgE Fc Konstrukt bestehen, da sich der Tag am N-Terminus beider Proteine befindet. Unter Umständen hängt die Reinheit des Zielproteins von der Expressionsrate ab. Ist die Konzentration des Zielproteins während der Aufreinigung geringer, so sind mehr Bindungsplätze auf der Ni²⁺ Säule frei. Unspezifische Wechselwirkungen von nicht His-markierten Proteinen an Ni²⁺ Ionen sind ein bekanntes Problem in Säugerzellkulturen, die von Natur aus Proteine mit aufeinanderfolgenden Histidinen besitzen (88). Die Ausbeute könnte z.B. durch die Verwendung einer anderen Zelllinie gesteigert werden (150).

Das gereinigte CD64-IgE Fc Konstrukt wurde hinsichtlich der Reaktivität und Spezifität gegenüber Antikörpern unterschiedlicher Spezies, verschiedener Isotypen und Subklassen im ELISA überprüft. Aufgrund der nachgewiesenen Affinität des CD64 Rezeptors zu Kaninchen-IgG wurde zur Überprüfung der notwendigen Reinheit des CD64-IgE Fc Konstrukts dieses in Kombination mit allergenspezifischen Kaninchenproben in einem Testsystem zum Nachweis von sIgE untersucht. Die Antiseren von Kaninchen vor und nach der Immunisierung mit f76 wurden in unterschiedlichen Verdünnungen mit gereinigtem CD64-IgE Fc Konstrukt inkubiert. Bei der Untersuchung handelte es sich um initiale artifizielle humane Seren, da das optimale Verhältnis von Konstrukt zu Kaninchen-IgG-Antikörpern nicht berücksichtigt wurde. Die Messung dieser initialen artifiziellen humanen Seren im REAST (einem ELISA zum Nachweis von sIgE siehe Kapitel 4.5.8), zeigten keinen signifikanten Unterschiede zwischen Konstrukten mit unterschiedlicher Reinheit. Die Kaninchenprobe vor Immunisierung lieferte bei allen Verdünnungen und in Kombination mit Konstrukt eindeutig negative Ergebnisse. Dies zeigt, dass nicht allergenspezifische Kaninchen-IgG-Antikörper, die ebenfalls von dem Konstrukt gebunden werden, keine unspezifischen bzw. falsch positiven Ergebnisse in dem Testsystem verursachen. Hingegen wurden bei der Verwendung von Antiseren, die nach der initialen Immunisierung gewonnen wurden, durchgehend Ergebnisse über dem cut-off des ELISAs (0,35 IU/mL) erzielt. Für diese Untersuchung wurden alle Komponenten in PBS verdünnt. Eine erneute Messung nach 24 h zeigte bereits einen deutlichen Abfall der Intensitäten, unabhängig von der verwendeten Reinheit des Konstrukts. Stattdessen korrelierte der Abfall der Reaktion mit der Verdünnung der Kaninchenproben, wodurch eine unzureichende Stabilität aufgrund zu geringer Proteinkonzentration in den Proben vermutet wurde. Da der Einsatz von BSA zur Stabilisierung einzelner Komponenten in ELISA-Systemen üblich ist (151), wurden dem Verdünnungspuffer unterschiedliche Konzentrationen BSA zugefügt und die Komponenten erneut in diesem Puffer verdünnt. BSA ist ein bekanntes Additiv zur Reduktion von Denaturierung, Aggregation, Sedimentation und Adsorption von Proteinen in einer Lösung (152). Der Zusatz von BSA im Verdünnungspuffer bedingte nicht nur eine akzeptable Stabilität der Proben über einen Monat, sondern erhöhte auch die Signale der initialen Messung im ELISA. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass der Einsatz von PBS als Verdünnungspuffer bereits von Beginn an keine stabilen artifiziellen humanen Seren begünstigte. Die prozentualen Abweichungen zwischen der Startmessung und der Messung nach einem Monat korrelierten mit der eingesetzten BSA-Konzentration. Insgesamt lässt sich bereits schlussfolgern, dass das hergestellte CD64-IgE Fc Molekül ein geeignetes Konstrukt zur Verbindung einer humanen IgE Fc Region mit allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern darstellt.

Die Analyse der Bindung zwischen dem CD64 Rezeptor, als Komponente des CD64-IgE Fc Konstrukts, bestätigt die in der Literatur beschriebenen Bindungsaffinitäten zu den humanen Subklassen IgG1, IgG3 und IgG4 (123-125). Die ECD des humanen Fc γ RI Rezeptors wurde dennoch in HEK293-Zellen exprimiert, da die Bindung zu mutierten, humanen IgG-Subklassen, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit in HEK293-Zellen exprimiert wurden, analysiert werden sollte. Die IMAC gereinigten Fraktionen des Fc γ RI zeigten im Coomassie-Blau gefärbten PAGE-Gel zwei Banden zwischen 100 kDa und 150 kDa sowie zwischen 50 kDa und 70 kDa. Die Proteinbande mit dem kleineren MG zeigte im Western Blot schwache Reaktionen mit einem rabbit-anti-human-IgG-HRP-Konjugat (siehe Abbildung 49). Die humane ECD des humanen Fc γ RI Rezeptors weist zusammen mit dem Peptidlinker ein MG von 31,6 kDa auf (siehe Tabelle 9). Das abweichende Laufverhalten in der SDS-PAGE könnte wieder durch mehrere Glykosylierungen begründet sein. Paetz *et al.* exprimierten ebenfalls die ECD dieses Rezeptors in HEK293-Zellen und erhielten Banden ähnlicher Größe (125).

Der Rezeptor wurde adsorptiv an Mikrotiterplatten gebunden. Die Ergebnisse der inkubierten Antikörperfragmente korrelierten sowohl mit der Beschichtungskonzentration des Rezeptors als auch mit der Verdünnung der Proben (siehe Tabelle 66). Insgesamt fielen die Reaktionen des gereinigten IgG4-Fragments geringer aus, als die Reaktionen mit dem gereinigten IgG1-Fragment, wobei keine exakte Proteinkonzentration der beiden Präparationen vorlag. Die stärkeren Reaktionen mit dem IgG1-Fragment, selbst bei ähnlicher Proteinkonzentration, beruhen auf der höheren Affinität des Rezeptors zu dieser Subklasse (56). Die in HEK293-Zellen exprimierte ECD des Fc γ RI Rezeptors wurde damit als geeignet, zur Beurteilung von mutierten, humanen IgG-Antikörper bewertet.

6.3 Etablierung artifizierlicher humaner IgG4-Seren

Ein Konstrukt, bestehend aus der konstanten Region des humanen IgG4s und dem CD64 Rezeptor, zur Verwendung als Komponente von artifizierlichen humanen IgG4-Kontrollen sollte rekombinant hergestellt werden. Auch für die IgG4-spezifischen artifizierlichen Kontrollen wurden die allergenspezifisch gereinigten Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet, da die Bindung dieser Antikörper zu dem CD64 Rezeptor bereits bestätigt wurde.

Im ELISA konnte zwar die Bindung zwischen dem CD64 Rezeptor und dem IgG4 Fc Fragment nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.5.2), jedoch war die Reaktion des Rezeptors zu dem Kaninchen-IgG minimal höher. Nach der Expression und Aufreinigung des Adapter-Moleküls wurde die Bindung zu Kaninchen-IgG im Dot Blot untersucht. Diese Untersuchung zeigte, dass das Adapter-Molekül in der Lage ist, Kaninchen-IgG zu binden. Es bestand die Möglichkeit, dass

der Rezeptor an das IgG4-Fragment eines anderen Adapter-Moleküls bindet und somit die Bindung an Kaninchen-IgG unterdrückt wäre. Der Fc γ RI bindet IgG1 jedoch mit höherer Affinität, als IgG4 (127) und Kaninchen-IgG weist deutliche Homologien im Bereich der relevanten Sequenzen zur Interaktion mit Fc γ Rs auf (siehe Abbildung 8). Die CD64-IgG4 Fc Adapter-Moleküle binden vermutlich auch aneinander, da aber die Affinität zu den Kaninchen-IgG-Antikörpern größer zu sein schien, sollte diese Tatsache nicht weiter stören.

