

Aus dem Institut für Ernährungsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Sina

**Allergenspezifische Immuntherapie (SIT)
induziert sialylierte immunsuppressive
IgG-Antikörper**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Juliane Hobusch
aus Berlin

Lübeck, 17. Januar 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers

2. Berichterstatter: Prof. Tamas Laskay, PhD

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Duden

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2017

*„The conception that antibodies, which should protect against disease,
are also responsible for disease, sounds at first absurd.“*

Clemens von Pirquet (1906)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	3
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	3
1.2 Allergische Erkrankungen	4
1.2.1 Birkenpollenallergie	4
1.2.2 Pathophysiologie einer Typ-1-Allergie (Soforttyp)	4
1.2.3 Spezifische Immuntherapie	6
1.3 Immunglobuline	8
1.3.1 Struktur von Immunglobulinen	8
1.3.2 Immunglobulin G	9
1.3.3 IgG Fc-Glykosylierung	10
1.4 Zielstellung	14
2 Material	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Puffer und Lösungen	16
2.3 Antikörper	17
2.4 Verbrauchsmaterialien	17
2.5 Geräte	18
2.6 Software	18
3 Methoden	19
3.1 Spezifische Immuntherapie	19
3.1.1 Patienten	19
3.1.2 Studiendesign	19
3.1.3 Klinische Evaluation	20
3.1.4 Plasmagewinnung	21
3.2 Immunglobulinserologie mittels ELISA	21
3.3 Glykananalyse von Bet v 1 spezifischen IgG	22
3.3.1 Aufreinigung von IgG über Protein G Sepharose	22
3.3.2 Kopplung von Antigen an Sepharosematrix	22
3.3.3 Aufreinigung Bet v 1-spezifischer IgG-Ak	22
3.3.4 Enzymatische Deglycosylierung des IgG-Fc N-Glykane	22
3.3.5 Enzymatische Modifikation von IgG	23
3.3.6 Glykan-Analyse	23
3.4 Neutrophile Granulozyten	23
3.4.1 Aufreinigung von Neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut	23

3.4.2	Präparation von immobilisierten Immunkomplexen	24
3.4.3	Detektion von Reaktiven Sauerstoffspezies	25
3.5	Statistische Analysen	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Wirkung der spezifischen Immuntherapie (SIT) auf Birkenpollenallergiker	26
4.1.1	Klinische Parameter	26
4.1.2	Veränderung der Bet v 1-spezifischen Antikörpertiter im Verlauf der SIT	28
4.2	Aufreinigung von Bet v 1-spezifischem IgG	30
4.3	Glykoanalyse der Bet v 1-spezifischen IgG	32
4.4	Glykosylierung der SIT-IgG beeinflussen die ROS-Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten	34
5	Diskussion	38
5.1	IgE und IgG Subklasse Antikörperantworten in unbehandelten und SIT-behandelten Patienten	38
5.2	Einfluss der SIT auf die Glykosylierung der Antigenspezifischen IgG	39
5.3	Einfluss der Sialylierung auf die Aktivität von Effektorzellen	41
5.4	Fazit und Ausblick	43
	Literatur	X
	Abbildungen und Tabellen	XI
	Abkürzungsverzeichnis	XII
	Anhang	XIV
	Danksagung	XVII

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten stieg die Inzidenz allergischer Erkrankungen, besonders in industrialisierten Ländern, deutlich an. Die Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber Aeroallergenen wie Pollen, Tierhaarepithelien und Hausstaubmilben manifestiert sich über die Produktion Allergen-spezifischer IgE-Antikörper (Ak). Diese können bei erneutem Allergenkontakt eine Aktivierung von Mastzellen und anderen Effektorzellen auslösen, welche Symptome wie allergische Rhinitis (Heuschnupfen) und Asthma bronchiale verursachen. Derzeit stellt die Spezifische Immuntherapie (SIT) die einzige Behandlungsoption dar, mit der die Immunantwort nachhaltig moduliert wird. Der Wirkmechanismus der SIT ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es wurde gezeigt, dass durch eine SIT die Produktion von Allergen-spezifischen IgG-Ak induziert wird. Es wird angenommen, dass diese IgG-Ak eine blockierende Wirkung auf die IgE-vermittelte Inflammation besitzen. Jedoch besteht bei hoher Antigenosis die Gefahr einer IgG-vermittelten Anaphylaxie.

Die N-Glykosylierung im Fc-Teil von IgG-Ak determiniert dessen inflammatorisches Potential. Agalakotosylierte (nicht-galaktosylierte und nicht-sialylierte) IgG-Ak werden mit inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht. Galaktosylierte und zusätzlich terminal sialylierte IgG-Ak werden hingegen als essentiell für die anti-inflammatorische Wirkung des intravenösen IgG (IVIg, gepooltes Serum-IgG von gesunden Spendern zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen) beschrieben. Die Glykosylierung wird durch das vorherrschende Milieu, z.B. durch verschiedene Adjuvantien, bei Antigenkontakt bestimmt. Bisher ist noch nicht bekannt, wie sich die Fc-Glykosylierung von allergenspezifischen IgG-Ak im Verlaufe einer SIT und im Vergleich zu unbehandelten Patienten verändert und welchen Einfluss sie auf die Effektorzellen der allergischen Reaktion hat.

In dieser Arbeit wurde eine Kohorte gut charakterisierter Birkenpollenallergiker untersucht, welche eine konventionelle dreijährige SIT mit Alum als Adjuvants erhalten haben. Im Vergleich dazu wurden unbehandelte Patienten analysiert. Aus dem Serum bzw. Plasma dieser Patienten wurde Bet v 1 (Hauptallergen der Birke)-spezifisches IgG-Ak aufgereinigt, deren Fc-Glykan mit Endoglykosidase S enzymatisch abgespalten und mittels HPLC analysiert. Abschließend wurde der Einfluss der Glykosylierung von Bet v 1-spezifischen IgG-Ak auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass das Bet v 1-spezifische IgG-Ak von unbehandelten Birkenpollenallergikern bereits einen hohen Anteil an sialylierten IgG, vergleichbar mit IVIg, aufweisen. Im Verlaufe der SIT steigt der Serumtiter an Bet v 1-spezifischem IgG, besonders IgG1 und IgG4. Diese während der SIT produzierten IgG-Ak sind ebenfalls zu einem hohen Prozentsatz sialyliert, was über den Verlauf der SIT konstant bleibt. In einem Assay zur Neutrophilenaktivierung wurde gezeigt, dass *in vitro*-desialyliertes Bet v 1-spezifisches Patienten-IgG ein signifikant erhöhtes Potential zur Neutrophilenaktivierung aufwies als die native Form derselben Antikörper.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine SIT sialylierte IgG-Ak induzieren sollte, damit die Gefahr einer IgG-vermittelten Anaphylaxie minimiert wird. Derzeit werden zahlreiche neue SIT-Protokolle mit unterschiedlichen Adjuvantien erprobt. Die hier dargestellten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass in Zukunft die Glykosylierung der induzierten IgG-Antikörper verifiziert werden sollte, um die Gefahr einer IgG-vermittelten Anaphylaxie zu minimieren.

Abstract

The incidence of allergic reactions showed an alarming increase in the last decades. Sensitivity against air-bourne allergens like pollen, animal dander and house dust mite leads to the production of allergen specific IgE antibodies (Abs). Upon second allergen contact these Abs activate mast cells, basophils and other effector cells resulting in symptoms like rhinoconjunctivitis and bronchial asthma.

The only treatment option currently available is the Specific Immunotherapy (SIT) which leads to a sustained modulation of the immune response. The SIT mechanism is not yet fully understood. However, it has been shown that SIT induces the production of allergen specific IgG Abs, mainly IgG1 and IgG4. These IgGs have been discussed as blocking Abs to the IgE-mediated inflammation. Yet, high titers of allergen specific IgG might lead to IgG-mediated anaphylactic reactions.

It has been shown that the pro- or anti-inflammatory potential of IgG Abs is determined by the Fc N-glycosylation. IgG Abs lacking terminal galactosylation and sialylation are connected to inflammatory diseases like rheumatoid arthritis. In contrast, terminal sialylation is essential for the anti-inflammatory activity of intravenous IgG (IVIg). The glycosylation of IgG differs with the pre-dominant milieu, e.g. with different adjuvants along with the antigen presentation. To date, it is not known how the Fc glycosylation of allergen specific IgG develops in the course of a SIT as well as in comparison to untreated patients. Furthermore, it is not known whether the glycosylation influences effector cells of allergic reactions.

In this study, a cohort of well-characterized birch pollen allergy patients, who recieved three years of SIT, as well as untreated allergy patients, were analyzed. Bet v 1 (major birch pollen allergen)-specific IgG was purified from patient serum or plasma, glycans were enzymatically cleaved by endoglycosidase S and analyzed via HPLC. In the next step the influence of the glycosylation of Bet v 1-specific IgG Abs on the activation of neutrophil granulocytes was analysed. It could be shown that even Bet v 1-specific IgG Abs of untreated birch pollen patient contain a high percentage of sialylated IgG Abs which is comparable with IVIg. During SIT Bet v 1-specific IgG Abs, especially IgG1 and IgG4 are elevated. These Abs produced in the course of SIT also show a high content of sialylation which remains stable during SIT. *In vitro* desialylated Bet v 1-specific patient IgG showed a significantly increased potential to activate neutrophil granulocytes compared to the native variant of the same antibodies.

These observations show the importance of Fc-Glycosylation of allergen specific IgG for the tolerance induction by SIT. This suggests that adjuvants used to promote IgG production during allergen-specific immunotherapy (SIT), especially novel therapy forms, should be selected for their ability to induce sialylated IgG Abs. Otherwise tolerance induction might turn into activation of an inflammatory immune response or even anaphylaxis.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Täglich wird unser Organismus mit einer Vielzahl von Pathogenen und Fremdstoffen konfrontiert. Unserem Immunsystem ist es zu verdanken, dass Infektionen zu einem großen Teil beseitigt werden, oft ohne, dass wir es bemerken. Dabei ist es essentiell, dass das Immunsystem zwischen pathogenen und harmlosen Strukturen unterscheiden kann.

Das Immunsystem besteht aus zellulären und humoralen Komponenten. Die Zellen des Immunsystems entstehen durch die Hematopoese, welche im Knochenmark stattfindet. Man unterscheidet zwischen Zellen der myeloiden Linie, aus denen sich die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems entwickeln, und der lymphoiden Linie, aus denen die Zellen des adaptiven Immunsystems differenzieren (1).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Bereits Minuten nach einer Infektion mit Pathogenen werden die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiv. Sie sorgen je nach Erreger und Pathogenlast für eine Auflösung oder, falls dies nicht möglich ist, für eine Eindämmung der Infektion. Die Effektorzellen und -mechanismen der angeborenen Immunität wirken unspezifisch durch die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP, *Pathogen-associated molecular pattern*), wie z.B. Zellwandstrukturen von Bakterien oder Nukleinsäuren von Viren (1).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem basiert das adaptive Immunsystem auf einem umfangreichen Spektrum an Rezeptoren, die durch somatische Mechanismen während der Ontogenese entstehen. T- und B-Lymphozyten exprimieren ein breites Repertoire an Rezeptoren mit zufälligen Spezifitäten gegen die verschiedensten Strukturen. T- und B-Zellen mit Rezeptoren, die körpereigene Strukturen erkennen, werden während der Ontogenese eliminiert.

T-Zellen unterscheidet man in CD8⁺ zytotoxische und CD4⁺ T-Helferzellen, die über verschiedene Formen der Antigenpräsentation stimuliert werden. Intrazellulär infizierte Zellen präsentieren Peptide aus dem Zytoplasma über Haupthistokompatibilitatskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese werden durch den T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*) auf zytotoxischen CD8⁺ Zellen mit der entsprechenden Spezifität erkannt, was zur Aktivierung der Zelle und anschließender Freisetzung von zytotoxischen Substanzen führt. Extrazelluläre Antigen werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs, *antigen-presenting cells*) wie dendritische Zellen (DCs, *dendritic cells*) aufgenommen, prozessiert und die resultierenden Peptide über MHC Klasse II Moleküle präsentiert. Die Peptide werden von TCR auf naiven CD4⁺ T-Zellen mit der entsprechenden Spezifität erkannt. Diese differenzieren abhängig von kostimulatorischen Signalen in verschiedene T-Helferzellen (regulatorische T-Zellen, T_H1, T_H2 oder T_H17 etc.). Treffen diese Antigen-spezifischen T-Helferzellen auf eine B-Zelle mit einem B-Zell-Rezeptor (BCR,

B cell receptor) gleicher Spezifität so wird über T-Zell-vermittelte Zytokine die Proliferation der B-Zellen sowie die Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen bzw. Gedächtnis-B-Zellen induziert. Unter physiologischen Bedingungen richten sich diese spezifischen Zellantworten gegen pathogene Strukturen. Jedoch können auch ungewollte Reaktionen, entweder gegen körpereigene Strukturen (Autoimmunität) oder gegen harmlose Umweltantigene (Allergien) auftreten (1).

1.2 Allergische Erkrankungen

Der erstmals von Clemens von Pirquet verwendete Begriff „Allergie“ beschreibt eine Erkrankung, bei der normalerweise harmlose Substanzen (Allergene) vom Immunsystem als immunogen und potentiell gefährlich eingestuft und bekämpft werden (2). In entwickelten Ländern wird eine stetig steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen registriert. Sie beinhalten allergische Rhinitis (Heuschnupfen), atopische Dermatitis (Ekzeme), allergisches oder atopisches Asthma und Nahrungsmittelallergien. Bei einigen Patienten kommt es bereits wenige Minuten nach Allergenkontakt zu fatalen systemischen Reaktionen (Anaphylaxien) (3).

1.2.1 Birkenpollenallergie

Die Prävalenz von Pollenallergien allgemein wird in Europa auf bis zu 40 % geschätzt, abhängig vom jeweiligen Land (4). Allergien gegen die Pollen der Hänge-Birke (*Betula pendula*, auch *B. verrucosa*) machen einen beträchtlichen Teil der Pollenallergien aus. In Deutschland zeigt etwa 16 % der Bevölkerung eine Sensibilisierung gegen Birkenpollen, vergleichbar mit anderen mitteleuropäischen Ländern (5).

Birkenpollen enthalten mehrere Allergene, von denen Bet v 1 das Hauptallergen darstellt (6; 7). Dieses Protein aus der Gruppe PR (*pathogenesis related*)-10 Proteinklasse besteht aus 159 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 17kDa und weist enzymatische Aktivität auf (8). Seine dreidimensionale Struktur besteht aus drei α -Helices, welche in ein antiparalleles β -Faltblatt aus sieben β -Strängen eingebettet ist (9). Etwa 96 % der Birkenpollenallergiker produzieren IgE-Antikörper gegen Bet v 1 (7). Patienten mit Birkenpollenallergie entwickeln des Weiteren häufig ein orales Allergiesyndrom durch eine IgE-vermittelte Kreuzreaktion mit Hauptallergenen aus Äpfeln, Soja, Birnen, Kirschen und Aprikosen (10).

1.2.2 Pathophysiologie einer Typ-1-Allergie (Soforttyp)

Die in dieser Arbeit untersuchte Birkenpollenallergie gehört zu den Typ-1-Sofortreaktionen. Bei diesem Allergietyp reagiert das Immunsystem empfindlich auf harmlose Umweltantigene wie Pollen, Tierhaare, Hausstaub, Insektengifte oder Arzneimittel. Charakteristisch für diese Allergieform ist die Produktion Allergen-spezifischer IgE-Antikörper während der Sensibilisierung. Bei erneutem Allergenkontakt kommt es nach wenigen Minuten zu einer allergischen Reaktion, welche zu Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, Urtikaria, Erbrechen und/oder Diarrhoe führen kann (11).

In den letzten Jahrzehnten kam es in den Industriestaaten zu einer Zunahme der Prävalenz von Typ-1-Allergien. Mittlerweile leiden 25 % der Bevölkerung in den meisten Industriestaaten an einer solchen Allergie (5; 11).

Allergene gelangen über unterschiedliche Wege in unseren Organismus, z.B. über die Atemwege, den Darm, Schleimhäute, verletzte Haut, Insektenstiche oder als Medikament. Normalerweise führt dies zur Bildung von regulatorischen T-Zellen und zu einer Toleranzinduktion. Bei Allergikern kommt es bei Allergenkontakt jedoch zur Sensibilisierung (Abb. 1). Was genau eine Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Antigen auslöst ist bisher noch unklar.

Die Präsentation des Allergens durch APCs führt zu einer disregulierten T_H2 -Polarisierung. Die resultierende Produktion von T_H2 Zytokinen wie Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-13 führt zu einem Klassenwechsel zu ϵ -Immunglobulinen und somit zur Entstehung IgE-produzierender B-Zellen. Das IgE bindet an den hochaffinen Fc ϵ Rezeptor I (Fc ϵ RI) auf Mastzellen und Basophilen, was zu einer Sensitivierung dieser Effektorzellen führt (5; 11).

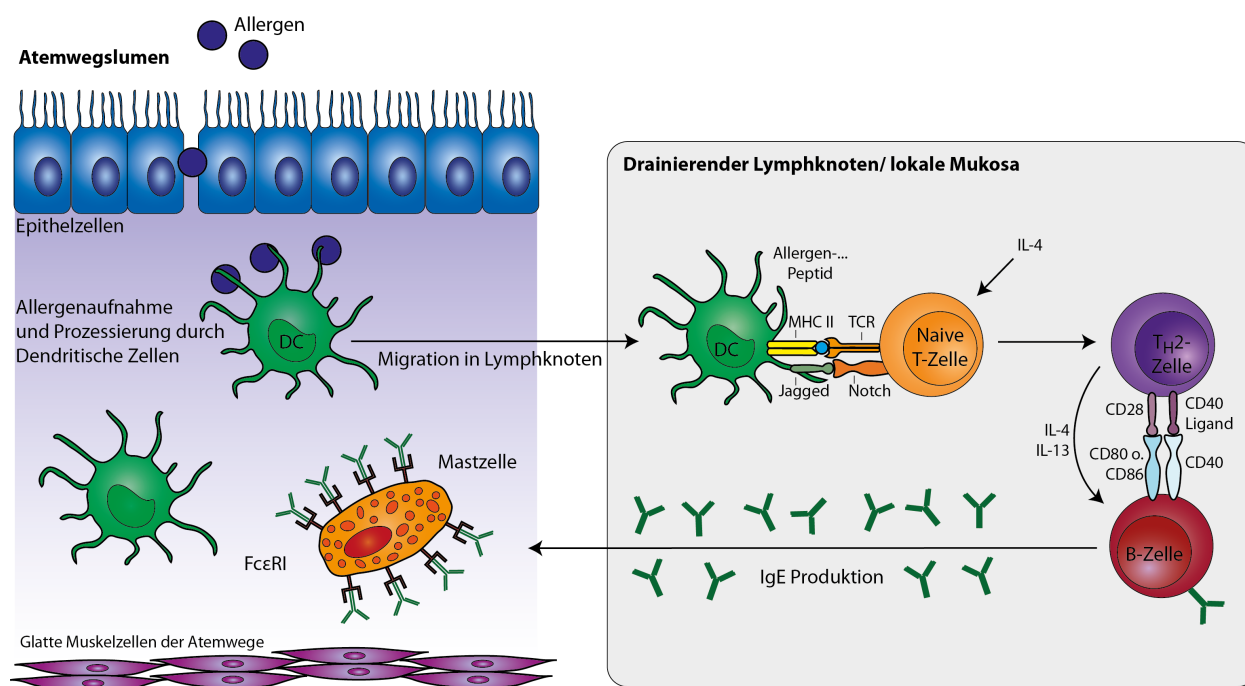


Abbildung 1: Sensibilisierungsphase einer allergischen Erkrankung in den Atemwegen. Über die Atemwege aufgenommenes Allergen passiert das Lungenepithel und wird von gewebständigen Dendritischen Zellen (DCs) abgefangen, und prozessiert. Nach Migration in den drainierenden Lymphknoten präsentiert die DC Allergenpeptide, welche durch naive T-Zellen erkannt werden, die anschließend in T_H2 -Zellen differenzieren und B-Zellen zur Produktion von Allergen-spezifischem IgE stimulieren. Dieses wird vom hochaffinen Fc ϵ -Rezeptor I (Fc ϵ RI) auf gewebständigen Mastzellen gebunden. Modifiziert nach (11).

Bei einem erneuten Allergenkontakt werden die Mastzellen durch die Kreuzvernetzung von IgE-Fc ϵ RI-Komplexen aktiviert, was zur Freisetzung vorgefertigter Mediatoren und zu einem Anstieg der Zytokin- und Chemokinproduktion führt (Abb. 2). Die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotrein B4 (LTB₄) resultiert in Brochokonstriktion, Vasodilatation, erhöhter Gefäßpermeabilität und erhöhter Mukusproduktion.

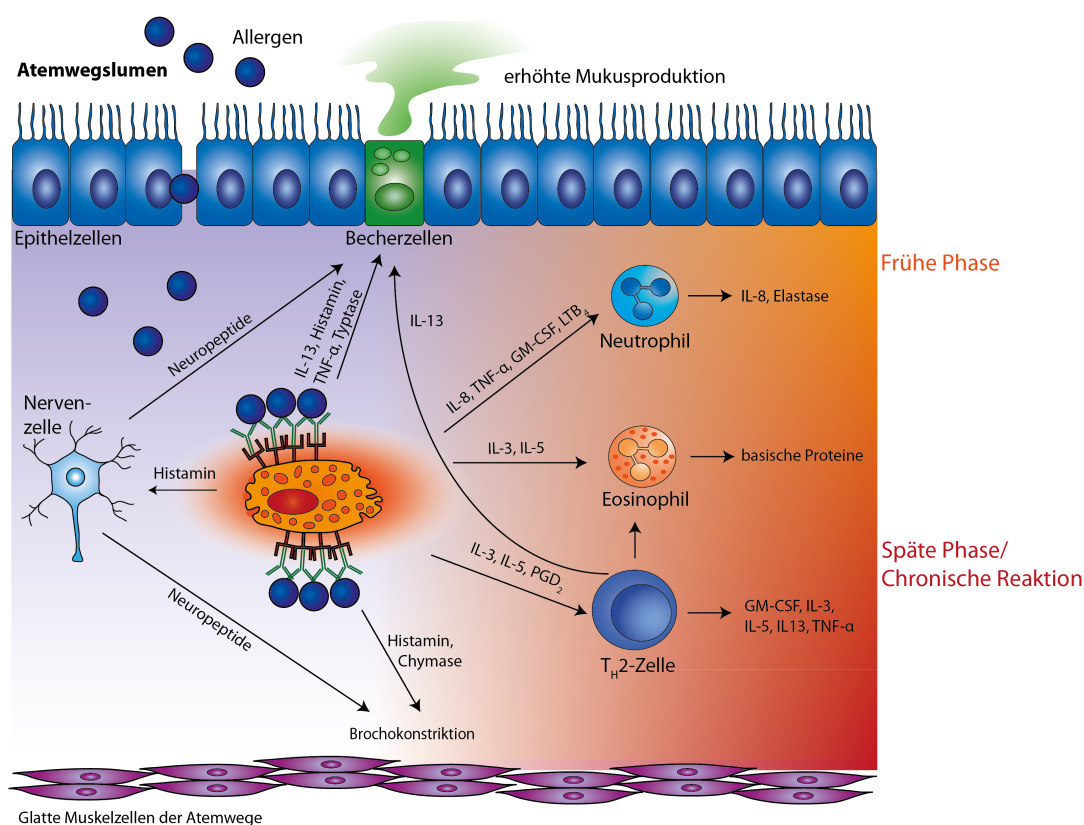


Abbildung 2: Effektorphase einer allergischen Erkrankung. Erneuter Allergenkontakt führt zur Degranulierung von sensibilisierten Mastzellen. Freigesetzte Entzündungsmediatoren vermitteln die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen (Eosinophile, Neutrophile, T_H2-Zellen), sowie einer erhöhten Mukusproduktion, Vasodilatation und Bronchokonstriktion. Modifiziert nach (11; 12)

Weiterhin werden in der späten Phase der allergischen Reaktion durch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wie Tumor-Nekrose Faktor (TNF)- α , Interleukin(IL)-8 und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) andere Immunzellen (T-Zellen, Eosinophile, Neutrophile) aus dem Blutstrom rekrutiert und aktiviert (11; 13).

1.2.3 Spezifische Immuntherapie

Die subkutane Spezifische Immuntherapie (SIT) zur Behandlung von Allergien wurde erstmalig 1911 von Noon und Freeman angewandt (14; 15). Sie ist bis dato die einzige ursächliche Behandlungsoption gegen allergische Erkrankungen, die die Immunantwort des Patienten moduliert und eine langfristige periphere Toleranz gegen das Antigen induziert (16). Weiterhin wird durch eine SIT das Risiko der Entwicklung von Asthma bei Rhinitis-Patienten und die Sensibilisierung gegen weitere Antigene bei monosensitiven Individuen reduziert (17; 18). Obwohl die Mechanismen noch nicht vollständig untersucht sind, ist bekannt dass eine SIT das Immunsystem vielschichtig moduliert: Die Therapie führt zu einer Verringerung der Aktivierung und Degranulierung, sowie einer Reduktion der Anzahl von Mastzellen und Basophilen im Gewebe. Des Weiteren werden Antigen-spezifische regulatorische T- und B-Zellen induziert, was im weiteren Verlauf zu einer Modulation der Antikörperantwort von IgE weg in Richtung IgG4 führt (Abb. 3)(19).

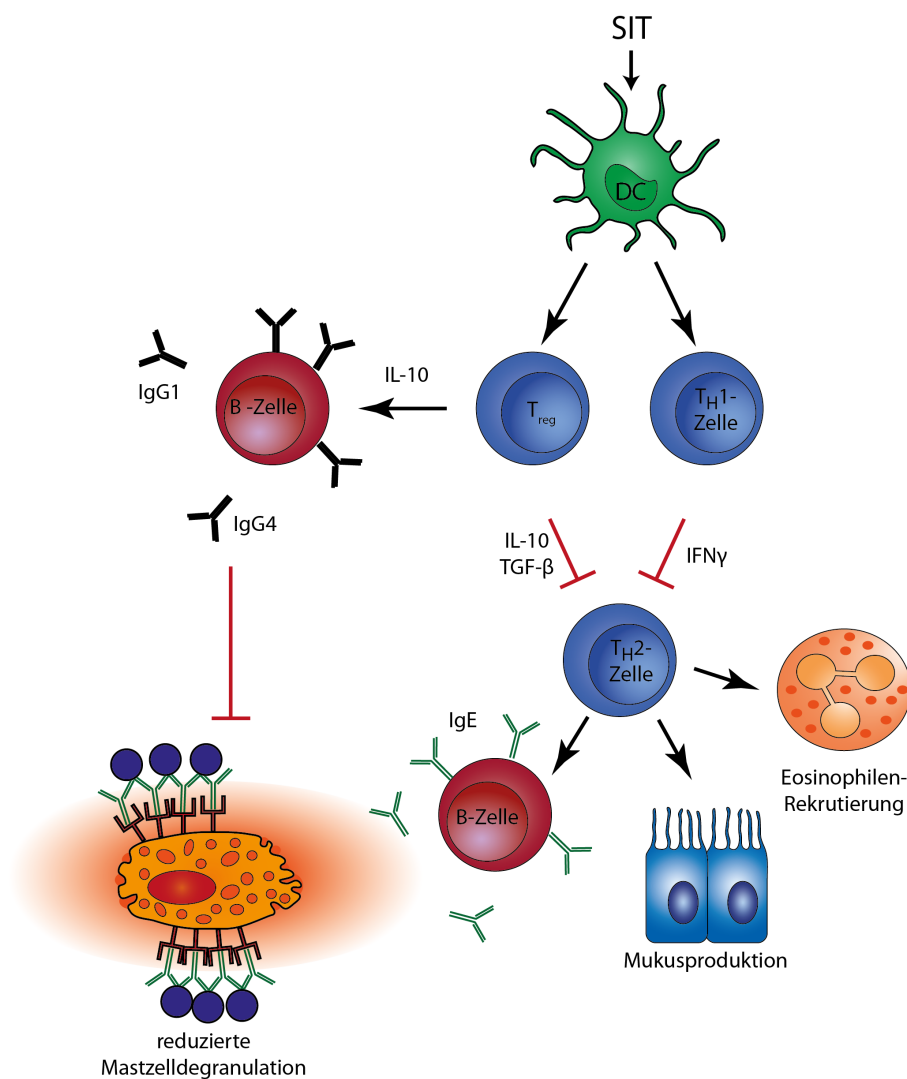


Abbildung 3: Mechanismus der Spezifischen Immuntherapie. Allergenkontakt unter Toleranzbedingungen führen zu einer Induktion von regulatorischen T- und B-Zellen welche über IL-10 und TGF- β die T_H2-vermittelte allergische Inflammation inhibieren, sowie die Produktion von Allergen-spezifischen IgG induzieren. Modifiziert nach (20)

Trotz noch hoher IgE-Titer führt die SIT bereits zu Beginn zu einer verringerten Degranulierung von Mastzellen und Basophilen, was auf eine generelle Desensibilisierung dieser Zellen hinweist (21). Es wurde auch gezeigt, dass IL-10 inhibierend auf die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung, sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wirkt (22).