Für d1, Bet v 1, f76 und f77 wurden ARTHUS für die Verwendung in einem Testsystem zum Nachweis von sIgG4 hergestellt. Bet v 1-spezifisches Kaninchen-IgG lag zwar vor, jedoch wird momentan mit rekombinant hergestellten Allergenen keine Immuntherapie durchgeführt, obwohl monospezifische Reaktionen gegen dieses Hauptallergen in der Regel mit positiv verlaufenden AITs einhergehen (153). Die Reaktionen der Bet v 1-spezifischen artifiziellen humanen IgG4-Seren im ELISA, getestet gegen t3, waren deutlich geringer, als die der d1-, f76- und f77-spezifischen Kontrollen (siehe Abbildung 55). Bet v 1 ist eine Proteinkomponente im Birkenextrakt, die nur ca. 10 % der Gesamt-Proteinkonzentration darstellt (154). Der auf Mikrotiterplatten immobilisierte t3-Extrakt enthielt daher vermutlich auch nur näherungsweise 10 % Bet v 1. Die d1-spezifischen IgG4-Seren reagierten hingegen mit einer ca. 10-fachen Signalstärke mit den d1-immobilisierten Mikrotiterplatten. Diese Kontrollen zeigten auch nachweisbare Reaktionen gegen d2, wobei die ermittelten ODs deutlich niedriger waren. Aufgrund des Verdünnungsfaktors des CD64-IgG4 Fc Konstrukts war die Testung der IgG4-ARTHUS in anderen kommerziell erhältlichen Testsystemen an dieser Stelle noch nicht möglich. Es wird z.B. auch die sIgG4-Bestimmung im ImmunoCAP[®] angeboten, wobei die Proben für die Bestimmung, wie auch bei vielen anderen ELISAs, 1/100 verdünnt werden. Bei einer Verdünnung von 1/100 des CD64-IgG4 Fc Konstrukts lieferten die ARTHUS gegen d2 und t3 bereits negative Resultate im ELISA von Dr. Fooke Labs. Geschuldet durch die Probenverdünnung würde daher eine Bestimmung der artifiziellen humanen IgG4-Seren in anderen Systemen, selbst bei dem Einsatz von unverdünntem CD64-IgG4 Fc, vermutlich auch zu negativen Befunden führen. Da momentan kein internationaler Standard für die Diagnostik von IgG4 verfügbar ist, gibt es weder einen einheitlichen Cut-off noch eine vergleichbare Einheit der gemessenen Werte zwischen den Testsystemen. Nach einer Steigerung der Expressionsrate würde daher mit Hilfe der artifiziellen humanen IgG4-Seren eine Standardisierung der Textsysteme angestrebt werden.

6.4 Etablierung artifiziieller humaner IgG1-Seren

Artifizielle humane IgG1-Seren sollten zur Standardisierung von Testsystemen zum Nachweis von Autoantikörpern generiert werden. Zur Herstellung solcher Kontrollen, unter Verwendung des Fc γ RI Rezeptors, wurde die humane IgG1 Fc Region mutiert. Der Bindungskoeffizient (K_A) des Rezeptors zu der IgG1 Fc Region ($6,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) ist annähernd doppelt so hoch wie der K_A des Rezeptors zur humanen IgG4 Fc Region ($3,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (123). Daher wurde vermutet, dass Konstrukte, bestehend aus Fc γ RI und IgG1 Fc, aggregieren könnten und damit keine Bindung zu antigenspezifischen Kaninchen-IgGs möglich wäre. In der Literatur sind mehrere Epitope der humanen IgG1 Fc-Sequenz beschrieben, an denen der Fc γ RI bindet (55, 120, 127, 155, 156). Aufgrund der neusten Studie von Lu *et al.* wurden die Positionen 233-237 (siehe Abbildung 56) mutiert (55), indem jede einzelne AS durch Alanin ausgetauscht wurde. Eine weitere Mutation bestand darin, alle fünf AS durch die Aminosäureabfolge zu ersetzen, die die humane IgG2-Region in diesem Bereich aufweist, da bisher in der Literatur keine Interaktionen zwischen IgG2 und dem CD64 Rezeptor nachgewiesen werden konnten. Die Sequenz des Fc γ RI Rezeptors wurde nicht mutiert, da die Eigenschaft des Rezeptors, verschiedene IgG-Antikörper zu binden, bewahrt werden sollte.

Die Zellkulturüberstände von HEK293-Zellen, die mit den mutierten IgG1-DNA-Sequenzen transfiziert wurden, wurden auf Reaktionen mit dem Fc γ RI untersucht. Die stärkste Reaktion mit den Fc γ RI Rezeptor-beschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte lieferte der Zellkulturüberstand von HEK293-Zellen, die mit der Wildtyp-IgG1 Fc-Sequenz transfiziert wurden. Die schwächsten Reaktionen zeigten die Zellkulturüberstände der Mutation 2, 5 und 6. Die Sequenzen der Mutationen sind in Tabelle 26 beschrieben, wobei es sich bei Mutation 6 um die Aminosäuresequenz von IgG2 in dem beschriebenen Bereich handelte. Daher wurden folglich die DNA-Sequenzen der Mutation 2, 5 und 6 zur Herstellung von CD64-IgG1 Fc Konstrukten mit entsprechenden Mutationen in der IgG1 Fc Region verwendet.

Die Mutation 2 und 6 der IgG1 Fc Region, die für das CD64-IgG1 Fc Konstrukt eingesetzt wurden, lieferten keine stabilen Transfektionen. Unter Umständen war die Affinität der ausgewählten IgG1 Fc Mutationen zu dem Fc γ RI Rezeptor zu hoch, sodass es zur Aggregation der Zielproteine in der Zelle kam. Jedoch zeigten genau diese mutierten IgG1 Fc Proteine keine nachweisbare Bindung zu dem CD64 Rezeptor im ELISA. Die ELISA-Ergebnisse könnten jedoch, aufgrund unterschiedlicher Expressionsraten der mutierten IgG1 Fc Fragmente, irreführend gewesen sein. Demnach könnte eine geringere Konzentration der Mutation 2 und 6 der IgG1 Fc Region im Zellkulturüberstand verantwortlich für eine niedrigere Reaktion im ELISA gewesen sein. Für die Mutation 2 wäre das ein denkbare Szenario. Ein Kassetten-Austausch, der einer IgG2-Sequenz entspricht (Mutation 6), dürfte jedoch eigentlich in keinem Fc γ RI-affinen

Protein resultieren. Es sei denn, es existiert in diesem Sequenzbereich eine niedrig-affine Bindung zwischen IgG2 und dem Rezeptor, die bisher noch nicht nachgewiesen wurde. Demnach wäre vermutlich ein Sequenzbereich zur Mutation gewählt worden, der nicht die hoch-affine Bindungsstelle zwischen Rezeptor und IgG darstellt. Dagegen spricht, dass das CD64-IgG4 Fc stabile Transfektionen lieferte, obwohl das IgG4 Fc Fragment nicht mutiert wurde und eine höhere Affinität zu dem FcγRI Rezeptor zeigen müsste als ein IgG2 Fc Fragment (123). Die Ursache für die nicht erfolgreiche Transfektion des CD64-IgG1 Fc Konstrukts mit der Mutation 6 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden und bleibt daher ungeklärt. Der Einsatz eines anderen Konstrukts z.B. unter Verwendung des CHIR Rezeptors hätte keine Mutation des IgG1 Fc Fragments bedurft, da dieser Rezeptor keine IgG-Antikörper bindet (siehe Abbildung 33). Damit wäre die Bindung der Adapter-Moleküle untereinander nicht möglich gewesen. Ein CHIR-IgG1 Fc Konstrukt würde jedoch ausschließlich die Verwendung von spezifischen IgY-Antikörper erfordern. Da die Verfügbarkeit spezifischer IgY-Antikörper limitiert ist und die Hühnerimmunisierungen in der vorliegenden Arbeit mit geringen Reaktivitäten verbunden waren, wurde mit dem CD64-IgG1 Fc Konstrukt mit der Mutation 5 weiter gearbeitet. Bei dieser Proteinsequenz wurde die fünfte AS (Glycin) in der zu mutierenden Kasette durch ein Alanin ersetzt (²³³ELLGA²³⁷).

Das CD64-IgG1 M5 Konstrukt konnte nach der Aufreinigung mittels IMAC im Western Blot nachgewiesen werden. Neben der vermutlichen Bande des Zielproteins bei ca. 100 kDa waren weitere schwache Banden bei ca. 70 kDa, 50 kDa und 30 kDa mit einem anti-Polyhistidin-Tag-Antikörper nachweisbar. Da die Intensität der Banden sehr schwach war, könnte es sein, dass die bereits angesprochenen Proteine der Säugerzellen, die von Natur aus aufeinanderfolgende Histidine besitzen (88), unspezifisch mit dem Konjugat reagierten. Eine andere Ursache wäre eine Kontamination der Fraktionen mit Proteasen, die das Zielprotein spalten würden. Jedoch würde man keine definierten Banden, sondern eher einen „Proteinschmier“ im Blot erwarten, sodass eine unspezifische Reaktion wahrscheinlicher scheint.

Die Ergebnisse eines Dot Blots zeigten, dass das Adapter-Molekül in der Lage ist, Kaninchen-IgG zu binden, und von einem anti-human-IgG-HRP-Antikörper erkannt wird. Daher ist vermutlich die Affinität des Rezeptors zum Kaninchen-IgG größer, als zur mutierten IgG1 Fc Region. Aufgrund der zusätzlich bestätigten Bindung zum Konjugat, trotz der Mutation, wurde das Konstrukt in Kombination mit d1-spezifischen Kaninchen-Antikörpern im ELISA analysiert. Reaktionen, abhängig von der Konzentration des Konstrukts und der allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörper, konnten nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen wurde, dass das Konstrukt funktionell ist. Da das Konstrukt aber für die Standardisierung von

Testsystemen zum Nachweis von Autoantikörpern generiert werden sollte, wurden dsDNA-spezifische Kaninchen-IgG-Antikörper generiert (siehe Kapitel 5.2.9).