Weiterhin wurde eine Verringerung der Basophilenaktivität und IgE-vermittelter Degranulierung dem Rückgang der Allergiesymptomatik in Verbindung gebracht und wurde kürzlich als möglicher Biomarker für die Toleranzentwicklung durch eine SIT diskutiert (23; 24; 25). Nach einigen Monaten nach Beginn der Therapie kommt es zudem zu einer Reduktion der gewebständigen Mastzellen und Eosinophilen, welche in einer verringerten Hautreaktivität auf des Allergen resultiert (26).

Es wird vermutet, dass eine SIT das Verhältnis der Allergen-spezifischen T-Zellen von einer CD4⁺ T-Helferzell (T_H)2-dominierten zu einer T_H1-dominierten Immunantwort verschiebt, sowie die Bildung von IL-10-produzierenden regulatorischen T- und B-Zellen induziert (13; 19; 26; 27; 28). Anhand einer gut charakterisierten SIT-Studie, deren Proben auch in der vorliegenden Arbeit ver-

wendet wurden, wurde gezeigt, dass im ersten Jahr einer SIT eine transiente Induktion von IL-10-produzierenden Allergen-spezifischen regulatorischen T-Zellen (T_{R1}) hervorgerufen wird (28; 29). Die Produktion von IL-10 durch regulatorische T- und B-Zellen führt zu einem Klassenwechsel von IgE zu IgG4 (30; 31; 32), der Titer an Allergen-spezifischem IgG4 steigt hierbei um das 10 bis 100-fache (13; 19; 26; 33). Diese IgG4 können die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung und die daraus resultierende Histaminausschüttung inhibieren; zum Einen über Antigenmaskierung und zum Anderen durch Kreuzvernetzung des inhibitorischen IgG-Rezeptor $Fc\gamma RIIb$ mit $Fc\epsilon RI$ (25; 34; 35; 36; 37; 38).

1.3 Immunglobuline

Zur effektiven Verteidigung gegen eine große Bandbreite von Pathogenen entwickelten sich die T- und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, welche spezifisch auf eine Vielzahl von Antigenen reagieren. T-Zellen erkennen Antigene als Peptide über ihren TCR. B-Zellen erkennen das Antigen über ihren BCR, welcher aus einem membrangebundenen Immunglobulin besteht. Des Weiteren werden Immunglobuline der gleichen Spezifität von terminal differenzierten B-Zellen (Plasmazellen) als Antikörper sekretiert. Jede B-Zelle produziert nur eine einzige Spezifität an Immunglobulinen. Die Bindung der Antikörper an ihr spezifisches Antigen erfolgt über nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie elektrostatische Anziehung, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte (1).

1.3.1 Struktur von Immunglobulinen

Das Immunglobulin(Ig)-Molekül wird in eine variable (V-) Region und in eine konstante (C-) Region unterteilt. Die V-Region bildet die Antigen-bindende Einheit des Ig. Die Variabilität in dieser Region erlaubt den unterschiedlichen Antikörpern an verschiedene spezifische Antigene zu binden. Im Gegensatz dazu besitzt die C-Region eine stark konservierte Struktur, welche für die Interaktion mit Effektormolekülen, wie Rezeptoren auf Immunzellen, zuständig ist. Aufgrund der C-Region werden fünf Klassen von Immunglobulinen unterschieden: IgM, IgD, IgG (1-4), IgA (1-2) und IgE. Die allgemeine Struktur von Antikörpern wird hier beispielhaft am IgG erläutert.

IgG besteht, ähnlich wie die anderen Immunglobuline, aus vier Polypeptidketten, darunter je zwei identische γ schwere Ketten (HC, *heavy chain*, 50 kDa) und zwei κ oder λ leichte Ketten (LC, *light chain*, 25 kDa), welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede schwere Kette besteht aus einer N-Terminalen variablen Domäne (VH) und drei konstanten Domänen (CH₁, CH₂, CH₃). Die leichten Ketten besitzen je eine variable (VL) und eine konstante Domäne (CL). Da beide schweren bzw. leichten Ketten jeweils identisch sind, besitzt das Immunglobulin zwei variable Regionen mit derselben Spezifität. Weiterhin wird das Immunglobulinmolekül in das Antigen-bindende Fab-Fragment (LC+VC,CH₁) sowie in das Rezeptor-bindende Fc-Fragment (CH₂, CH₃) unterteilt (Abb. 4)

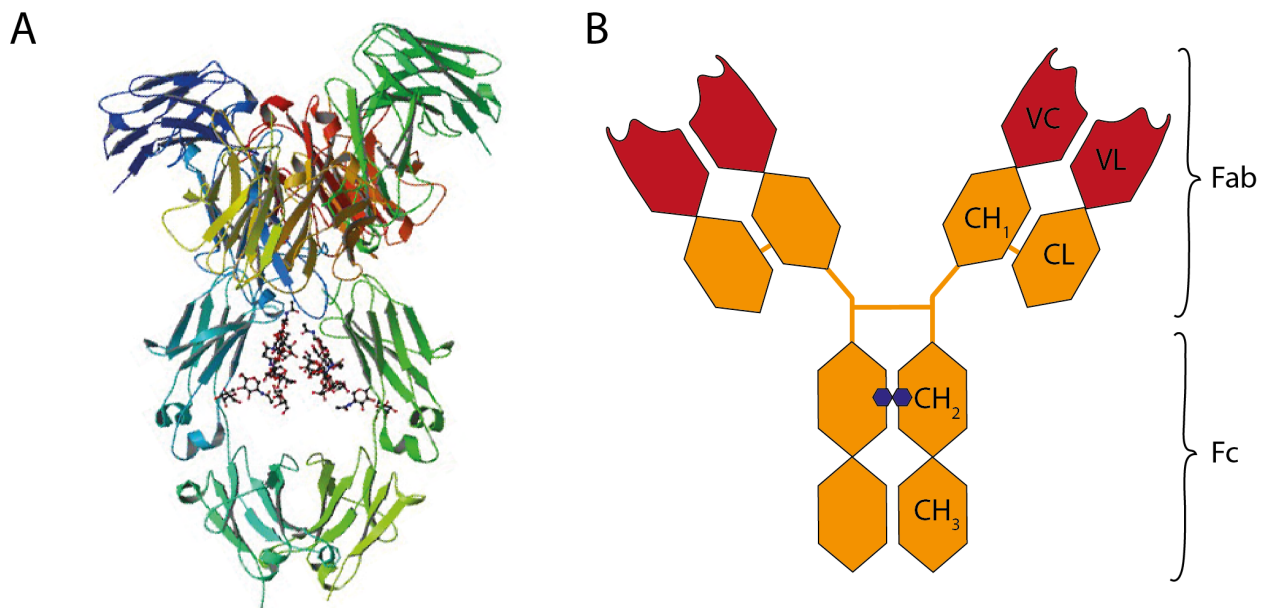


Abbildung 4: Struktur von Immunglobulinen. A: Beispielhafte Kristallstruktur eines IgG-Moleküls (39). B: Schematische Darstellung der Domänenstruktur eines IgG-Moleküls inklusive seiner Fc-N-Glykosylierung. C: konstante Region (orange), V: variable Region (rot), L: leichte Kette, H: schwere Kette, blau: N-Glykosylierung in CH₂-Domäne. Modifiziert nach (1)

Die Spezifität eines Antikörpers ist abhängig von der Aminosäure(AS)-Sequenz der Antigenbindestelle in seiner variablen V-Region. Durch die somatische V(D)J-Rekombination im Knochenmark wird die Sequenz der V-Region aus zwei (bei der leichten Kette) oder drei Gensegmenttypen (bei der schweren Kette) zusammengesetzt. Diese Gensegmente existieren in multiplen Kopien, die jeweils unterschiedliche Sequenzen aufweisen. Im Zuge der Verbindung der einzelnen Gensegmente kommt es zu Addition und Subtraktion einzelner Nukleotide. Hinzu kommt eine Diversität die auf die Kombination verschiedener leichter und schwerer Ketten zurückzuführen ist. Nach Aktivierung der B-Zelle wird die Sequenz außerdem über die somatische Hypermutation auf DNA-Ebene mutiert. Das daraus resultierende Repertoire, welches von Antikörpern erkannt werden, wird auf 10^{11} Antigene geschätzt (1).

1.3.2 Immunglobulin G

Immunglobulin G (IgG) ist das häufigste Protein in humanem Serum, es macht 10-20 % des Plasmaproteins aus. IgG wird in vier Subklassen eingeteilt, IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Obwohl sie eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von 90 % aufweisen, unterscheiden die einzelnen Subklassen sich stark in Bildung von Immunkomplexen, Komplementaktivierung, Aktivierung von Effektorzellen, Halbwertszeit und Plazentagängigkeit und Bindung an Fc γ -Rezeptoren (Tab. 1)(40).

Tabelle 1: Eigenschaften humaner IgG-Subklassen nach (40)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Allgemein				
Molekulargewicht (kDa)	146	146	170	146
Serumlevel (g/l)	6,98	3,8	0,51	0,56
Halbwertszeit (Tage)	21	21	7	21
Komplementaktivierung	++	+	+++	-
Rezeptorbindung				
FcγRI	+++	-	++++	++
FcγRIIa	+++	+ / ++	++++	++
FcγRIIb	+	-	++	+
FcγRIIc	+	-	++	+
FcγRIIIa	++ / +++	(+)	++++	(+)
FcγRIIIb	+++	-	++++	-
FcRn	+++	+++	++ / +++	+++

1.3.3 IgG Fc-Glykosylierung

Der Fc-Teil von IgG-Antikörpern weist an jeder der beiden schweren Ketten in der CH₂-Domäne am Asparagin 297 (Asn297) eine einzelne konservierte N-Glykosylierungsstelle auf. An dieser Stelle befindet sich eine verzweigte heptamere Glyko-Grundstruktur bestehend aus 3 Mannosen und 4 N-Acetylglucosaminen (GlcNAc). Diese Kernstruktur kann durch eine Fukose, ein „bisecting“ GlcNAc, sowie durch terminale Galaktose und Sialinsäure modifiziert werden (Abb. 5)(41). Dies resultiert in einer hohen Variabilität der Glykanstruktur. Dadurch können über 30 verschiedene Glykanstrukturen entstehen (42).

Abbildung 5 zeigt verschiedene beispielhafte Glykosylierungsmuster, die in humanem Serum IgG zu finden sind. Diese werden im Folgenden als agalaktosyliert (G0), galaktosyliert (G1/G2) bzw. sialyliert (S1/S2) bezeichnet. Für die Glykoanalysen in der vorliegenden Arbeit wurde Endoglykosidase S (EndoS) für die enzymatische Abspaltung der Glykanstrukturen vom Antikörperprotein verwendet. Dieses aus *Streptococcus pyogenes* stammende Enzym hydrosyliert selektiv den Chitobiosekern von IgG-Fc-Glykanen (43). In der nachfolgenden Analyse werden Informationen über die Häufigkeit des „bisecting“ GlcNAcs sowie die terminale Galaktosylierung und Sialylierung generiert. Unter Verwendung von EndoS geht jedoch die Information über den Grad der Fukosylierung verloren (Abb. 5).

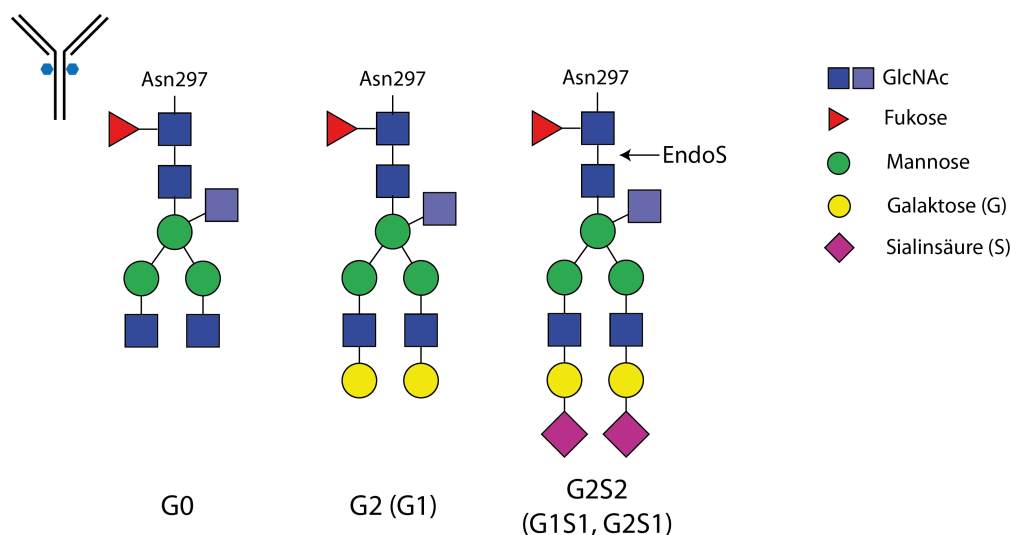


Abbildung 5: Fc-Glykosylierung von IgG-Molekülen. An der N-Glykosylierungsstelle Asparagin 297 (Asn297) befindet sich ein Oligosaccharid mit einer heptameren Grundstruktur aus 3 Mannosen und 4 N-Acetylglucosaminen (GlcNAc). Diese kann durch die Anheftung eines „bisecting“ GlcNAcs, eines Fucoserests sowie terminaler Galaktose (G)- und Sialinäurereste (S) modifiziert werden. Modifiziert nach (44).

Die Glykosylierung des IgG-Fc-Teils ist entscheidend für die Bindung des IgGs an Fc γ -Rezeptoren. Durch die verzweigte Struktur des Glykan faltet sich ein Arm der Glykans (α 1,6) entlang des Aminosäurerückrads der CH₂ Domäne, wobei der andere Arm (α 1,3) in die hydrophobe Tasche zwischen den CH₂ Domänen der beiden schweren Ketten hineinreicht und mit dem α 1,3-Arm der gegenüberliegenden schweren Kette interagiert. Durch die Füllung der hydrophoben Tasche zwischen den schweren Ketten wird die interdomäne Flexibilität limitiert und somit eine „offene“ Konformation erhalten, die essentiell für die Bindung an klassische Typ I Fc γ Rs ist. Eine komplette Deglykosylierung resultiert in einer veränderten Konformation der beiden schweren Ketten, was die Fc γ R-Bindung verhindert und die Effektorfunktion *in vivo* verhindert (45; 41). Auch die Art der Fc-Glykosylierung beeinflusst die Interaktion zwischen IgG und Rezeptoren. Terminale Sialylierung resultiert in einer konformationellen Veränderung der CH₂-Domäne, so dass vorzugsweise Typ II (C-Typ-Lektin)-Rezeptoren wie DC-SIGN (SIGN-R1 in der Maus), gebunden werden. Die Affinität zu Typ I FcRs wird reduziert (42; 46; 47).

Das Gesamt-IgG-Glykanmuster von gesunden Individuen bleibt unter Gleichgewichtsbedingungen relativ stabil (etwa 30 % sind G0, und 15-20 % sialyliert). Allerdings werden bei Auftreten von pro-inflammatorischen Prozessen, wie einer Autoimmunerkrankung, drastische Veränderungen im Glykosylierungsmuster beobachtet. So wurde bei rheumatoider Arthritis eine Reduktion von galaktosyliertem und sialyliertem IgG festgestellt (48; 49; 50). Ähnliche Ergebnisse ergab die Beobachtung von Patienten mit Morbus Crohn, Systemischer Lupus Erythematoses, Vaskulitis, Spondylarthropathie (51; 52; 53; 54). Verbessert sich das pro-inflammatorische Milieu bei Autoimmunerkrankten, wie im Falle einer Schwangerschaft weiblicher Patienten oder bei Therapie mit Methotrexat oder TNF- α -blockierenden Agenzien, so steigt der Prozentsatz an galaktosylierten IgG-Ak in Korrelation mit der Verbesserung des Krankheitsbildes wieder an (55; 56; 57; 58).

Die Inzidenz, inflammatorische Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis zu entwickeln, steigt mit zunehmendem Alter. Auch das Glykosylierungsmuster weist Veränderungen mit steigendem Al-

ter auf. So wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass mit zunehmenden Alter der Anteil an agalaktosyliertem IgG zunimmt (59; 60; 61). Dieser Anstieg erreicht jedoch nicht das Level an agalaktosyliertem IgG, welches bei Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen zu finden ist, bei denen der Anteil an G0 mehr als 50% betragen kann.

Die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von IgG wurden auch in Hinblick auf die therapeutische Anwendung dieser Antikörper untersucht. So weisen afukosylierte Antikörper eine höhere Affinität zu dem klassischen aktivierenden Fc γ RIIIa auf und zeigen eine höhere Aktivität in Antikörper-vermittelter Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cytotoxicity*) (62). Die Wirkung von terminaler Galaktose ist bisher umstritten. Während galaktosylierte Antikörper in einigen Modellen eine erhöhte inflammatorische Wirkung aufwiesen, zeigten sie in anderen Modellen eine anti-inflammatorische Wirkungsweise (63; 64; 65; 66).

Klarer ist das Bild für terminal sialylierte Antikörper. Kaneko et al. (2006) konnten nachweisen, dass die anti-inflammatorische Wirkung des intravenösen IgG (IVIg) abhängig von der Anwesenheit terminaler Sialinsäuren ist (42). IVIg, welches ursprünglich zur Substitutionsbehandlung bei Immunglobulindefizienzen entwickelt wurde, wird aus dem Plasma tausender Spender aufgereinigt. Mittlerweile wird IVIg ebenfalls zur Behandlung verschiedener inflammatorischer Autoimmunerkrankungen wie Immuntrombozytopenie (ITP), Kawasaki-Syndrom, chronischer inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP), Bullösen Hautautoimmunerkrankungen etc. verwendet (67).

In Mausexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass sialylierte murine antigenspezifische IgG1-Ak inflammatorische Immunantworten inhibieren können, möglicherweise vermittelt über Glykanbindende Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Familie wie SIGN-R1 oder DCIR (44; 68; 69; 70; 47; 71).

Über den Mechanismus, wie genau verschieden glykosylierte Antikörper entstehen, ist noch nicht viel bekannt. Allgemein ist das vorherrschende Milieu entscheidend für die Glykosylierung *de novo* gebildeter IgGs. Erfolgt der Antigenkontakt in Kombination mit einem pro-inflammatorischen Stimulus, so weisen die Antigen-spezifischen Plasmazellen eine geringe Expression der α 2,6-Sialyltransferase aus, jenes Enzyms, das für die terminale Sialylierung von IgG verantwortlich ist. Folglich sind die produzierten Antigen-spezifischen IgGs gering sialyliert. Erfolgt der Kontakt mit dem Antigen jedoch unter Toleranzbedingungen ohne pro-inflammatorischen Kostimulus, so weisen die Antigen-spezifischen Plasmazellen eine erhöhte α 2,6-Sialyltransferase-Expression auf, was zu einem erhöhtem Anteil an sialylierten antigenspezifischen IgGs führt (69).

Es wird vermutet, dass naive T-Zellen je nach inflammatorischem Milieu in Regulatorische T-Zellen (T_{reg} s) oder inflammatorische T-Zellen, wie T_H1 oder T_H17 differenzieren und mit der Sekretion anti- bzw. pro-inflammatorischer Zytokine die Expression der Transferasen in den Antigen-spezifischen Plasmazellen beeinflussen (Abb. 6). Wie genau dieser Mechanismus aussieht, bleibt zu erforschen.

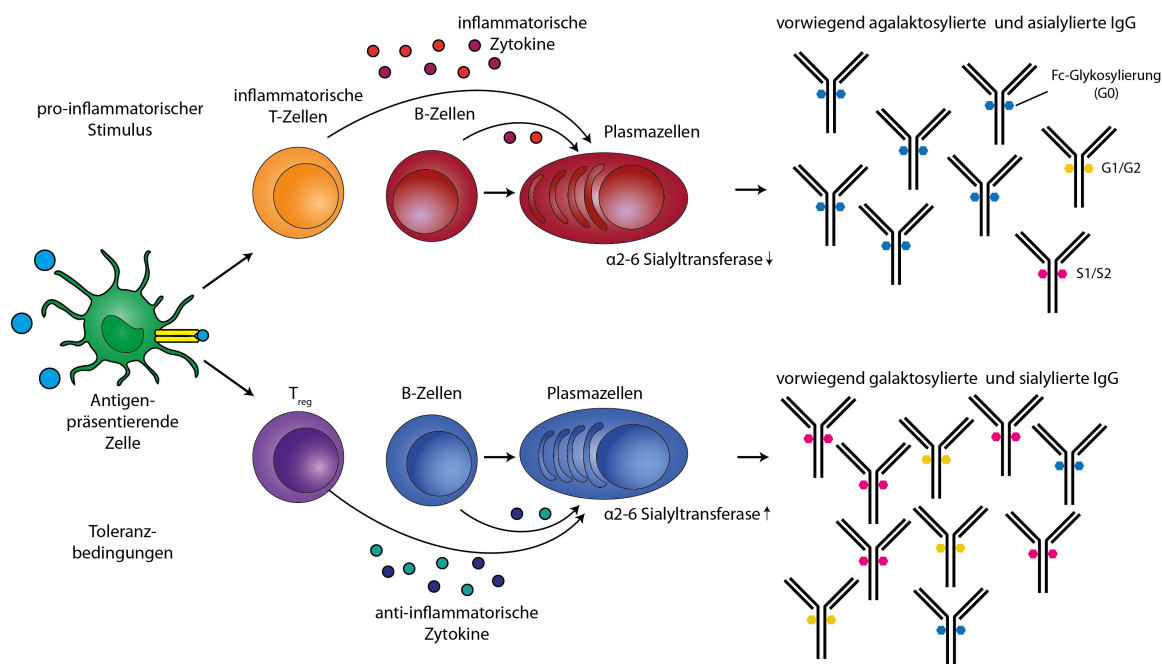


Abbildung 6: Vermuteter Mechanismus der Entstehung verschieden glykosylierter Antikörpern Erfolgt die Antigenpräsentation unter pro-inflammatorischen Bedingungen, so werden inflammatorische T-Zellen induziert. Diese interagieren mit B-Zellen, welche zu Plasmazellen differenzieren, die eine geringe Expression von $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase aufweisen. Die sekretierten Antikörper sind gering galaktosyliert und sialyliert. Erfolgt die Antigenexpression hingegen unter Toleranzbedingungen so werden regulatorische T-Zellen (T_{reg} s) induziert. Die interagierenden B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, welche eine erhöhte Expression von $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase aufweisen. Die produzierten Antikörper besitzen einen hohen Anteil an Galaktose und Sialinsäure auf. Modifiziert nach (44).

Bei der Anwendung einer SIT könnte man sich dieses Wissen zunutze machen. Ziel einer SIT ist es durch ansteigende Allergendosierung unter nicht-inflammatorischen Bedingungen eine Toleranz zu induzieren. Hierfür werden in den unterschiedlichen SIT-Protokollen unterschiedliche Adjuvantien benutzt. Studien an OVA-immunisierten Mäusen haben gezeigt, dass verschiedene Adjuvantien unterschiedlich glykosylierte antigen-spezifische Antikörper induzieren können (69; 70). Während eine Immunisierung des Antigens mit Alum, einem gängigen Bestandteil in SIT-Protokollen, eine hohe Sialylierung der Antikörper induziert hat, hatte die Immunisierung in Verbindung mit Freud's Adjuvants, komplett (CFA, *complete Freud's Adjuvant*) eine geringe Sialylierung zur Folge. Bisher wurden im Zusammenhang mit IgG-Fc-Glykosylierung zwei SIT-Patienten beschrieben, welche drei Jahre erfolgreich mit Birkenpollenextrakt plus Alumn therapiert wurden (Allergovit; Allergopharma). Die untersuchten Allergen-spezifische IgG Antikörper dieser Patienten wiesen eine sialylierte niedrig inflammatorische Glykosylierung ähnlich wie IVIg auf (69); die Verifizierung dieser vorläufigen Daten, die Analyse weiterer Patienten, die Untersuchung der Glykosylierung über die Therapiezeit und der tatsächliche Einfluss der IgG Glykosylierung steht noch aus.

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unbehandelte Birkenpollenallergiker und eine gut charakterisierte Kohorte an Birkenpollenallergikern untersucht, welche über drei Jahre eine subkutane SIT mit einem Alumn-versetzten Birkenpollenextrakt erhalten haben (27; 28). Hier sollte untersucht werden, in welchem Umfang die SIT die humorale Antwort gegenüber des Allergens moduliert, insbesondere sollten hier die Bet v 1-spezifischen IgE-, IgG-, sowie IgG-Subklassen-Titer untersucht werden.

Es sollte weiterhin analysiert werden, wie sich die Fc-Glykosylierung in Verlaufe der SIT im Vergleich zu unbehandelten Allergikern entwickelt. Zu diesem Zweck sollte aus dem Serum bzw. Plasma der Birkenpollenpatienten Bet v 1-spezifisches IgG aufgereinigt, das Glykan enzymatisch verdaut und anschließend mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) untersucht werden. Bei Immunisierungen spielen die verwendeten Adjuvantien eine entscheidene Rolle bei Generierung von verschiedenen glykosylierten Antikörpern. Neben bereits etablierten Adjuvantien wie Alumn werden in den letzten Jahren diverse andere Zusatzstoffe für SIT-Protokolle erforscht (19; 72; 73).

Auch aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die Frage beleuchtet werden, inwiefern die Glykosylierung der bei einer SIT entstandenen Bet v 1-spezifischen IgG einen Einfluss auf die Aktivierung von Effektorzellen aufweist. Zu diesem Zweck sollte die Glykosylierung des IgG aus dem Serum von den hier untersuchten SIT-Patienten *in vitro* enzymatisch modifiziert werden. Immunkomplexe aus Bet v 1 und den verschiedenen glykosylierten SIT-IgG sollten in einem Neutrophilen-Aktivierungsassay analysiert werden. Die Untersuchungen sollten zeigen, wie wichtig die Induktion eines hohen Sialyierungsgrades der gebildeten Allergen-spezifischen IgG-Ak ist. Es wird vermutet, dass eine geringe Sialylierung einen negativen Einfluss auf die Toleranzinduktion der SIT nehmen könnte.