Zur Immunisierung von Kaninchen wurde ein dsDNA-Plasmid eingesetzt, das zur Diagnostik von anti-dsDNA-Antikörpern, die als Marker für den *Systemischen Lupus erythematoses* (SLE) gelten, fungiert. Die IgG-gereinigten Antiseren zeigten zwar Reaktionen mit dem Plasmid, jedoch war der Titer (1/100) deutlich geringer, als der Titer der allergenspezifischen Antiseren (siehe Kapitel 5.2.9). In der Literatur ist die Immunisierung von Kaninchen mit einem Plasmid zwar beschrieben, dieses enthielt jedoch eine Sequenz, die für ein Protein codiert, sodass die Antiseren im Hinblick auf die Protein-Expression untersucht wurden und nicht auf Plasmid-spezifische Antikörper (157). In der vorliegenden Arbeit konnten Reaktionen gegen die Kombination aus dsDNA-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem Konstrukt in einem ELISA, zum Nachweis von dsDNA-spezifischen humanen Seren, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 62). Die Reaktionen korrelierten zwar mit der Verdünnung des CD64-IgG1 M5 Konstrukts, aber bei einer 1/10 Verdünnung des Konstrukts lag die maximale OD lediglich bei 0,187 OD. Ein Wert $< 0,5$ OD würde in dem angewendeten ELISA zu einem negativen Ergebnis führen, sodass die hier ermittelten Werte zur Herstellung dsDNA-spezifischer, artifizieller humaner Seren nicht ausreichen.

Der humane CD64 Rezeptor besitzt ebenfalls das Potential auch andere Antikörper-Isotypen zu binden. Die Bindung zwischen dem Rezeptor und den Subklassen IgG2a, IgG2b und IgG3 der Maus wurde in Abbildung 42 bestätigt. Überwiegend sind jedoch antigenspezifische Maus Antikörper der Subklasse IgG1 kommerziell erhältlich, die nicht eingesetzt werden können, da der Rezeptor keine Spezifität für Maus-IgG1 aufweist. Dennoch ist die Verfügbarkeit von anderen Maus Antikörper-Isotypen, die von dem CD64 gebunden werden, ausreichend. So wurde ein kommerziell erhältlicher anti-dsDNA-Antikörper aus der Maus der Subklasse IgG2a zur Herstellung dsDNA-spezifischer ARTHUS verwendet. Alle getesteten Antikörper-Verdünnungen zeigten in Kombination mit allen Konzentrationen des Adapter-Moleküls deutliche Reaktionen gegen dsDNA. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass grundsätzlich artifizielle Kontrollen, bestehend aus dem CD64-IgG1 M5 Konstrukt und dem eingesetzten anti-dsDNA-Antikörper, hergestellt werden können. Zudem implizieren die Ergebnisse, dass vermutlich ebenfalls Maus-Antikörper der Subklassen IgG2a, IgG2b und IgG3 mit anderer Spezifität in Kombination mit dem Konstrukt eingesetzt werden können.

6.5 Performance artifizierlicher humaner Seren in der *in vitro*-Diagnostik

Da ein CD64-IgE Fc Molekül theoretisch zwei Moleküle Kaninchen-IgG binden kann (siehe Abbildung 35), wurden die IgG-gereinigten Kaninchenserum in einem ca. zweifach molaren Verhältnis zu dem CD64-IgE Fc Molekül eingesetzt. Der CD64 Rezeptor des Adapter-Moleküls bindet ebenso allergenspezifisches als auch nicht-spezifisches Kaninchen-IgG. Das Binden von nicht-spezifischen Kaninchen-Antikörpern an den CD64 Rezeptor hätte zur Folge, dass deutlich mehr Adapter-Molekül eingesetzt werden müsste, um alle IgG-Antikörper zu binden. Im spez. IgE REAST werden theoretisch auch die nicht-spezifischen artifizierten Antikörper sowie freies Adapter-Molekül an die mit anti-IgE beschichtete Kavität gebunden, sodass mögliche Bindungsplätze für die spezifischen artifizierten Antikörper blockiert sind. Kleine-Tebbe und Jakob schilderten eine limitierte Bindungskapazität eines reversen Systems, bei dem die IgE-Antikörper aus humanen Proben von immobilisierten anti-IgE-Antikörpern abgefangen werden, als Nachteil dieser Methode. Aufgrund der definierten Bindungskapazität könnte die Analyse von Proben mit hoher Total-IgE-Konzentration zu falsch negativen Befunden oder zu mindestens zu einer zu geringen Einschätzung der sIgE-Konzentration führen. Andererseits wird das reverse System nicht durch allergenspezifische IgG-Antikörper inhibiert (24). Bezogen auf die artifizierten Seren bedeutet das, dass freie, allergenspezifische Kaninchen-IgG-Antikörper keinen Blockierungseffekt auf den reversen ELISA ausüben können. In einem direkten ELISA hingegen würden allergenspezifische Kaninchen-Antikörper, die nicht an ein Adapter-Molekül gebunden sind, die Epitope auf den Allergenen blockieren. Aufgrund der beschriebenen Beobachtung, wurden die Kaninchenserum allergenspezifisch gereinigt, bevor diese mit dem Adapter-Molekül titriert wurden, sodass möglichst jedes Adapter-Molekül zwei allergenspezifische Kaninchen-IgG-Antikörper bindet.

Der Anteil allergen-gereinigter IgG-Antikörper bezogen auf die Gesamt-IgG-Konzentration vor der allergenspezifischen Aufreinigung lag zwischen 0,30 % und 4,99 % (siehe Tabelle 53). Zum Vergleich wurde die Gesamt-IgG-Probe sowie zwei Fraktionen der f76-spezifischen Aufreinigung im spez. IgE REAST analysiert (siehe Tabelle 54). Die Ansätze mit allergenspezifisch gereinigten IgG-Antikörpern konnten 40-fach stärker verdünnt werden und erzielten vergleichbare Werte zu dem Ansatz mit nicht allergen-gereinigten Antikörpern. Dies ist ein Indiz dafür, dass ein Großteil der von dem CD64-IgE Fc gebundenen Antikörper vor der Aufreinigung nicht allergenspezifisch war. Die Verwendung von allergenspezifisch gereinigten Kaninchen-IgG-Antikörpern als Komponente der artifizierten humanen Seren, hatte zur Folge, dass auch das Konstrukt geringer konzentriert eingesetzt werden konnte.

Das optimale Mengenverhältnis von allergenspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern und dem rekombinant hergestellten Adapter-Molekül CD64-IgE Fc wurde im REAST mittels Kreuztitrationen bestimmt. Bei konstanter CD64-IgE Fc Konzentration nahm die Reaktion mit steigender Verdünnung der d1-spezifischen Antikörper ab, während bei dem Einsatz einer konstanten Konzentration von d1-spezifischen Antikörpern die Reaktion erstmal bis zur Nachweisgrenze zunahm, bis sie dann mit sinkender Konzentration des Adapter-Moleküls wieder abnahm (siehe Tabelle 55). Eine m3-spezifische Probe zeigte einen ähnlichen Verlauf. Bei diesen Proben lag das Adapter-Molekül vermutlich im Überschuss vor, sodass die Mikrotiterplatte, wie bereits beschrieben, von freiem CD64-IgE Fc blockiert war. Daher nahm die Reaktion mit sinkender CD64-IgE Fc Konzentration erstmal zu, bis alle CD64-IgE Fc Bindungsstellen von spezifischen Antikörpern besetzt waren. Die stärkste Verdünnung von spezifischen Antikörpern und CD64-IgE Fc Molekül, bei der noch die maximale Reaktion erreicht wurde, wurde als optimales Mengenverhältnis bezeichnet. Als maximale Reaktion wurden Konzentrationen ab 90 IU/mL bezeichnet, da ab diesem Wert die Standardkurve in ein Plateau (Sättigung) verläuft (siehe Abbildung 41).

Die Gesamt-IgG-Fraktion von einem Kaninchen, das mit 4 Allergenen aus *Hevea brasiliensis* (Hev b 5, Hev b 6.02, Hev b 7 und Hev b 8) immunisiert wurde, wurde mittels k82-Extrakt aufgereinigt. Die Reaktion dieser gereinigten Antikörper, in Kombination mit dem CD64-IgE Fc Konstrukt, fiel im REAST deutlich schwächer aus im Vergleich zu den artifiziellen humanen Seren mit anderer Spezifität. Auch der Anteil spezifischer Antikörper nach k82-spezifischer Aufreinigung, bezogen auf die Gesamt-IgG-Konzentration, war deutlich niedriger, als bei den übrigen Aufreinigungen (siehe Tabelle 53). Spezifische Antikörper gegen die vier Allergene, mit denen immunisiert wurde, könnten während der Aufreinigung verloren gegangen sein, da vermutlich nicht alle vier Allergene im Extrakt vertreten waren. Dies ließ zu mindestens die SDS-PAGE des Latexextrakts vermuten. Obwohl das Gel nur eine Bande mit einem MG von ca. 15 kDa zeigte, reagierte das artifizielle humane Serum gegen folgende drei Allergene: Hev b 5, Hev b 6.02 und Hev b 7 (siehe Tabelle 59). Fraglich ist, warum Reaktionen gegen drei Allergene nachgewiesen werden konnten, obwohl die Kaninchen-Antikörper anhand eines immobilisierten Latexextrakts, der nur ein Protein zu beinhalten schien, aufgereinigt wurden. Bei der Bande im Gel könnte es sich um Hev b 5, welches ein MG von 16 kDa besitzt, gehandelt haben, wodurch die Reaktion mit diesem Hauptallergen zu erklären wäre. Eine stärkere Reaktion zeigte das artifizielle humane Serum gegen Hev b 6.02. Dieses könnte aufgrund der Größe (4,7 kDa) aus dem Gel heraus gelaufen sein, sodass eine Abschätzung der Konzentration von Hev b 6.02 im Latexextrakt nicht möglich war. In Kapitel 6.1 wurde die Vermutung geäußert, dass es sich bei der Bande im Gel auch theoretisch um das 13,9 kDa Protein Hev b 8 handeln könnte. Dies ist wahrscheinlich nicht