2 Material

2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller (Firmensitz)
10x PBS, steril	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bet v 1, rekombinant	Allergopharma (Reinbek, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
CNBr-activated Sepharose	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
BD Opteia (TMB Substrat)	BD Bioscience (San Diego, CA, USA)
Carbonat/Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
D-Glucose	Merck Biosciences, (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's buffered saline (DPBS)	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Endoglykosidase S (EndoS)	Zur Verfügung gestellt von Matthias Collin
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FCS, hitzeinaktiviert	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
β -Galaktosidase	Prozyme (Hayward, CA, USA)
Gelatine	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
H ₂ SO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HCl, 25 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Histopaque 1119	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Isopropanol, 70 %	Otto Fischer (Saarbrücken, Deutschland)
L-Glutamin	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Merck (Darmstadt, Germany)
NaHCO ₃	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Percoll	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
PMA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Polyethylenglykol (PEG)	Merck (Darmstadt, Germany)
Protein G resin	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sialidase A	Prozyme (Hayward, CA, USA)
Trizma base (Tris)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.2 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
CNBr-Sepharose-Kopplungspuffer pH 8,3	0,2 M NaHCO ₃ 1 M NaCl
CNBr-Sepharose-Waschpuffer sauer pH 4,0	0,1 M Na-Acetat 0,5 M NaCl
CNBr-Sepharose-Waschpuffer alkalisch pH 8,0	0,1 M Tris-HCl 0,5 M NaCl
ELISA-Kopplungspuffer	50 mM Carbonat/Bicarbonat-Puffer
ELISA-Waschpuffer	10 v/v% 10xPBS 0,05 v/v% Tween-20
ELISA-Blockpuffer	10 v/v% 10xPBS 3 w/v% BSA 0,1 w/v% Gelatine 3 mM EDTA
20 % EtOH in PBS (Lagerpuffer für Säulen)	10 v/v% 10xPBS 20 v/v% Ethanol
10xPBS pH 7,2	1,38 M NaCl 26,8 mM KCl 101,4 mM Na ₂ HPO ₄ 17,6 mM KH ₂ PO ₄
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 Medium 4 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 mM HEPES 50 µM β-Mercaptoethanol

2.3 Antikörper

Antigen	Wirt/Isotyp	Klon	Kopplung	Hersteller (Firmensitz)
human IgG	murin IgG2a	HP-6017	-	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
human IgG1	murin IgG2b	HP-6001	-	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
human IgG2	murin IgG1	HP-6014	-	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
human IgG3	murin IgG1	HP-6050	-	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
human IgG4	murin IgG1	HP-6025	HRP	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
human IgE	Ziege	polyconal	HRP	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
murin IgG1	Ziege	polyconal	HRP	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
murin IgG2a	Ziege	polyconal	HRP	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
murin IgG2b	Ziege	polyconal	HRP	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)

2.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller (Firmensitz)
Dialyseschlauch Cellulose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA-Monovetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
FACS-Röhrchen 5 ml	BD Bioscience (San Diego , CA, USA)
Falcon 15, 50 ml (Poypropylen)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikrotiterplatten (hochbindend) 96 Well	Corning Incorporate (Corning, NY, USA)
Petrischalen 10 cm	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Pipetten 5, 10, 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0,5/ 1,5/ 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serum-Monovetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Well)	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)

2.5 Geräte

Produkt	Hersteller (Firmensitz)
Analyse-Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Autoklav	Webeco matchana group (Selmsdorf, Deutschland)
AutoFlow NU-5510 CO2 Incubator	NuAir (Plymouth, MN, USA)
Benchtop analyzer LSRII	BD (Heidelberg, Deutschland)
Einkanal Pipetten Discovery	HTL Lab Solution (Warschau, Polen)
Einkanal Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
FLUOstar Omega	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Heracell 150i Co2 Incubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mehrkanal Pipetten	VWR (Radnor, PA, USA)
Mikrozentrifuge Ministar	VWR (Radnor, PA, USA)
NanoDrop-1000	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht (Sondheim, Deutschland)
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
NanoPure	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterile Werkbank	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Vakuumpumpe Vacusafe 158310	Integra Bioscience (Zizers, Schweiz)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wipptisch WT12	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.6 Software

Programm	Hersteller
Omega	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Photoshop Elements 4	Adobe (München, Deutschland)
Illustrator CS5	Adobe (München, Deutschland)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)

3 Methoden

3.1 Spezifische Immuntherapie

Die Planung und Durchführung der spezifischen Immuntherapie (SIT) erfolgte durch die Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg (Abteilung Allergologie). Im Zuge der durchgeführten Studie zu den zellulären Mechanismen der Toleranzinduktion während einer spezifischen Immuntherapie (27; 28) wurde freundlicherweise Plasma von Birkenpollenallergikern für die Untersuchungen in dieser Arbeit bereitgestellt. Details zur Behandlung sind in der Dissertation von Dr. Christian Möbs zu finden (29)

Des Weiteren wurden freundlicherweise Serumproben von unbehandelten Birkenpollenallergikern von Prof. Uta Jappe aus der Abteilung Klinische und Molekulare Allergologie des Forschungszentrums Borstel bereitgestellt.

3.1.1 Patienten

Aus dem in (28) beschriebenen Kollektiv wurde das Plasma von 11 SIT-Patienten im Alter zwischen 21 und 61 Jahren (Durchschnitt: 41 Jahre) für die vorliegende Arbeit verwendet. Sieben Probanden innerhalb dieser Gruppe waren weiblich. Bei allen Patienten wurde eine klinisch relevante Typ-1-Allergie gegen Birkenpollen mit mäßiger bis schwerer saisonaler Rhinokonjunktivitis und/oder Asthma bronchiale diagnostiziert.

Vor Einschluss in die Studie wurde von jedem Patienten ein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den wissenschaftlichen Untersuchungen eingeholt, welche von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt worden waren.

3.1.2 Studiendesign

Die Patienten wurden nach den internationalen Richtlinien und einem standardisiertem Dosierungsschema mit Birkenpollenallergen(BPA)-Extrakt behandelt. Das Präparat wurde den Patienten in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg verabreicht. Der Therapiebeginn erfolgte außerhalb der Birkenpollensaison mit einer Aufdosierungsphase. Das Allergenpräparat (ALK-depot SQ) wurde in ansteigenden Dosen wöchentlich bis zu einer Erhaltungsdosis vom 100.000 SQ (standardisierte Qualitäts)-Einheiten subkutan appliziert. Die SIT wurde mit einer monatlichen Erhaltungsdosis über drei Jahre fortgesetzt.

Während der dreijährigen Behandlung wurden regelmäßig klinische Parameter sowie die klinischen Beschwerden dokumentiert. Des Weiteren wurde zu definierten Zeitpunkten während und außerhalb der Pollenflugsaison Blut für *in vitro* und *ex vivo*- Analysen entnommen.

3.1.3 Klinische Evaluation

Die klinische Evaluation der SIT-Patienten erfolgte durch das medizinische und technische Personal der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Marburg.

Klinischer Symptomscore

Für den klinischen Symptomscore wurde das subjektive Allergieempfinden der Patienten auf einer numerischen Skala (1-7) beurteilt. Dabei entsprach der Schweregrad der allergischen Symptome folgenden Werten: 1- „überhaupt nicht krank“; 2-“Grenzfall allergischer Erkrankung“; 3-“nur leicht krank“, 4-“mäßig krank“, 5-“deutlich krank“; 6-“schwer krank“; 7-“extrem schwer krank“. Die Bewertung der Symptome durch die Patienten erfolgte zu Zeitpunkten der saisonalen Pollenexposition vor (m-6) und während der SIT (m6, m18, m30).

Hautpricktest

Die Hautreaktivität der Patienten gegenüber dem Allergen (Hautpricktest) wurde außerhalb der Birkenpollensaison direkt vor Beginn der SIT (m0) und im jährlichen Abstand während der Behandlung wiederholt (m12, m24, m36). Eine BPA-haltige Lösung wurde auf den volarseitigen Unterarm des Patienten getropft und mit einer Pricklanzette durch die Lösung in die Epidermis gestochen, ohne einen Blutaustritt zu verursachen. Nach 5 Minuten wurde die Lösung abgetupft und nach weiteren 15 Minuten die Hautreaktion beurteilt. Die Interpretation erfolgte mittels einer Positiv- (0,1% Histamin) und einer Negativkontrolle (0,9% NaCl). Die numerische Beurteilung wurde anhand der Größe der Rötung (Erythem) und Quaddelbildung (Urtikaria) durchgeführt (Tab. 2).

Tabelle 2: Numerische Beurteilung des Hautpricktest. Beurteilung der Rötung und der Quaddelbildung relativ zu den Kontrollen

0	negativ	keine Quaddel, Rötung im Durchmesser nicht größer als 3mm, gleiche Reaktion wie bei der Negativkontrolle
0,5	fraglich positiv	angedeutete Quaddel von 1-2mm, Rötung im Durchmesser 3-4mm
1	positiv	Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist kleiner als bei der Histaminquaddel
2	positiv	Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser entspricht der Histaminquaddel
3	positiv	Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist größer als bei der Histaminquaddel
4	positiv	Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist größer als bei der Histaminquaddel und weist zusätzlich Pseudopodien auf

3.1.4 Plasmagewinnung

Die Entnahme von Vollblut erfolgte unter Zugabe von Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) als Antikoagulantanz. Das CPDA-Blut der Patienten wurde bei 350xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Blutplasma wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2 Immunglobulinserologie mittels ELISA

Die Menge an Serum-Immunglobulinen im Verlauf der SIT wurde mit einem Sandwich-ELISA bestimmt. Zunächst wurde eine hochbindende Mikrotiterplatte mit 10 µg/ml Antigen in ELISA-Kopplungspuffer bei 4 °C über Nacht beschichtet (2,5 LF/ml für Tetanustoxoid). Nach Herauswaschen überschüssigen Antigens wurden unspezifische Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer geblockt. Daraufhin wurde das Serum 1:10 bis 1:100 in Blockpuffer verdünnt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Platten-gebundenen Proben mit den in Tabelle 3 angegebenen Antikörpern 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 3: Detektionsantikörper für Serologie. Kombinationen zum Nachweis verschiedener Immunglobulinsotypen und -subklassen (Klon, Isotyp des Primär-bzw. Detektionsantikörpers), HRP: *horseradish peroxidase*

Primärantikörper	Detektionsantikörper
Maus α human IgG (HP-6017, mIgG2a)	Ziege α Maus-IgG2a-HRP
Maus α human IgG1 (HP-6001, mIgG2b)	Ziege α Maus-IgG2b-HRP
Maus α human IgG2 (HP-6014, mIgG1)	Ziege α Maus-IgG1-HRP
Maus α human IgG3 (HP-6050, mIgG1)	Ziege α Maus-IgG1-HRP
-	Maus α human IgG4-HRP (HP-6025)
-	Ziege α human IgE-HRP

Im Anschluss an weitere Waschvorgänge wurden je 100 µl der TMB-Substratlösung (Reagenz A und B zu gleichen Teilen) pro *Well* hinzugegeben. Nach Zugabe von 50 µl Stopplösung (0,5 M H₂SO₄) wurde die Absorption der Proben im Fluostar Omega bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge: 570 nm).

3.3 Glykananalyse von Bet v 1 spezifischen IgG

3.3.1 Aufreinigung von IgG über Protein G Sepharose

Protein G, ein Protein aus der Zellwand von Streptokokken, weist eine selektive Affinität für IgG auf, wodurch es für dessen affinitätschromatographische Aufreinigung genutzt werden kann. Plasma bzw. Serum von Birkenpollenpatienten wurde über Protein G gekoppelte Sepharose (GE Healthcare) geleitet. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Serumbestandteile mit PBS herausgewaschen. Die saure Elution des IgG erfolgte mittels 0,1 M Glycin pH 2,8. Zur sofortigen Neutralisation wurden die Fraktionen in 1 M Tris-HCl pH 9 aufgefangen (10 Teile 0,1 M Glycin, 1 Teil 1 M Tris). Die Konzentration des IgG wurde mittels Nanodrop bestimmt. Anschließend wurde gegen PBS umgepuffert.

3.3.2 Kopplung von Antigen an Sepharosematrix

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung Bet v 1-spezifischer IgG wurde CNBr-aktivierte Sepharose mit Bet v 1 gekoppelt. Für ein Bettvolumen von 1 ml gekoppelter Sepharose wurde 0,33 g CNBr-aktivierte Sepharose in 1 mM HCl resuspendiert und in eine Chromatographiesäule transferiert. Die Sepharose wurde mit 60 ml 1 mM HCl gewaschen und anschließend mit 2-4 mg Bet v 1 in Kopplungspuffer 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde mit 5 ml Kopplungspuffer herausgewaschen. Überschüssige reaktive Gruppen wurden mit Blockpuffer 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Im Anschluss wurde die Sepharose alternierend mit saurem und leicht alkalischem Puffer gewaschen. Die fertigen Säulen wurden in 20 % Ethanol in PBS bei 4 °C gelagert.

3.3.3 Aufreinigung Bet v 1-spezifischer IgG-Ak

Die Aufreinigung Antigen-spezifischer IgG erfolgte analog zur Aufreinigung von Gesamt-Serum-IgG. Zur Verbesserung der Reinheit der Antigen-spezifischen IgGs wurde das Eluat der Aufreinigung wiederholt über die Antigen-spezifische Säule aufgereinigt.

Zur Validierung der Antigen-spezifischen Aufreinigung wurde ein Bet v 1- und Tetanustoxoid-spezifischer ELISA durchgeführt. Mittels Tetanustoxoid wurde die Verunreinigung mit unspezifischen IgG kontrolliert. Laut einer Untersuchung des Robert-Koch-Instituts sind 96 % der Erwachsenen in Deutschland mindestens einmal gegen Tetanus geimpft worden (74). Im Serum bzw. Plasma aller verwendeten Patienten konnten spezifische IgG gegen Tetanustoxoid nachgewiesen werden.

3.3.4 Enzymatische Deglycosylierung des IgG-Fc N-Glykane

Nachdem die Antikörper zum zweiten Mal gebunden hatten, wurde die Säule zunächst mit 1xPBS und anschließend mit 0,2xPBS gewaschen. Die an die Säulenmatrix gebundenen Antikörper wurden mit 10 µg/ml Endoglycosidase S (Endo S) eine Stunde bei 37 °C behandelt. Dieses von *Streptococcus pyrogenes* sekretierte Enzym hydrolysiert spezifisch die β -1,4-di-N-Acetylchitobiose Struktur des

Asparagin-gekoppelten Glykans von IgG-Antikörpern (43). Nach der Inkubation wurde die Glykan-EndoS-Lösung aus der Säule aufgefangen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Der an der Säule verbliebene Antikörper wurde analog zur Protein G Sepharose eluiert.

Alternativ wurde 100 μg aufgereinigtes IgG mit 2,5 μg EndoS ebenfalls 1 h bei 37°C verdaut.

3.3.5 Enzymatische Modifikation von IgG

Zur Generierung verschiedenen glykosylierter Varianten eines Antikörpers konnte dieser *in vitro* im Anteil der Sialinsäure und Galaktose verändert werden.

Die Desialylierung erfolgte mit der Sialidase A von Prozyme. Pro Milligramm Antikörper wurden 10 mU Sialidase hinzugegeben. Der Puffer wurde aus dem mitgelieferten *5xReaction Buffer B* hergestellt. Die Inkubation erfolgte 48 h bei 37°C .

Die Degalaktosylierung erfolgte mit der β -Galaktosidase von Prozyme. Pro Milligramm Antikörper wurden 20 mU Enzym hinzugegeben. Da die Galaktosidase nur terminale Galaktose schneidet, wurden zusätzlich 10 mU Sialidase hinzugefügt. Der Puffer wurde aus dem mitgelieferten *5xReaction Buffer B* hergestellt. Die Inkubation erfolgte 48 h bei 37°C .

3.3.6 Glykan-Analyse

Die Analyse der IgG-Fc-Glykosylierung erfolgte mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC, *high pressure liquid chromatography*). Die Analysen an der HPLC wurden freundlicherweise von dem naturwissenschaftlichen Doktoranden Yannik Bartsch aus unserer Arbeitsgruppe in Lübeck durchgeführt und ausgewertet.

Für die HPLC-Analyse wurden die Glykane aus Abschnitt 3.3.4 mittels Graphitsäulen von Proteinen und Verunreinigungen getrennt. Anschließend wurden die Glykane mit 2-Aminobezamid markiert und an der HPLC gemessen (75).

3.4 Neutrophile Granulozyten

3.4.1 Aufreinigung von Neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut

Die Isolation von Leukozyten aus hepariniertem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Für die Aufreinigung von 25 ml Vollblut wurden 12,5 ml Histopaque 1119 vorgelegt und mit 12,5 ml Histopaque 1077 vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde das Blut auf den Gradienten geschichtet. Der Dichtegradient wurde 35 min bei 220xg und Raumtemperatur zentrifugiert.

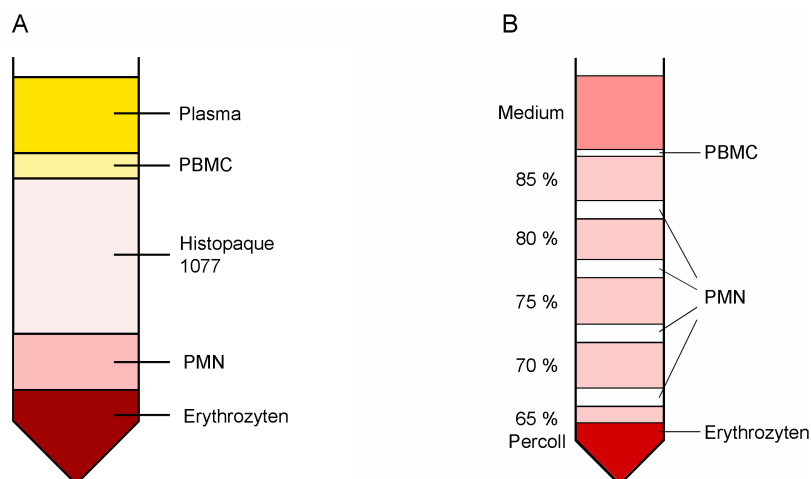


Abbildung 7: Dichtegradienten zur Aufreinigung von Leukozyten. Schematische Darstellung des Histopaquegradienten (A) und des Percollgradienten (B) nach Zentrifugation. PBMC, *Peripheral mononuclear blood cells*; PMN, *Polymorph nuclear cells*

Die Granulozyten, auch polymorph-nukleäre Zellen (PMN, *polymorph nuclear neutrophils*), wurden aus der Interphase zwischen Histopaque 1077 und Histopaque 1119 entnommen (Abb. 7A). Die PMN-Suspension wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, bei 330xg 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde in 2 ml RPMI-Komplettmedium aufgenommen und auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten geschichtet. Für den Gradienten wurden Percollösungen in den Konzentrationen 85 %, 80 %, 75 %, 70 % und 65 % mit Medium angesetzt und in absteigender Konzentration übereinander geschichtet (85-70 % je 2 ml, 65 % 3 ml). Das Percoll wurde zuvor 10:1 mit 10x PBS angesetzt, um eine isotonische Lösung zu erhalten. Der Gradient wurde 25 min bei 800xg zentrifugiert, wodurch sich die Granulozyten in den Interphasen zwischen den verschiedenen Percollschichten sammeln (Abb. 7B). Die Granulozytenringe zwischen 85 % und 75 % Percoll wurden entnommen und in 50 ml PBS gewaschen (330xg, 10 min). Die Zellen wurden im Assaymedium resuspendiert. Die Konzentration einer Zellsuspension wurde mittels einer Trypanblaufärbung bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 60 µl Medium und 30 µl Trypanblaulösung versetzt, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Mittels Neubauerzählkammer wurde anschließend die Zellzahl bestimmt.

3.4.2 Präparation von immobilisierten Immunkomplexen

Plattengebundene Immunkomplexe wurden unter der Verwendung von Allergiker-IgG und dem Birkenpollenallergen Bet v 1 gebildet. Die Bindung von 10 µg/ml Bet v 1 in Beschichtungspuffer an 96-Well Lumitrac 600 Platten (ROS-Detektion) oder Fluotrac 600 (NET-Detektion) erfolgte eine Stunde bei 37 °C. Überschüssiges Antigen wurde durch Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden mit ELISA-Blockpuffer für eine Stunde bei 37 °C unspezifische Bindestellen abgesättigt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte dann die Inkubation mit 1 mg/ml Allergiker-IgG für 18 Stunden bei 37 °C. Zum Schluss wurden die Platten zweimal gewaschen.

3.4.3 Detektion von Reaktiven Sauerstoffspezies

Neutrophile Granulozyten produzieren nach einer Aktivierung, z.B. mit PMA, intra- und extrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Intrazelluläre ROS können außerdem in den Extrazellulärraum diffundieren. Derzeit sind verschiedene Methoden zur *in vitro* Detektion sowohl intra- als auch extrazellulärer ROS verfügbar. Intrazelluläre ROS können mittels Dihydrorhodamin123 detektiert werden. Im Gegensatz dazu können extrazelluläre ROS mithilfe von Cytochrom C oder Lucigenin nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantifizierung mit Luminol gewählt, mit der sowohl intra- als auch extrazelluläre ROS detektiert werden, welche durch die Myeloperoxidase produziert werden (76).

Neutrophile Granulozyten wurden auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Chemilumineszenz-Medium eingestellt. Die Zellen wurden mit 0,6 mM Luminol versetzt und in die Immunkomplexbeschichteten Platten transferiert. Die Chemilumineszenz wurde mittels des Fluostar Omega über 1 h jede Minute bei 37°C gemessen.

3.5 Statistische Analysen

Wenn nicht anders gekennzeichnet wurden die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of mean*) dargestellt. Der Vergleich der longitudinalen Daten erfolgte in Relation zum Beginn der Therapie (m0) mittels des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Analyse der Daten der ROS-Produktion in Neutrophilen erfolgt über die Fläche unter der Kurve (AUC, *area under the curve*) unter Verwendung des Student's t-Test (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten Serumproben aus einer gut charakterisierten Birkenpollen-SIT-Kohorte sowie unbehandelte Birkenpollenallergiker untersucht werden. Es sollte zunächst eine klinische und serologische Charakterisierung der Proben vorgenommen werden. Anschließend sollte aus dem Serum sowohl Gesamt- als auch Bet v 1-spezifisches IgG aufgereinigt werden. Mittels HPLC sollten diese IgG hinsichtlich ihrer Fc-Glykosylierung analysiert werden. In einem *in vitro* humanen Neutrophilenassay sollte anschließend untersucht werden, welchen Einfluss die IgG Fc-Glykosylierung auf die Aktivierung von Neutrophilen ausübt.

4.1 Wirkung der spezifischen Immuntherapie (SIT) auf Birkenpollenallergiker

Die untersuchten Patienten wurden hinsichtlich klinischer und serologischer Parameter untersucht. Die Gruppe der behandelten Patienten umfasste 11 Birkenpollenallergiker, welche, u.a. im Rahmen einer Studie an der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie Marburg (27; 28), eine dreijährige SIT erhalten haben. Die Patienten erhielten das Alumn-haltige ALK-Depot SQ (ALK-abello). Vergleichend dazu wurden Serumproben von 15 unbehandelten Birkenpollenallergikern entweder innerhalb oder außerhalb der Pollensaison analysiert. Diese Proben wurden von Prof. Dr. Uta Jappe aus der Abteilung Klinische und Molekulare Allergologie des Forschungszentrums Borstel bereitgestellt.

4.1.1 Klinische Parameter

Die klinische Evaluation der SIT-Patienten, welche einen standardisierten Fragebogen sowie Antikörpernachweise und einen Hautpricktest umfassten, erfolgte durch das medizinische und technische Personal der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Universität Marburg. Die klinische Charakteristik der analysierten Patienten sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Studie umfasste 11 Patienten im Alter von 21 bis 61 Jahren. Die Patienten wiesen nicht nur einen deutlichen Titer an Gesamt-IgE auf, sie zeigten auch IgE spezifisch gegen Birkenpollenallergenextrakt (BPA) sowie gegen Bet v 1, dem Hauptallergen der Birke.

Tabelle 4: Klinische Charakteristika der SIT-Patienten vor Beginn der Spezifischen Immuntherapie. Messung der IgE-Titer mittels ImmunoCap. Daten als Mittelwert dargestellt.

	n=11	Spannweite
Geschlecht (m/w)	4/7	
Alter	41	21-61
Gesamt-IgE (kUA/l) vor Beginn der Therapie	140,9	14,9-600,0
Birkenpollen-spezifisches IgE (kUA/l) vor Beginn der Therapie	8,6	0,49-41,3
Bet v 1-spezifisches IgE (kUA/l) vor Beginn der Therapie	9,2	0,48-42,9

Zur klinischen Evaluation wurden der klinische Symptomscore sowie das Ergebnis des Hautpricktests herangezogen. Alle analysierten Patienten wiesen vor Beginn der Therapie einen deutlichen Symptomscore und eine deutliche Reaktion auf Allergenapplikation im Hautpricktest auf (Abb. 8). Bereits während der ersten sechs Monate nach Beginn der Behandlung verbesserte sich das subjektive Allgemeinbefinden der Patienten (Score) signifikant, im Schnitt von 5 („deutlich krank“) zu 3 („nur leicht krank“) (Abb. 8A). Des Weiteren konnte 12 Monate nach Beginn der SIT eine signifikant verringerte Reaktivität im Hautpricktest festgestellt werden (Abb. 8B).

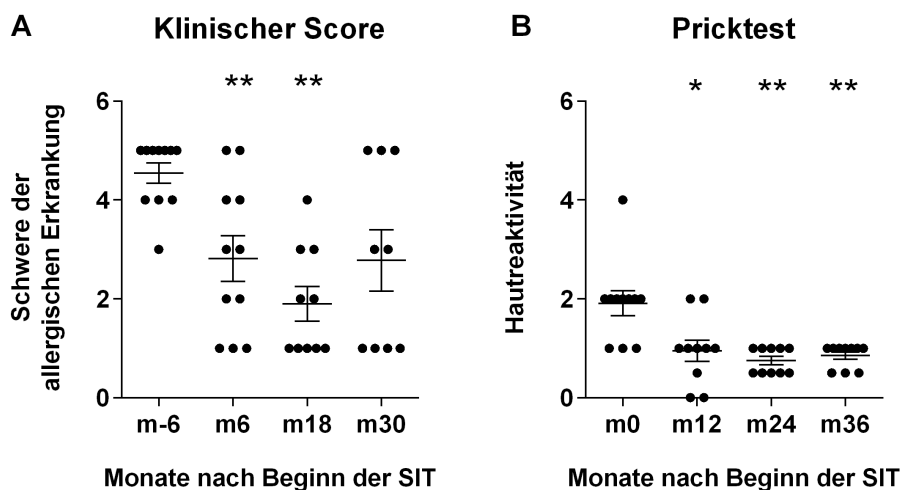


Abbildung 8: Eine spezifische Immuntherapie resultierte in verringerter Reaktivität der Allergiker auf Birkenpollen. A: Klinischer Symptomscore innerhalb der Birkenpollenflugsaison. Mittels standardisiertem Fragebogen erfolgte eine subjektive Beurteilung des Schweregrads der Erkrankung der Patienten über den Verlauf der SIT. Dabei entsprach der Schweregrad der allergischen Symptome folgenden Werten: 1- „überhaupt nicht krank“; 2- „Grenzfall allergischer Erkrankung“; 3- „nur leicht krank“; 4- „mäßig krank“; 5- „deutlich krank“; 6- „schwer krank“; 7- „extrem schwer krank“. Die Analysen wurden jeweils vor der SIT (m-6) und im Verlauf der SIT (m6, m18, m30) jährlich innerhalb der Pollenflugsaison durchgeführt. B: Hautpricktest außerhalb der Pollenflugsaison. Die Reaktivität auf Birkenpollenextrakt wurde vor Beginn (m0) und im Verlauf der SIT (m12, m24, m36) jährlich außerhalb der Pollensaison untersucht. Dargestellt sind individuelle Datenpunkte, sowie der Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Zum Vergleich wurde ebenfalls die Analyse einer Gruppe unbehandelter Birkenpollenallergiker herangezogen. Wie Tabelle 5 zu entnehmen ist, wiesen auch diese Patienten einen IgE-Titer gegen BPA und Bet v 1 auf. Einzelne Patienten, bei denen kein spezifisches IgE nachweisbar war, wiesen eine positive Reaktion im Pricktest auf. Unbehandelte Patienten, die innerhalb der Birkenpollenflugsaison untersucht wurden, wiesen im Vergleich zu den Patienten außerhalb der Saison durchschnittlich einen leicht erhöhten spezifischen IgE-Titer (BPA und Bet v 1) auf (Tab. 5).