der Fall, da keine Reaktion gegen dieses Protein im ELISA nachgewiesen werden konnte. Eine Reaktion gegen Hev b 7 konnte jedoch nachgewiesen werden, obwohl keine Bande der entsprechenden Größe (42,9 kDa) im PAGE-Gel sichtbar war. Unter Umständen war die Hev b 7-Konzentration im Extrakt so niedrig, dass das Protein weder mit einer Coomassie-Blau-Färbung noch mit einer Silberfärbung visualisiert werden konnte. Dagegen spricht, dass die Reaktionen im ELISA gegen Hev b 7 höher sind, als gegen Hev b 5, wobei das Vorkommen eines Proteins dieser Größe im Extrakt im PAGE-Gel gezeigt werden konnte. Daher scheint es sich bei der Bande höchstwahrscheinlich doch um Hev b 6.03 gehandelt zu haben, welches nicht zur Immunisierung eingesetzt wurde. Damit würde die Theorie Sinn machen, dass Hev b 6.02 zu klein ist, um im PAGE-Gel detektiert zu werden und Hev b 5 und Hev b 7 mit einer zu geringen Konzentration im Extrakt vertreten waren, sodass diese durch die Färbemethoden nicht visualisiert wurden. Diese Theorie korreliert jedenfalls mit den ermittelten Reaktionen gegen diese Allergene im REAST. Eine eindeutige Identifizierung der Allergene im *Hevea brasiliensis*-Extrakt wäre durch den Einsatz allergenspezifischer Antikörper möglich. Diese könnten durch eine separate Aufreinigung der Kaninchen-IgG-Antikörper mit Hev b 5, Hev b 6.02 und Hev b 7 hergestellt werden. Ebenfalls könnten derartige monospezifische Antikörper aus Antiseren gereinigt werden, die von einem Kaninchen stammen, das mit einem Extrakt immunisiert wurde. So zeigte nämlich das ARTHUS, welches durch die Immunisierung mit f17-Extrakt produziert wurde, zusätzlich zu den Reaktionen gegen den Extrakt auch Reaktionen gegen die verfügbaren rekombinanten Allergene Cor a 1, Cor a 8, und Cor a 11 (siehe Abbildung 46).

Ziel war es, die artifiziellen humanen IgE-Seren zur Standardisierung unterschiedlicher *in vitro* Methoden zum Nachweis von sIgE einzusetzen. Die Ergebnisse von 22 von insgesamt 23 artifiziellen humanen Seren, ermittelt in drei Testsystemen (REAST, ImmunoCAP® und ALFA), weichen um maximal eine Klasse voneinander ab (siehe Tabelle 64). Die Abweichungen zwischen den Ergebnissen für die f78-spezifische Kontrolle waren deutlich höher und lieferten einen Variationskoeffizient von 116,54 %. Die deutlich stärkere Reaktion dieser Kontrolle im ImmunoCAP®, als im REAST könnte durch freies CD64-IgE Fc begründet sein. Im REAST würde dieses Molekül mit den artifiziellen humanen Kontrollen um die anti-IgE-Bindungsplätze konkurrieren. Freie, nicht von dem Konstrukt gebundene f78-spezifische Kaninchen-Antikörper würden hingegen im ImmunoCAP® (siehe Kapitel 4.5.7), einem direkten ELISA, die an Kapseln gebundenen Allergene blockieren (24). Dass eine der Komponenten der ARTHUS im Überschuss vorliegt, sollte jedoch prinzipiell durch die vorhergegangenen Titrationen vermieden worden sein. Reagiert das im ImmunoCAP® eingesetzte Konjugat unspezifisch mit Kaninchen-IgG-Antikörpern, würde ein höheres Ergebnis erzielt werden. Unspezifische Reaktion im ImmunoCAP® können zwar in Verbindung mit hohen Total-IgE-Konzentrationen im Serum verbunden sein (21),

jedoch sind unspezifische Reaktion gegen Kaninchen-Antikörper in der Literatur nicht beschrieben. Neben der Möglichkeit, dass kein optimales Mengenverhältnis zwischen CD64-IgE Fc und f78-spezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern aufgrund von fehlerhaften Verdünnungen vorlag, könnten unterschiedliche Allergenextrakte diskrepante Ergebnisse erzeugen. Ein Indiz dafür lieferte das Ergebnis im ALFA, einem Schnelltest zur qualitativen Bestimmung von sIgE in humanem Serum, Plasma oder Vollblut (siehe Kapitel 4.5.10). Das Ergebnis war deutlich niedriger, als das Ergebnis im ImmunoCAP®, obwohl es sich bei dem Schnelltest auch um eine direkte Nachweismethode handelt. Die REAST und ALFA Ergebnisse weichen allerdings auch, trotz der Verwendung identischer Allergenextrakte, voneinander ab. Daher sind die diskrepanten Ergebnisse vermutlich sowohl durch kein optimales Mengenverhältnis der Komponenten als auch durch die Verwendung unterschiedlicher Rohmaterialien bedingt.

Die Variationskoeffizienten der restlichen artifiziellen Kontrollen lagen zwischen 15,79 % und 68,23 % und ergaben einen Mittelwert von 38,28 %. Die besseren Übereinstimmungen für die c1-, f76-, f77- und Bet v 1-spezifischen Kontrollen gegenüber den artifiziellen humanen Seren für die Allergenextrakte (k82, m3, f17 und d1) weisen wieder auf unterschiedliche Zusammensetzungen der Allergenextrakte hin (4). Der Mittelwert der Variationskoeffizienten für die artifiziellen humanen Seren, getestet in drei verschiedenen Testsystemen, war vergleichbar mit dem Variationskoeffizienten von humane Seren (38,00 %, Tabelle 65), sodass die Abweichungen vermutlich nicht abhängig von den artifiziellen humanen Seren, sondern eher bedingt durch die unterschiedlichen Testsysteme bzw. eingesetzten Rohmaterialien waren. Studien über den Vergleich dieser Methoden existieren zwar bereits (21, 158), jedoch sollte der Vergleich parallel zu den Testungen der artifiziellen humanen Seren durchgeführt werden, damit die identischen Allergenchargen eingesetzt werden. Die Testungen der humanen Seren gegen f78 lieferten Variationskoeffizienten < 25 %, sodass die zuvor beschriebenen Abweichungen der f78-spezifischen ARTHUS in der Tat nicht ausschließlich durch unterschiedliche Extrakte zu begründen sind.

Die Bet v 1-spezifischen Kontrollen zeigten deutliche Reaktionen gegen den gesamten Birkenextrakt (t3). Artificielle humane Seren gegen rekombinante oder nativ gereinigte Allergene könnten daher eingesetzt werden, um die Konzentration eines Allergens in verschiedenen Extraktchargen zu prüfen und gegebenenfalls die Konzentration dieses Allergens zu justieren. Die Reaktionen von *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1)-spezifischen artifiziellen humanen Seren gegen *Dermatophagoides farinae* (d2) sind wahrscheinlich durch homologe Sequenzen verschiedener Allergene bedingt (159). Die Immunisierung mit einem Extrakt kann daher in artificele humane Seren gegen verschiedene Extrakte resultieren.

Titrationen artifizieller humaner Seren spezifisch für d1, f17, Bet v 1 und c1, ebenfalls getestet in allen drei Testsystemen, lieferten Korrelationskoeffizienten (Pearson's r) von $> 0,98$, wodurch sich ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Werten eindeutig bestätigen lässt. Dadurch besteht die Möglichkeit, die ARTHUS auf jede gewünschte Konzentration einzustellen.

Die Avidität der artifiziellen humanen Seren könnte vermutlich, aufgrund der Anzahl der möglichen Allergen-Bindungsstellen, im Vergleich zu der Avidität von humanem IgE abweichen. Das CD64-IgE Fc Adapter-Molekül kann theoretisch zwei Kaninchen-IgG-Antikörper binden, sodass die doppelte Anzahl an Allergen-Bindungsstellen pro Molekül zur Verfügung stehen könnte. In einem direkten Nachweissystem (z.B. ImmunoCAP® oder ALFA), würde die Bindung eines Moleküls über mehrere Allergen-Epitope, falls keine sterische Behinderung stattfindet, wahrscheinlich kein verändertes Ergebnis bewirken, da nur eine IgE Fc Region nachgewiesen wird. In einem reversen System (z.B. REAST) könnte ein CD64-IgE Fc Molekül komplexiert mit zwei allergenspezifischen IgGs eine gesteigerte Reaktion bewirken. Es könnten mehrere Allergene an einem Konstrukt binden, als es bei humanem IgE der Fall ist. Die ermittelten Ergebnisse in Tabelle 64 sprechen jedoch dagegen. 11 von 23 artifizielle humane Seren erzielten im ImmunoCAP® höhere Ergebnisse, als im REAST, wodurch eine möglicherweise abweichende Avidität der ARTHUS, im Gegensatz zu humanem IgE, keine Rolle bei der Verwendung in unterschiedlichen Testmethoden zu spielen scheint. Eine gänzlich alternative Vorgehensweise zur Herstellung von Kontrollen, wäre die Verwendung von rekombinant hergestellten, monoklonalen Antikörpern (160). Obwohl man damit die Frage nach der Avidität umgehen könnte und zudem die Möglichkeit hätte, Antikörper gegen spezifische Epitope zu produzieren, wäre der Aufwand, ein breites Spektrum dieser Antikörper herzustellen, sicherlich deutlich größer.