Tabelle 5: Klinische Charakteristika unbehandelter Patienten außerhalb und innerhalb der Saison. Patienten, welche negativ auf Birkenpollen-/Bet v 1-spezifisches IgE getestet wurden, wiesen einen positiven Hautpricktest auf. Messung der IgE-Titer mittels ImmunoCap. Daten als Mittelwert (Spannweite) dargestellt.

	außerhalb der Saison n=7	innerhalb der Saison n=8
Geschlecht (m/w)	3/4	
Alter	41,3 (17-63)	44,9 (30-56)
Gesamt-IgE (kU/l)	190,0 (41,4-539)	140,6 (23-269)
Birkenpollen-spezifisches IgE (kU/l)	15,1 (1,82-40,9)	30,4 (0-100)
Bet v 1-spezifisches IgE (kU/l)	15,2 (2,12-42,9)	33,4 (0-100)

4.1.2 Veränderung der Bet v 1-spezifischen Antikörpertiter im Verlauf der SIT

Das Plasma (SIT-Patienten) bzw. Serum (unbehandelte Patienten) der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Patienten wurde im Folgenden hinsichtlich der Antikörpertiter zu Beginn und im Verlauf der SIT untersucht. Die Titer der unbehandelten Patienten wurde hier erneut vergleichend untersucht. Der Einfluss der SIT auf Allergen-spezifische Antikörpertiter im Plasma bzw. Serum wurde mittels ELISA analysiert. Neben der Bestimmung der relativen Titer von Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern wurde weiterhin der relative Titer von Bet v 1-spezifischen IgG-Antikörpern, sowie die Titer der IgG-Subklassen untersucht.

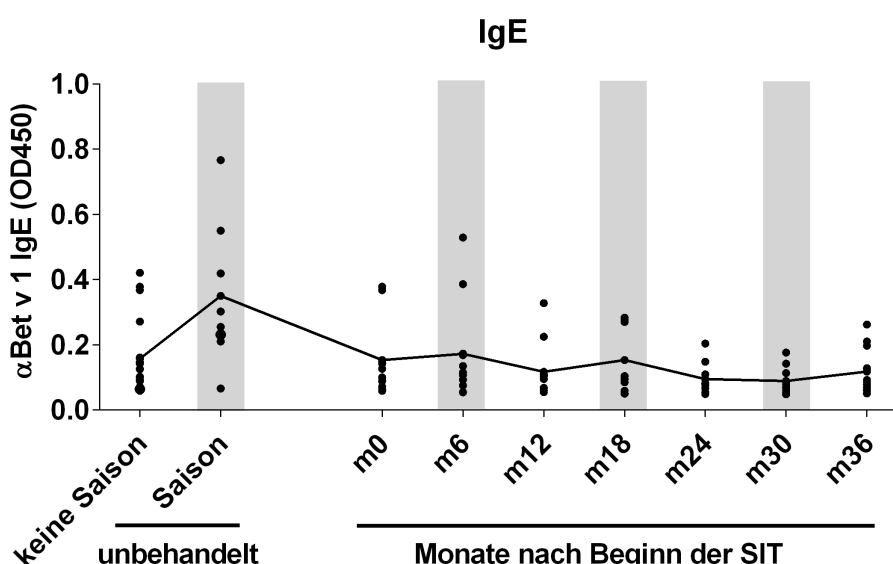


Abbildung 9: Relativer Titer von Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern. Vergleich von unbehandelten Birkenpollenallergikern außerhalb oder innerhalb der Pollenflugsaison mit Patienten unter 36-monatiger Immuntherapie. Alle Patienten zeigen allergen-spezifische IgE-Titer. SIT führt zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der Bet v 1-spezifischen IgE-Titer. Dargestellt sind individuelle Datenpunkte (n=8-11), sowie der Mittelwert. Graue Bereiche kennzeichnen die Pollenflugsaison. Repräsentative Darstellung für eine aus drei Messungen.

Laut Jarolim et al., (1989) weisen durchschnittlich 94 % der Birkenpollenallergiker IgE-Antikörper gegen das Hauptallergen der Birke, Bet v 1, auf (7). Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten konnte nicht bei allen IgE-Antikörper gegen Bet v 1 nachgewiesen werden. Über den Verlauf der Behandlung konnte keine signifikante Veränderung des Bet v 1-spezifischen Serum-IgE-Titers im Vergleich zum Beginn der Behandlung (m0) festgestellt werden. Es zeigt sich jedoch die Tendenz, dass der saisonale Abstieg an Bet v 1-spezifischem IgE im Verlauf der SIT gedämpft wird. Unbehandelte Allergiker wiesen innerhalb der Pollensaison einen tendenziell erhöhten Bet v 1-spezifischen IgE-Titer im Vergleich zu Allergikern auf, die eine SIT bekommen haben; insbesondere in Jahr 2 und 3 der Behandlung (Abb. 9).

Es ist bekannt, dass Allergen-spezifisches IgG, insbesondere IgG4 eine wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion durch eine SIT spielt. Daher wurde des Weiteren der Bet v 1-spezifische IgG-Titer der Patienten ermittelt. Bei unbehandelten Birkenpollenallergikern konnte zum größten Teil nur ein niedriger Titer an Bet v 1-spezifischen IgG Antikörper nachgewiesen werden, sowohl außerhalb als auch innerhalb der Saison (Abb. 10).

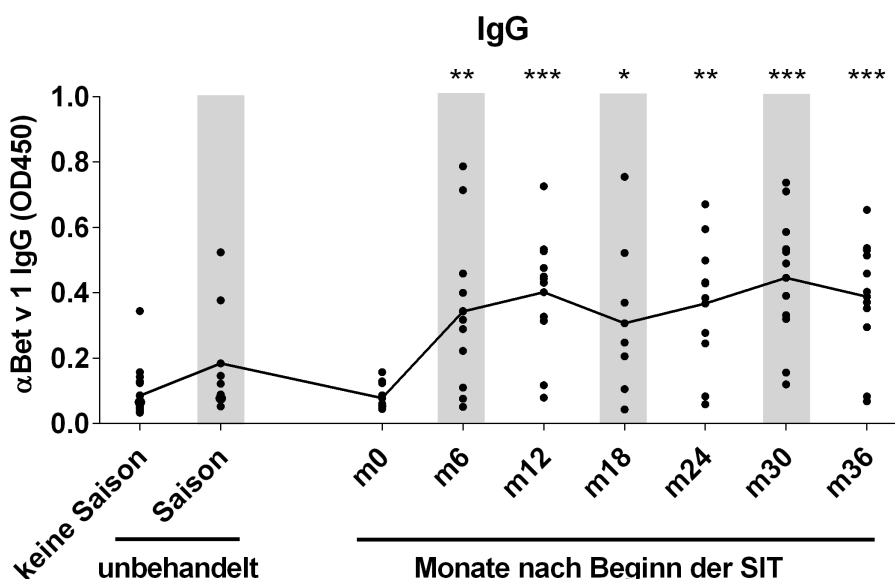


Abbildung 10: Relativer Titer von Bet v 1-spezifischen IgG-Antikörpern. Vergleich von unbehandelten Birkenpollenallergikern außerhalb oder innerhalb der Pollenflugsaison mit Patienten unter 36-monatiger Immuntherapie. SIT führt zu signifikantem Anstieg des Bet v 1-spezifischen IgG-Titers in den ersten 6 Monaten nach Beginn der Therapie. Der erhöhte IgG-Titer bleibt konstant über den SIT-Verlauf. Dargestellt sind individuelle Datenpunkte (n=8-11), sowie der Mittelwert. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001. Graue Bereiche kennzeichnen Pollenflugsaison. Repräsentative Darstellung von einer aus drei unabhängigen Messungen.

Bereits in den ersten sechs Monaten nach Beginn der SIT zeigten die behandelten Patienten einen signifikanten Anstieg des Bet v 1-spezifischen IgG-Titers. Dieser blieb über den gesamten Verlauf der SIT signifikant erhöht (Abb. 10).

IgG-Antikörper werden anhand struktureller und funktioneller Eigenschaften in vier Subklassen unterteilt. Häufig wird in der Literatur lediglich der Titer von IgG4 im Verlaufe einer SIT analysiert. Die Analyse aller IgG-Subklassen gibt hier ein genaueren Einblick, welche Art von IgG-Antikörper

produziert werden. Der Titer an IgG1 stieg in den ersten 12 Monaten signifikant an. Im weiteren Verlauf wurde der Titer an IgG1 leicht reduziert, ohne auf das Anfangsniveau abzufallen (Abb. 11A). Für den blockierenden Antikörper IgG4 konnte ein signifikanter kontinuierlicher Anstieg des Titers über den gesamten Verlauf der SIT nachgewiesen werden (Abb. 11D). Der Verlauf von IgG2 glich dem des Gesamt-IgGs (Abb. 11B). Für IgG3 konnte kein erhöhter Titer festgestellt werden (Abb. 11C).

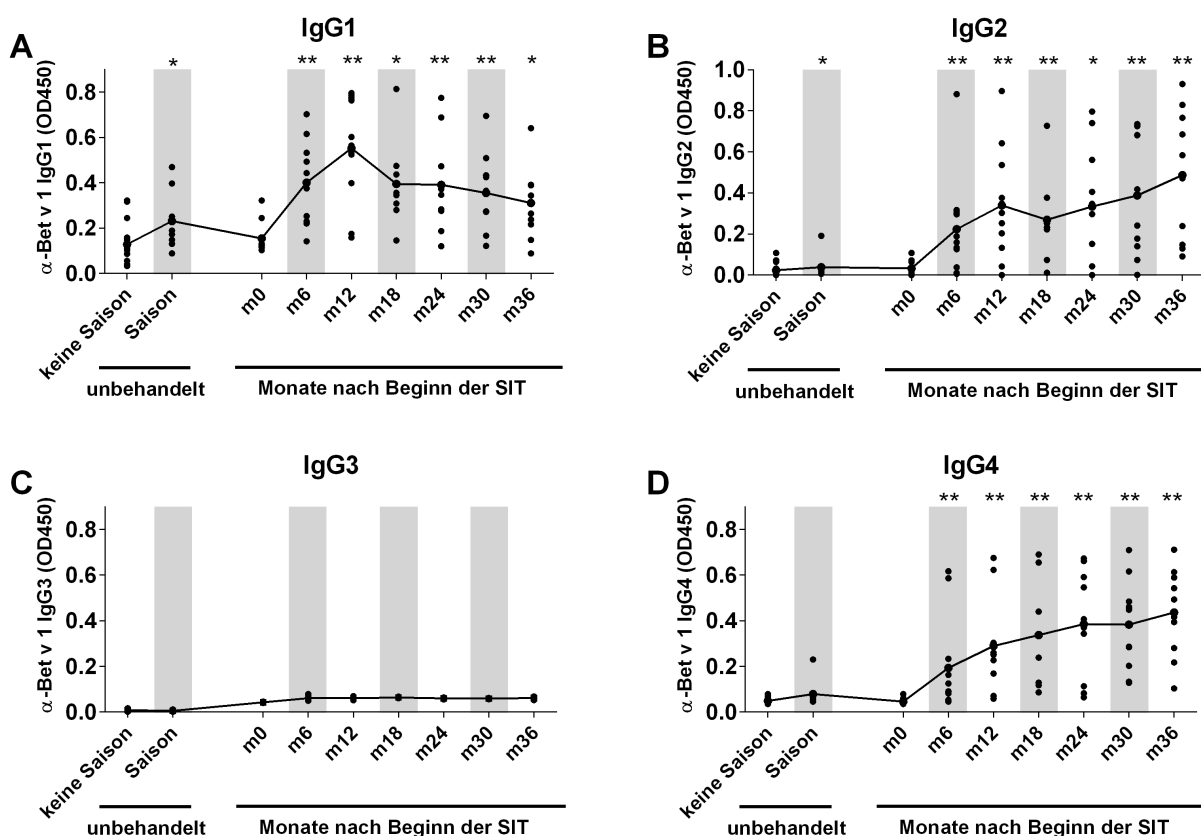


Abbildung 11: Relativer Titer von Bet v 1-spezifischen IgG-Subklassen. Untersuchung des relativen Titers von IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C), IgG4 (D). Vergleich von unbehandelten Birkenpollenallergikern außerhalb oder innerhalb der Pollenflugsaison mit Patienten unter 36-monatiger Immuntherapie. SIT führte zu signifikantem Anstieg in Bet v 1-spezifischen IgG1, IgG2 und IgG4. Dargestellt sind individuelle Datenpunkte (n=8-11), sowie der Mittelwert. *: p<0,05, **: p<0,01. Graue Bereiche kennzeichnen Pollenflugsaison. Repräsentative Darstellung von einer aus drei unabhängigen Messungen.