Ein anderes Thema ist die Affinität der artifiziellen humanen Seren. In der Literatur sind unterschiedliche Affinitäten zwischen humanem IgE und verschiedenen Allergenen beschrieben (161-164). Die kommerziellen Testsysteme zum Nachweis von sIgE sind nicht auf spezielle Affinitäten beschränkt. Ganz im Gegenteil ist das Ziel der Allergie-*in vitro*-Diagnostik-Hersteller, möglichst jedes sIgE, unabhängig von der Affinität, zu detektieren. Dass die Affinität der ARTHUS ausreicht, um in verschiedenen Testsystemen detektiert zu werden, wurde bereits ausführlich dargestellt.

Die artifiziellen humanen IgE-Seren können für mindestens drei Monate, bei einer Lagerung bei 2-8 °C oder sogar bei Raumtemperatur, verwendet werden. Die Ergebnisse der ARTHUS, getestet in verschiedenen Testsystemen als auch die Stabilitätsdaten bestätigen, dass die ARTHUS ein geeignetes Werkzeug zur Standardisierung von *in vitro*-Testsystemen darstellen können. Ziel ist es, die artifiziellen humanen IgE-Seren z.B. in Ringversuchen einzusetzen oder die Zusammensetzung der Allergenextrakte unterschiedlicher *in vitro*-Diagnostik-Hersteller zu standardisieren.

Dies gilt ebenfalls für die artifiziellen humanen IgG4-Seren, deren Funktionalität ebenfalls bewiesen werden konnte. Ein Problem bei der Herstellung stellt sicher die geringe Expressionsrate der HEK293-Zellen dar. Obwohl eine Standardisierung der Testsysteme zum Nachweis von sIgG4 sicher sinnvoll wäre, ist die Umsetzung, bedingt durch die unterschiedlichen Einheiten der Systeme, eine Herausforderung. Damit jedoch diese Kontrollen in ausreichendem Volumen zur Analyse in anderen Systemen hergestellt werden können, muss die Expressionsrate des CD64-IgG4 Fc Konstrukts deutlich erhöht werden. In dieser Arbeit wurden die identischen, allergenspezifischen Kaninchen-IgGs für die artifiziellen IgG4-Seren wie auch für die artifiziellen IgE-Seren verwendet, um die Funktionalität beider Ansätze zu überprüfen. Es existieren jedoch nur Testsysteme zum Nachweis von sIgG4 gegen Allergene, mit denen auch Immuntherapien durchgeführt werden. Daher sollten weitere Kaninchen mit Allergenen immunisiert werden, die auch als Immuntherapiepräparate verfügbar sind.

Eine andere Alternative wäre der Einsatz von allergenspezifischen Antikörpern anderer Spezies, die ebenfalls von dem CD64 Rezeptor gebunden werden können. Dieser bindet unter anderem auch die IgG2a-, IgG2b- und IgG3-Subklassen der Maus und IgG aus Kaninchen, Schaf und Esel (siehe Kapitel 5.5.2). Beispielsweise könnten für die Autoimmundiagnostik dsDNA-spezifische artifizielle humane Seren unter Verwendung eines Maus-IgG2a-Antikörpers hergestellt werden. Dadurch könnten auch ARTHUS für andere Autoimmunparameter, unter Verwendung von spezifischen, monoklonalen Maus-IgG2a-Antikörpern, vergleichbar zügig hergestellt werden. Beispielsweise könnten Proteinase 3- und Myeloperoxidase-spezifische artifizielle humane Seren zur Standardisierung von *in vitro*-Testmethoden zur Diagnose von Antineutrophile Cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden beitragen. Diese sind mit den Krankheitsbildern mikroskopische Polyangiitis, Wegenersche Granulomatose und Churg-Strauss-Syndrom verbunden. Der Vergleich verschiedener Testmethoden zum Nachweis von ANCAs belegt eindeutig die fehlende Standardisierung der *in vitro*-Autoimmundiagnostik (165, 166).

Der Einsatz monoklonaler Antikörper, im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern, bietet die Möglichkeit, gezielte Epitope nachzuweisen. In der Literatur sind vier Epitope der Proteinase 3 beschrieben (167), deren Zugänglichkeit in den verschiedenen Testsystemen mit ARTHUS, bestehend aus monoklonalen Antikörpern gegen diese Epitope, analysiert werden könnten. Dieses Prinzip zum Nachweis spezifischer Epitope lässt sich ebenfalls auch auf die artifiziellen humanen IgE-Seren übertragen. Die Verwendungsmöglichkeiten der ARTHUS können durch den Einsatz von sowohl polyklonalen als auch monoklonalen Antikörpern verschiedener Spezies deutlich erweitert werden. Diverse, kommerziell verfügbare Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten ermöglichen zudem eine schnelle Realisierung neuer artifizieller Kontrollen zum Einsatz in der IgE-, IgG4- und IgG1-Diagnostik.

7 Ausblick

Die Funktionalität der artifiziellen humanen IgE-Seren wurde in dieser Arbeit hinreichend bewiesen, sodass basierend auf dieser Grundlage weitere ARTHUS mit anderer Spezifität hergestellt werden können. Ziel ist es, die ARTHUS z.B. in Ringversuchen einzusetzen oder die Zusammensetzung der Allergenextrakte unterschiedlicher *in vitro*-Diagnostik-Hersteller zu standardisieren. Fraglich ist jedoch die Akzeptanz von ARTHUS im Vergleich zu humanen Seren. ARTHUS müssten vermutlich in weiteren Testsystemen validiert werden, um mögliche Anwender von der Funktionalität dieser Kontrollen zu überzeugen. ARTHUS besitzen das Potential die Allergie-Diagnostik zu standardisieren und tragen damit unmittelbar zu einer verbesserten Therapieentscheidung bei. Folglich würde das Risiko einer unzureichenden oder falschen Patientenbehandlung durch eine verbesserte Diagnostik minimiert werden.

Die artifiziellen humanen IgG4-Seren sind prinzipiell zum Einsatz in Testsystemen zum Nachweis von sIgG4 geeignet. Zur Herstellung dieser Kontrollen in ausreichendem Volumen, muss jedoch die Expressionsrate des CD64-IgG4-Fc-Konstrukts deutlich erhöht werden. Ein CHIR-IgG4 Fc Konstrukt könnte ebenfalls zur Herstellung von ARTHUS für die IgG4-Diagnostik in Betracht gezogen werden. Die Voraussetzung ist jedoch die Verfügbarkeit von IgY-Antikörper, spezifisch für Allergene, die auch als Immuntherapiepräparate verfügbar sind. Eine standardisierte Diagnostik zur Verlaufskontrolle von Immuntherapien könnte jederzeit Aufschluss über den Therapie-Erfolg liefern. Frühzeitig könnte entschieden werden, ob die Therapie erfolgreich verläuft oder vermutlich zu keiner Verbesserung der Lebensqualität des Patienten führt und damit der Therapieansatz überdacht werden muss.

Artifizielle humane IgG1-Seren könnten zur Verwendung in der Autoimmundiagnostik von SLE Patienten, unter Verwendung eines monoklonalen anti-dsDNA-Antikörper, hergestellt werden. Das Konstrukt würde demnach auch die Grundlage für weitere Kontrollen für die Autoimmundiagnostik bilden. Diese würden zu einer Vergleichbarkeit der bisher nicht standardisierten Testsysteme führen, sodass die Therapieentscheidung nicht aufgrund unterschiedlicher *in vitro* Befunde verzögert wird und die Behandlung umgehend eingeleitet werden kann.

Der Einsatz dieses Konstrukts wäre auch für andere Parameter denkbar. In der Infektionsserologie werden IgG-, IgA-, und IgM-Antikörper gegen verschiedene Erreger nachgewiesen. Neben den bereits existierenden IgG1- und IgG4-Konstrukten wäre die Entwicklung von einem IgM- / IgA-Konstrukt möglich, da CD64 nicht mit diesen Isotypen interagiert. Sind erreger-spezifische Antikörper, die mit dem CD64 Rezeptor wechselwirken, verfügbar, besteht die Möglichkeit, Kontrollen mit verschiedenen Fc Regionen für Parameter der Infektionsserologie zu validieren.

8 Literaturverzeichnis

1. Bennich H, *et al.* (1970) A research standard for human serum immunoglobulin E. *Bull World Health Organ* 43(4):609-611.
2. Seagroatt V & Anderson SG (1981) The second international reference preparation for human serum immunoglobulin E and the first British standard for human serum immunoglobulin E. *J Biol Stand* 9(4):431-437.
3. Thorpe SJ, Heath A, Egner W, & Patel D (2013) The 3rd International Standard for serum IgE: report of the international collaborative study to evaluate the candidate preparation - See more at: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/87704#sthash.gfLcRKfJ.dpuf>. *World Health Organization*.
4. Esch RE (1997) Allergen source materials and quality control of allergenic extracts. *Methods* 13(1):2-13.
5. Chapman MD, *et al.* (2008) The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 122(5):882-889 e882.
6. Nakagawa T (1991) The role of IgG subclass antibodies in the clinical response to immunotherapy in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 21(3):289-296.
7. Shoenfeld Y, *et al.* (2007) EASI - The European Autoimmunity Standardisation Initiative: a new initiative that can contribute to agreed diagnostic models of diagnosing autoimmune disorders throughout Europe. *Ann N Y Acad Sci* 1109:138-144.
8. Agmon-Levin N, *et al.* (2014) International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Annals of the rheumatic diseases* 73(1):17-23.
9. Huber B (2006) [100 years of allergy: Clemens von Pirquet--his concept of allergy and his basic understanding of the disease: 2: The Pirquet concept of allergy]. *Wien Klin Wochenschr* 118(23-24):718-727.
10. Murphy KM, Travers P, Walport M, Seidler L, & Hauer-Siller I (2009) *Janeway Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag).
11. Gell PGH & Coombs RRA (1968) *Clinical aspects of immunology* (Blackwell Scientific).
12. Johansson SG, *et al.* (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 113(5):832-836.
13. Neumann J (2008) *Immunbiologie: Eine Einführung* (Springer).
14. Hal-allergy, Entstehung und Ablauf von Typ I - Allergien. URL: <http://www.hal-allergy.de/allergie/immunsystem/> (Stand 11.12.2016).
15. Boehmer H (1995) *Immunabwehr* (Spektrum Akademischer Verlag).
16. Renz-Polster H & Krautzig S (2008) *Basislehrbuch Innere Medizin* (Urban & Fischer bei Elsev).
17. Roitt IM (1993) *Leitfaden der Immunologie* (Blackwell-Wiss.).
18. Ring J & Burg G (1981) *New trends in allergy* (Springer-Verlag).
19. Saloga J (2006) *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis* (Schattauer).
20. Lucassen R, Fooke, M., Kleine-Tebbe, J., Mahler, M. (2008) Development and Evaluation of a Rapid Assay for the Diagnosis of IgE-mediated Type I Allergies. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18:223-224.
21. Pfender N, *et al.* (2012) Evaluation of a Novel Rapid Test System for the Detection of Specific IgE to Hymenoptera Venoms. *Journal of allergy* 2012:862023.
22. Ferrer M, *et al.* (2009) Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19 Suppl 1:19-24.

23. Feyzkhanova GU, *et al.* (2014) Development of hydrogel biochip for in vitro allergy diagnostics. *Journal of immunological methods* 406:51-57.
24. Kleine-Tebbe J & Jakob T (2015) Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical considerations for use in clinical routine: Part 18 of the Series Molecular Allergology. *Allergo J Int* 24:185-197.
25. Aalberse RC, *et al.* (1983) IgG4 as a blocking antibody. *Clinical reviews in allergy* 1(2):289-302.
26. Akdis CA & Akdis M (2015) Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *The World Allergy Organization journal* 8(1):17.
27. Durham SR & investigators GT (2011) Sustained effects of grass pollen AIT. *Allergy* 66 Suppl 95:50-52.
28. Golden DB, Kagey-Sobotka A, & Lichtenstein LM (2000) Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 105(2 Pt 1):385-390.
29. Aalberse R (2011) The role of IgG antibodies in allergy and immunotherapy. *Allergy* 66 Suppl 95:28-30.
30. Holgate ST & Polosa R (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8(3):218-230.
31. Bernardi D, *et al.* (2008) Time to reconsider the clinical value of immunoglobulin G4 to foods? *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 46(5):687-690.
32. Stapel SO, *et al.* (2008) Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 63(7):793-796.
33. Aalberse RC, Van Milligen F, Tan KY, & Stapel SO (1993) Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy* 48(8):559-569.
34. Berg JM, Tymoczko JL, & Stryer L (2013) *Biochemie* (Springer Spektrum, Berlin u.a.) 7. Aufl. Ed pp XLI, 1196 S.
35. Smith DA & Germolec DR (1999) Introduction to immunology and autoimmunity. *Environmental health perspectives* 107 Suppl 5:661-665.
36. Nemazee D (2006) Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 6(10):728-740.
37. Janeway C (2001) *Immunobiology the immune system health & disease* (Garland, New York) 5. ed Ed p 752 S.
38. Davidson A & Diamond B (2001) Autoimmune diseases. *The New England journal of medicine* 345(5):340-350.
39. Cutolo M, Sulli A, Seriolo B, Accardo S, & Masi AT (1995) Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clinical and experimental rheumatology* 13(2):217-226.
40. Cooper GS, Bynum ML, & Somers EC (2009) Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of autoimmunity* 33(3-4):197-207.
41. Zabek J (2002) [Assessment methods of autoantibodies in autoimmune diseases]. *Przegląd epidemiologiczny* 56 Suppl 4:59-66.
42. Spiegelberg HL (1989) Biological role of different antibody classes. *International archives of allergy and applied immunology* 90 Suppl 1:22-27.
43. Gould HJ & Sutton BJ (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8(3):205-217.
44. Dorrington KJ & Bennich HH (1978) Structure-function relationships in human immunoglobulin E. *Immunological reviews* 41:3-25.
45. Vidarsson G, Dekkers G, & Rispens T (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology* 5:520.
46. Kishore U & Reid KB (2000) C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49(1-2):159-170.
47. Aalberse RC & Schuurman J (2002) IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105(1):9-19.

48. Arcavi M & Dadone J (2009) [Antinuclear antibodies, patterns and characteristics obtained by immunofluorescence. The importance of the IgA, IgM and IgG isotypes]. *Medicina* 69(5):502-506.
49. Zhang H, *et al.* (2015) Serum IgG subclasses in autoimmune diseases. *Medicine* 94(2):e387.
50. Lin G & Li J (2010) Elevation of serum IgG subclass concentration in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 30(6):837-840.
51. Raghavan M & Bjorkman PJ (1996) Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annual review of cell and developmental biology* 12:181-220.
52. van der Poel CE, Spaapen RM, van de Winkel JG, & Leusen JH (2011) Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *Journal of immunology* 186(5):2699-2704.
53. Rayner LE, *et al.* (2013) The solution structure of rabbit IgG accounts for its interactions with the Fc receptor and complement C1q and its conformational stability. *J Mol Biol* 425(3):506-523.
54. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8(1):34-47.
55. Lu J, *et al.* (2015) Structure of FcγRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
56. Lu J, Ellsworth JL, Hamacher N, Oak SW, & Sun PD (2011) Crystal structure of Fcγ receptor I and its implication in high affinity gamma-immunoglobulin binding. *The Journal of biological chemistry* 286(47):40608-40613.
57. Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, & Ward ES (2001) Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *International immunology* 13(12):1551-1559.
58. Mülhardt C (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics* (Spektrum, Heidelberg) 6. Aufl. Ed pp XIII, 316 S.
59. Mullis K, *et al.* (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-273.
60. Kolmodin LA & Williams JF (1997) PCR. Basic principles and routine practice. *Methods Mol Biol* 67:3-15.
61. Bhagya CH, Wijesundera Sulochana WS, & Hemamali NP (2013) Polymerase chain reaction optimization for amplification of Guanine-Cytosine rich templates using buccal cell DNA. *Indian journal of human genetics* 19(1):78-83.
62. Bergkessel M & Guthrie C (2013) Colony PCR. *Methods in enzymology* 529:299-309.
63. Voytas D (2001) Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 10:Unit 10 14.
64. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, & Kim YH (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE* (62).
65. White HW, Vartak NB, Burland TG, Curtis FP, & Kusukawa N (1999) GelStar nucleic acid gel stain: high sensitivity detection in gels. *BioTechniques* 26(5):984-988.
66. Li MZ & Elledge SJ (2012) SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol* 852:51-59.
67. Kobayashi I & Takahashi N (1988) Double-stranded gap repair of DNA by gene conversion in *Escherichia coli*. *Genetics* 119(4):751-757.
68. Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7(6):1513-1523.
69. Barik S (1996) Site-directed mutagenesis in vitro by megaprimer PCR. *Methods Mol Biol* 57:203-215.

70. Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, & Dyson MR (2006) Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC biotechnology* 6:49.
71. Thomas P & Smart TG (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 51(3):187-200.
72. Graham FL, Smiley J, Russell WC, & Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36(1):59-74.
73. Huang HL, *et al.* (2010) Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of biomedical science* 17:36.
74. Jansohn M & Aigner A (2012) *Gentechnische Methoden eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (Spektrum, Heidelberg) 5. Aufl. Ed pp XXIII, 660 S.
75. Felgner PL, *et al.* (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(21):7413-7417.
76. Felgner PL & Ringold GM (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337(6205):387-388.
77. Chesnoy S & Huang L (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29:27-47.
78. Raymond C, *et al.* (2011) A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. *Methods* 55(1):44-51.
79. Longo PA, Kavran JM, Kim MS, & Leahy DJ (2013) Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in enzymology* 529:227-240.
80. Weiss ME & Adkinson NF (1988) Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. *Clinical allergy* 18(6):515-540.
81. Sercarz EE (1980) *Strategies of immune regulation* (Acad. Pr., New York u.a.) pp XIX, 537 S.
82. Brown JS, Ledoux R, & Nelson HS (1985) An investigation of possible immunologic reactions to human serum albumin used as a stabilizer in allergy extracts. *J Allergy Clin Immunol* 76(6):808-812.
83. Horiuchi Y & Shibata K (1965) Immunochemical studies on the antigenic bindings of benzylpenicillin and five synthetic penicillins with proteins. Detection of rabbit penicillin antibodies adapted specifically to the acyl side chain portion of the penicillin molecule. *International archives of allergy and applied immunology* 28(6):306-320.
84. Levine BB & Ovary Z (1961) Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D-alpha-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *The Journal of experimental medicine* 114:875-904.
85. Zhao Z, Batley M, D'Ambrosio C, & Baldo BA (2000) In vitro reactivity of penicilloyl and penicillanyl albumin and polylysine conjugates with IgE-antibody. *Journal of immunological methods* 242(1-2):43-51.
86. Schneider CH & de Weck AL (1966) [Differentiation of penicilloic acids from functional derivatives of their alpha carboxyl group with the penamaldate stability test]. *Helvetica chimica acta* 49(5):1689-1694.
87. Urh M, Simpson D, & Zhao K (2009) Affinity chromatography: general methods. *Methods in enzymology* 463:417-438.
88. Bornhorst JA & Falke JJ (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology* 326:245-254.
89. Hagel L (2001) Gel-filtration chromatography. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* Chapter 10:Unit 10 19.

90. Cox KL, *et al.* (2004) Immunoassay Methods. *Assay Guidance Manual*, eds Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, Glicksman M, Inglese J, Iversen PW, *et al.* Bethesda (MD)).
91. Rehm H & Letzel T (2010) *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics* (Spektrum Akad. Verl., Heidelberg) 6. Aufl. Ed.
92. Walker JM (1984) Gradient SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1:57-61.
93. Rivero-Gutierrez B, Anzola A, Martinez-Augustin O, & de Medina FS (2014) Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Analytical biochemistry* 467:1-3.
94. Sasse J & Gallagher SR (2009) Staining proteins in gels. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* Chapter 10:Unit 10 16.
95. Neuhoff V, Arold N, Taube D, & Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6):255-262.
96. Switzer RC, 3rd, Merrill CR, & Shifrin S (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 98(1):231-237.
97. Merrill CR, Dunau ML, & Goldman D (1981) A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 110(1):201-207.
98. Oakley BR, Kirsch DR, & Morris NR (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 105(2):361-363.
99. Rabilloud T (1990) Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11(10):785-794.
100. Rabilloud T (1999) Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* 112:297-305.
101. Merrill CR & Pratt ME (1986) A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Analytical biochemistry* 156(1):96-110.
102. Merrill CR (1990) Silver staining of proteins and DNA. *Nature* 343(6260):779-780.
103. Dias da Silva W & Tambourgi DV (2010) IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology* 135(3-4):173-180.
104. Towbin H, Staehelin T, & Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-149.
105. Towbin H & Gordon J (1984) Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *Journal of immunological methods* 72(2):313-340.
106. Holtzhauer M (1997) *Biochemische Labormethoden mit ... 79 Tabellen* (Springer, Berlin u.a.) 3., korr. Aufl. Ed pp XIV, 249 S.
107. Eckert WA & Kartenbeck Jr (1997) *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion* (Springer, Berlin u.a.) pp XV, 275 S.
108. Asaoka Y, Hatayama K, Ide T, Tsumoto K, & Tomita M (2013) The binding of soluble recombinant human Fcγ receptor I for human immunoglobulin G is conferred by its first and second extracellular domains. *Molecular immunology* 54(3-4):403-407.
109. DFL (2011) Total IgE-HRP EIA, Enzyme Immuno Assay for the quantitative determination of Total IgE in human Serum or Plasma. URL: http://www.fooke-labs.com/assets/gebrauchsanweisung_08102cp_totaligehrp_2011-04.pdf (Stand: 11.12.2016).
110. ThermoScientific, Testprinzip ImmunoCAP Specific IgE. URL: <http://www.phadia.com/de/4/Produkte/Tests/1/Testprinzip-ImmunoCAP-Specific-IgE/> (Stand: 11.12.2016).

111. ThermoScientific (2014) *ImmunoCAP Specific IgE. Gebrauchsanweisung.*
112. DFL (2015) Spezifisches IgE REAST, Reversed Enzyme Immuno Assay for the quantitative determination of specific IgE in human Serum or Plasma with biotinylated Allergens. URL: http://www.fooke-labs.com/assets/gebrauchsanweisung_0520960fl_0524800fl_2015_06.pdf (Stand 11.12.2016).
113. DFL (2015) ALFA Basis Set, Lateral Flow Assay for the qualitative determination of allergen specific IgE in human serum, plasma or whole blood. URL: http://www.fooke-labs.com/assets/gebrauchsanweisung_18xxxx_alfa_2015-06_de.pdf (Stand: 11.12.2016).
114. DFL (2011) ALFA (Allergy Lateral Flow Assay), Rapid test for the qualitative determination of sIgE in whole blood, serum or plasma. URL: http://www.fooke-labs.com/grobritannien-uk/assets/flyer_alfa_1800010_184000_email_2011-05_eng.pdf (Stand: 11.12.2016).
115. Maloney E (2003) Values of the Pearson Correlation (Dissertation).
116. McDonald JH (2009) *Handbook of Biological Statistics* (Sparky House Publishing) 2 Ed.
117. Bernard H, Creminon C, Yvon M, & Wal JM (1998) Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 115(3):235-244.
118. Spillner E, *et al.* (2012) Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals* 40(5):313-322.
119. Plum M, *et al.* (2013) Artificial Human Reference Sera established by CD64-IgE Fusion Proteins. in *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology Annual Congress (EAACI)* (Milano).
120. Radaev S & Sun P (2002) Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors. *Molecular immunology* 38(14):1073-1083.
121. Cervera L, Gutierrez S, Godia F, & Segura MM (2011) Optimization of HEK 293 cell growth by addition of non-animal derived components using design of experiments. *BMC Proc* 5 Suppl 8:P126.
122. Offermann N, *et al.* (2016) Human serum substitution by artificial sera of scalable allergen reactivity based on polyclonal antibodies and chimeras of human FcγRI and IgE domains. *Allergy* 71(12):1794-1799.
123. Bruhns P, *et al.* (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16):3716-3725.
124. Mancardi DA, *et al.* (2013) The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood* 121(9):1563-1573.
125. Paetz A, *et al.* (2005) Recombinant soluble human Fcγ receptor I with picomolar affinity for immunoglobulin G. *Biochem Biophys Res Commun* 338(4):1811-1817.
126. Bergmann-Leitner ES, *et al.* (2008) Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. *Malar J* 7:129.
127. Jefferis R & Lund J (2002) Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunology letters* 82(1-2):57-65.
128. Chiaro TR, Davis KW, Wilson A, Suh-Lailam B, & Tebo AE (2011) Significant differences in the analytic concordance between anti-dsDNA IgG antibody assays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus--implications for inter-laboratory testing. *Clin Chim Acta* 412(11-12):1076-1080.
129. Coico R & Sunshine G (2015) *Immunology: A Short Course* (Wiley).
130. Leenaars M & Hendriksen CF (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J* 46(3):269-279.

131. Svendsen Bollen L, Crowley A, Stodulski G, & Hau J (1996) Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of immunological methods* 191(2):113-120.
132. Hoffmann-Sommergruber K, *et al.* (1997) Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene* 197(1-2):91-100.
133. Harris JR & Markl J (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30(6):597-623.
134. Xu QH, *et al.* (2006) Influence of carrier proteins on the immunologic response to haptenic antitetradotoxin vaccine. *Bioconjug Chem* 17(6):1508-1513.
135. Mott PD & Wolff SM (1966) The association of fever and antibody response in rabbits immunized with human serum albumin. *J Clin Invest* 45(3):372-379.
136. Biau DJ, Jolles BM, & Porcher R (2010) P value and the theory of hypothesis testing: an explanation for new researchers. *Clin Orthop Relat Res* 468(3):885-892.
137. Sussman GL, Beezhold DH, & Kurup VP (2002) Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol* 110(2 Suppl):S33-39.
138. Radauer C, *et al.* (2014) Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy* 69(4):413-419.
139. Yeang HY, *et al.* (2006) Allergen concentration in natural rubber latex. *Clin Exp Allergy* 36(8):1078-1086.
140. Drew AC, *et al.* (2004) Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity. *Journal of immunology* 173(9):5872-5879.
141. Flinterman AE, Akkerdaas JH, Knulst AC, van Ree R, & Pasmans SG (2008) Hazelnut allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8(3):261-265.
142. Lauer I, *et al.* (2004) Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem J* 383(Pt 2):327-334.
143. Thomas WR, Smith WA, & Hales BJ (2004) The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J* 27(8):563-569.
144. Burazer L, *et al.* (2011) Impact of *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body raw material on house dust mite allergy diagnosis in a Serbian population. *Med Vet Entomol* 25(1):77-83.
145. Martins LM, *et al.* (2015) House-dust mite allergy: mapping of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens for dogs by two-dimensional immunoblotting. *Postepy Dermatol Alergol* 32(2):73-81.
146. Goodman RE (2016) WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee.
147. Eliasson M, Andersson R, Olsson A, Wigzell H, & Uhlen M (1989) Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *Journal of immunology* 142(2):575-581.
148. Wilson N, Simpson R, & Cooper-Liddell C (2009) Introductory glycosylation analysis using SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. *Methods Mol Biol* 534:205-212.
149. Lin CY, *et al.* (2015) Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PloS one* 10(4):e0123562.
150. Bandaranayake AD & Almo SC (2014) Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett* 588(2):253-260.
151. Schonheyder H & Andersen P (1984) Effects of bovine serum albumin on antibody determination by the enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of immunological methods* 72(1):251-259.

152. Yazdani Y, Mohammadi S, Yousefi M, & Shokri F (2015) Preliminary Assessment of Various Additives on the Specific Reactivity of Anti- rHBsAg Monoclonal Antibodies. *Avicenna J Med Biotechnol* 7(4):145-150.
153. Kahlert H, *et al.* (2008) Characterization of a hypoallergenic recombinant Bet v 1 variant as a candidate for allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 145(3):193-206.
154. Mogensen JE, Wimmer R, Larsen JN, Spangfort MD, & Otzen DE (2002) The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *The Journal of biological chemistry* 277(26):23684-23692.
155. Gergely J & Sarmay G (1990) The two binding-site models of human IgG binding Fc gamma receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4(15):3275-3283.
156. Wines BD, Powell MS, Parren PW, Barnes N, & Hogarth PM (2000) The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc gamma RI and Fc gamma RIIa bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein A. *Journal of immunology* 164(10):5313-5318.
157. Chowdhury PS, Gallo M, & Pastan I (2001) Generation of high titer antisera in rabbits by DNA immunization. *Journal of immunological methods* 249(1-2):147-154.
158. Sun B, Mahler, M., Mei, J., Jing, L., Zhong, N. (2008) Allergen-specific IgE to inhalant and food allergens and total IgE values in China – Comparison between two commercial immunoassays: Dr. Fooke ALLERG-O-LIQ versus Phadia ImmunoCAP® System. *Invest All Clin Immunol* 18:319-321.
159. Sidenius KE, Hallas TE, Poulsen LK, & Mosbech H (2001) Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. *Allergy* 56(8):723-733.
160. Hecker J, *et al.* (2012) An IgE epitope of Bet v 1 and fagales PR10 proteins as defined by a human monoclonal IgE. *Allergy* 67(12):1530-1537.
161. Mita H, Yasueda H, & Akiyama K (2000) Affinity of IgE antibody to antigen influences allergen-induced histamine release. *Clin Exp Allergy* 30(11):1583-1589.
162. Pierson-Mullany LK, Jackola DR, Blumenthal MN, & Rosenberg A (2000) Characterization of polyclonal allergen-specific IgE responses by affinity distributions. *Molecular immunology* 37(10):613-620.
163. Kim K-E, Rosenberg A, Roberts S, & Blumenthal MN (1996) The affinity of allergen specific IgE and the competition between IgE and IgG for the allergen in Amb a V sensitive individuals. *Molecular immunology* 33(10):873-880.
164. Fromberg J (2006) IgE as a marker in allergy and the role of IgE affinity. *Allergy* 61(10):1234-1234.
165. Holle JU, Hellmich B, Backes M, Gross WL, & Csernok E (2005) Variations in performance characteristics of commercial enzyme immunoassay kits for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies: what is the optimal cut off? *Annals of the rheumatic diseases* 64(12):1773-1779.
166. Offermann N, Conrad K, Fritzler MJ, & Fooke Achterrath M (2014) Development and validation of a lateral flow assay (LFA) for the determination of IgG-antibodies to Pr3 (cANCA) and MPO (pANCA). *Journal of immunological methods* 403(1-2):1-6.
167. Kuhl A, *et al.* (2010) Mapping of conformational epitopes on human proteinase 3, the autoantigen of Wegener's granulomatosis. *Journal of immunology* 185(1):387-399.

9 Anhang

9.1 Gefahrstoffe nach GHS

Folgende Chemikalien sind gemäß des globalen harmonisierten Systems (*Globally Harmonized System*, GHS) als Gefahrstoff zu kennzeichnen:

Chemikalie	GHS-Gefahrstoffkennzeichnung	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
2(β)-Mercaptoethanol	GHS05, GHS06, GHS08, GHS09	Gefahr	H301 + H331-H310-H315-H317-H318-H373-H410	P261-P280-P301 + P310 + P330-P302 + P352 + P310-P305 + P351 + P338 + P310-P403 + P233
4-Chlormercuribenzoessäure	GHS06, GHS08, GHS09	Gefahr	H300 + H310 + H330-H373-H410	P260-P262-P280-P302 + P352 + P310-P304 + P340 + P310
Ampicillin	GHS07, GHS08	Gefahr	H315-H317-H319-H334-H335	P261-P280-P305 + P351 + P338-P342 + P311
CP buffer (Cycle-Pure Kit)	GHS02, GHS05, GHS07	Gefahr	H225, H302 + H312 + H332, H314, H336, H412	P101, P102, P103, P210, P241, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338, P405, P501
Diethanolamin	GHS05, GHS07, GHS08	Gefahr	H302-H315-H318-H373-H412	P260-P280-P301 + P312 + P330-P305 + P351 + P338 + P310
Essigsäure	GHS02, GHS05	-	H226, H290, H314	P210, P280, P301 + P330 + P331, P305 + P351 + P338, P308 + P310
Ethanol	GHS02, GHS07	Gefahr	H225, H319	P210, P233, P305 + P351 + P338
Ethylendiamintetraessigsäure	GHS07	Achtung	H319	P305 + P351 + P338
Binding buffer (Gel Extraction Kit)	GHS05, GHS07	Gefahr	H302 + H312 + H332, H314, H412	P101, P102, P103, P260, P280, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338, P405, P501
Imidazol	GHS05, GHS07, GHS08	Gefahr	H302-H314-H360D	P280-P301 + P310-P305 + P351 + P338
Isopropanol	GHS02, GHS07	Gefahr	H225, H319, H336	P210, P240, P305 + P351 + P338, P403 + P233
Lithiumchlorid	GHS07	Achtung	H302, H315, H319	P280, P302 + P352 P305 + P351 + P338
Meliseptol®, New Formula	GHS02	Achtung	H226	P210, P233, P261, P280
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	Gefahr	H225, H301 + H311 + H331, H370	P210, P240, P280, P302 + P352, P304 + P340, P308 + P310, P403 + P233
Natriumazid	GHS06, GHS09	Gefahr	H300, H410, EUH032	P273, P308 + P310
Natriumdodecylsulfat	GHS02, GHS06	Gefahr	H228, H302, H311, H315, H319, H335	P210, P280, P301 + P312, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338
Natriumhydroxid pellets	GHS05	Gefahr	H290, H314	P260, P280
Penicillin/Streptomycin-Lösung	GHS08	Gefahr	H317, H334, H361	P302 + P352, P304 + P340, P201, P260, P333 + P313, P261
Roti-Blot A	GHS07	Achtung	H315, H319	P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338

Anhang

Salzsäure [25 %] (pA)	GHS05, GHS07	Gefahr	H290, H314, H335	P280, P303 + P361 + P353, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P310
Silver Staining Kit	GHS07, GHS08	Gefahr	H319, H360	P201, P202, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313, P308 + P313
Thimerosal	GHS06, GHS08, GHS09	Gefahr	H300 + H310 + H330, H373, H410	P260, P273, P280, P301 + P310 + P330, P302 + P352 + P310, P304 + P340 + P310
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	GHS07	Gefahr	H315-H319	P280-P302 + P352-P305 + P351 + P338-P332 + P313
Trypanblau-Lösung	GHS07	Gefahr	H350	P201, P308 + P313
Zeocin™ Selection Reagent	GHS07, GHS08	Achtung	H302-H341	P301 + P312, P201, P264, P330, P308 + P313, P270

9.2 Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich bei der Umsetzung dieser Arbeit und darüber hinaus unterstützt haben.

Ermöglicht wurde mir diese Arbeit durch die Firma Dr. Fooke-Achterrath Laboratorien GmbH. Frau Dr. Margrit Fooke, der Leiterin des Unternehmens, spreche ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die stete fachliche und moralische Unterstützung meinen herzlichsten Dank aus.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Edzard Spillner, der diese Arbeit mit zahlreichen Fachgesprächen und wertvollen, richtungsweisenden Ratschlägen betreute. Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation sowie Herrn Prof. Dr. Markus Fischer, Frau Dr. Angelika Paschke-Kratzin und Herr Dr. Thomas Hackl für die Begutachtung der Disputation. Ebenso möchte ich Frau Dr. Melanie Plum danken, die mir bei Problemen und Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Dr. Fooke-Achterrath Laboratorien GmbH, die mir bei der Durchführung der Arbeit immer zur Seite standen. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Uschi Hübner für die fachliche und moralische Unterstützung sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Volker Biermann für die Durchsicht dieser Arbeit.

Meiner Familie und meinem Lebensgefährten, Kai Zimmermann, möchte ich an dieser Stelle besonders herzlich für die moralische Unterstützung und ihr Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

10 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

(Ort, Datum, Unterschrift)