4.2 Aufreinigung von Bet v 1-spezifischem IgG

Die Wirkung eines Antikörpers wird nicht nur durch seine Subklasse, sondern auch durch seine Fc-Glykosylierung bestimmt. Für die Analyse des Glykosylierungsmusters von Bet v 1-spezifischem IgG war es essentiell, und eine der großen Herausforderung dieser Arbeit eine ausreichende Menge an spezifischem IgG aufzureinigen. Zunächst wurde über Protein-G-Sepharose das Gesamt-IgG aufgereinigt. Anschließend wurde durch zweimaliges Auftragen auf Bet v 1-gekoppelte Sepharose spezifische Antikörper aufgereinigt. Beim konventionellen Protokolle wird dieses IgG eluiert, dessen Glykan enzymatisch abgespalten und analysiert. Aufgrund des begrenzten Probenvolumens und

der relativ geringen Menge an spezifischem IgG führte dieses Vorgehen zu einer unzureichenden Ausbeute an Glykanen von spezifischem IgG. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Aufreinigungsmethode entwickelt, bei dem im letzten Aufreinigungsschritt an der Säule gebundenes spezifisches IgG direkt mit EndoS inkubiert wurde. Die dabei freiwerdenden Glykane konnten anschließend mittels HPLC analysiert werden (Abb. 12).

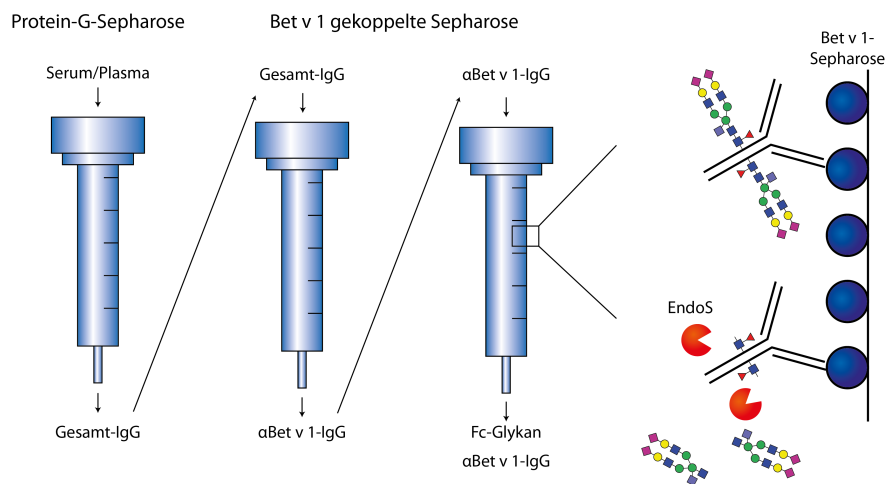


Abbildung 12: Aufreinigungsprinzip zur Isolation von α Bet v 1-IgG-Ak. Schematische Darstellung des verwendeten Aufreinigungsprotokolls. Nach der Aufreinigung von Gesamt-IgG aus Patienten-Serum wurden über Bet v 1-gekoppelte Sepharose in zwei Schritten Bet v 1-spezifische IgG-Ak isoliert. Nach erfolgter Bindung an die Bet v 1-Sepharose im zweiten Schritt wurden gebundene α Bet v 1-IgG-Ak mit Endoglykosidase S (EndoS) inkubiert und das freiwerdende Fc-Glykan eluiert. Anschließend erfolgte die Elution von α Bet v 1-IgG-Ak für die Kontrolle der Aufreinigung.

Die an der Säule verbliebenen α Bet v 1-IgG wurden eluiert und im ELISA auf ihre Reinheit untersucht. Da alle Patienten einen deutlichen Titer an Tetanustoxoid (Tet)-spezifischen IgG aufwiesen, konnte dies als Marker für eine nicht-Bet v 1-spezifische Verunreinigung in der Elution verwendet werden (Abb. 13). Durch den ersten Schritt der Aufreinigung über die Protein G Sepharose ging nur ein geringer Teil der α Bet v 1-IgG-Menge verloren. Jedoch kommt es durch zwei weitere Aufreinigungen über Bet v 1-gekoppelte Sepharose zu einem gewissen Verlust an α Bet v 1-IgG (Abb. 13A). Trotz dieser Verluste war die verbliebene Menge noch ausreichend für die nachfolgende Glyko-Analyse mittels HPLC.

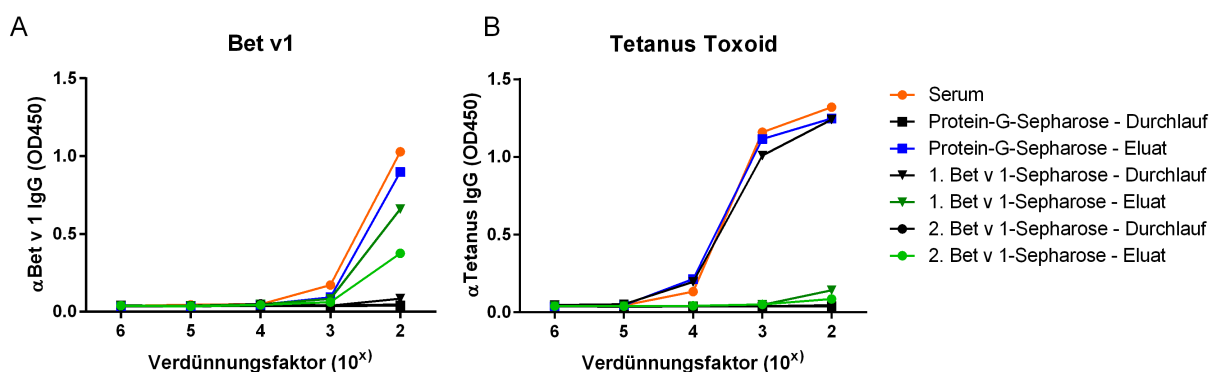


Abbildung 13: Kontrolle der α Bet v 1-IgG-Aufreinigung anhand von α Tetanustoxoid (Tet)-IgG als unspezifisches IgG. Untersuchung von α Bet v 1- (A) und α Tet-IgG (B) zur Überprüfung einzelner Aufreinigungsschritte. Verdünnungsfaktoren geben Verdünnung der Eluate an. Andere Proben wurden entsprechend ihres Volumens angepasst. Repräsentativ für zwei Messungen.

Die Kontrolle mit Tetanustoxoid zeigte, dass im Gesamt-IgG („Protein-G-Sephrose Eluat“) noch die gleiche Menge α Tet-IgG vorhanden ist wie im Ausgangsserum. Bei den Eluaten der Bet v 1-gekoppelten Sepharose wurde deutlich, dass hier kein α Tet-IgG mehr detektiert wurde. Das α Tet-IgG befindet sich im Durchlauf der ersten Bet v 1-spezifischen Aufreinigung (Abb. 13B). Somit konnte für die folgende Glykan-Analyse von einer hohen Reinheit des α Bet v 1-IgG ausgegangen werden.

4.3 Glykoanalyse der Bet v 1-spezifischen IgG

Nachdem die Reinheit des aufgereinigten α Bet v 1-IgG kontrolliert wurde, erfolgte die Analyse des Fc-Glykanprofils mittels HPLC. Der Anteil an pro-inflammatorischem agalaktosyliertem IgG (G0) beträgt in gepooltem Gesamt-IgG gesunder Spender (intravenöses IgG, IVIg) ca. 25 %. Bei unbehandelten Patienten, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Saison war der G0-Anteil bei α Bet v 1-IgG vergleichbar zu IVIg. Trotz leichter Schwankungen im Bereich von 25 bis 40 % gab es über den Verlauf der SIT keine signifikante Änderung des G0-Gehalts der α Bet v 1-IgG (Abb. 14). Im Gesamten lag der G0-Gehalt der untersuchten Patientenproben unterhalb des G0-Gehalts, welcher bei Autoantikörpern von Patienten mit rheumatischer Arthritis zu finden ist (49).

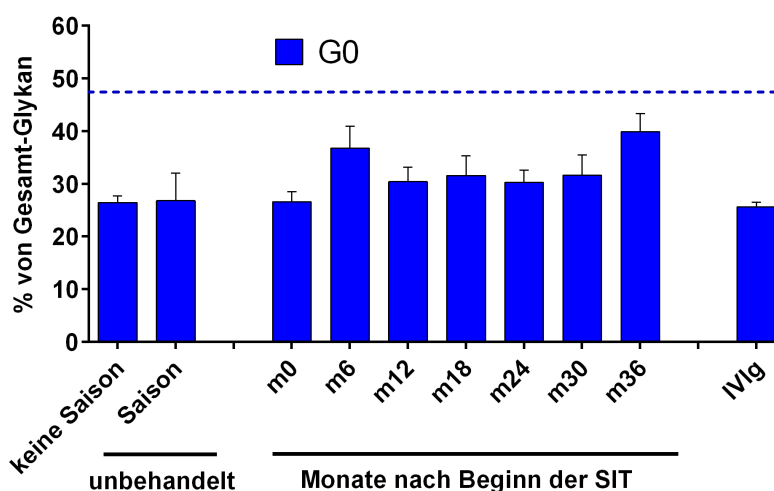


Abbildung 14: Anteil an agalaktosyliertem (G0) α Bet v 1-IgG bleibt unverändert im Verlauf der SIT. Vergleich von unbehandelten Birkenpollenallergikern außerhalb oder innerhalb der Pollenflugsaison mit Patienten unter 36-monatiger Immuntherapie, sowie gepooltes Gesamt-IgG von gesunden (IVIg). Mittels EndoS geschnittenes Glykan wurde über HPLC analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert+SEM von n=5-11. Blau gestrichelte Linie zeigt durchschnittlichen G0-Gehalt von Autoantikörpern bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (49). Repräsentativ für zwei Messungen.

Der Gehalt an terminaler Sialinsäure ist ausschlaggebend für die niedrig inflammatorische Wirkung von IgG (42). Der geringe Menge an α Bet v 1-IgG, welches in unbehandelten Patienten vorhanden ist, weist bereits einen Sialinsäuregehalt von 12 bis 15 % auf, vergleichbar mit dem Sialinsäuregehalt von Gesamt-IgG in IVIg. Die durch die SIT induzierten α Bet v 1-IgG zeigen ebenfalls einen Sialinsäuregehalt ähnlich wie IVIg (Abb. 15).

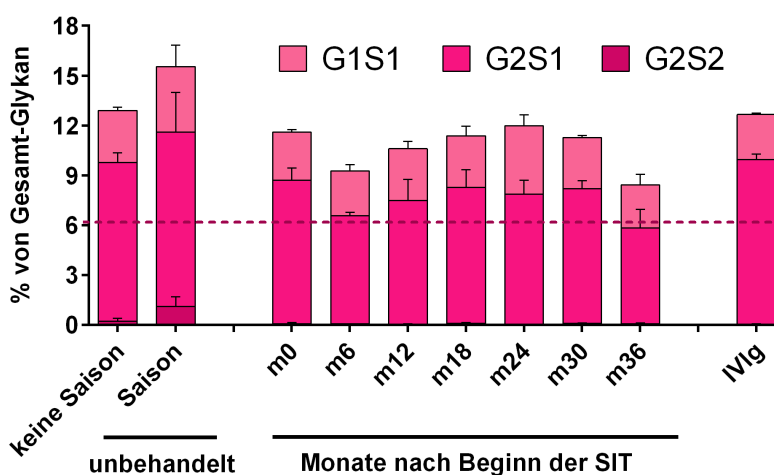


Abbildung 15: Anteil an sialylierten α Bet v 1-IgG im Verlauf der SIT vergleichbar mit anti-inflammatorischem IVIg. Vergleich von unbehandelten Birkenpollenallergikern außerhalb oder innerhalb der Pollenflugsaison mit Patienten unter 36-monatiger Immuntherapie, sowie gepooltes IgG von gesunden (IVIg). Mittels EndoS geschnittenes Glykan wurde über HPLC analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert+SEM von n=5-11. Magenta-farbende gestrichelte Linie zeigt durchschnittlichen Sialinsäure-Gehalt von Autoantikörpern bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (49; 50). Repräsentativ für zwei Messungen.

Der Gehalt an Galaktose und Sialinsäure in Gesamt-IgG wies eine deutliche individuelle Variation auf (Abb. 20, [Anhang]). Trotz individueller Schwankungen wiesen jedoch alle Patienten einen höheren Sialinsäuregehalt im IgG auf, als dies bei Autoantikörpern bei Patienten mit rheumatischer Arthritis der Fall ist (49; 50).

Sowohl unbehandelte Patienten als auch die hier analysierten SIT Patienten, welche eine Alumnhaltige Therapie erhalten haben wiesen keine Veränderung im Sialinsäuregehalt der α Bet v 1-IgG über die Zeit auf. Das nachfolgende Experiment zeigt jedoch, wie wichtig es ist, dass es das Ziel eines SIT-Protokolls sein sollte, einen hohen Anteil an sialylierten *de novo* produzierten α Bet v 1-IgG zu induzieren.

4.4 Glykosylierung der SIT-IgG beeinflussen die ROS-Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten

Derzeit werden viele neue SIT-Protokolle mit dem Ziel der stärkeren Induktion von Allergen-spezifischen IgG-Ak entwickelt. Das folgende Experiment sollte untersuchen, inwiefern die Fc-Glykosylierung der bei einer SIT induzierten IgG-Ak einen Einfluss auf das inflammatorische Potential der Antikörper nimmt. Zu diesem Zweck wurden die Fc-Glykosylierung des Gesamt-IgG von Patienten, welche Bet v 1-spezifische IgG-Ak enthalten, *in vitro* modifiziert. Eine vorherige Antigen-spezifische Aufreinigung war aufgrund des geringen Titors an α Bet v 1-IgG nicht möglich. Die verschiedenen Glykovarianten wurden in einem humanen Neutrophilen-Aktivierungsassay analysiert. Zur Untersuchung der Aktivität von verschiedenen sialylierten α Bet v 1-IgG wurde per Zufall mehrere Patientenproben ausgewählt. Die aufgereinigten Glykane des Gesamt-IgG dieser Patienten wiesen einen Sialinsäuregehalt von ca. 15 % auf. Durch die *in vitro* enzymatische Desialylierung wurde der Anteil an Glykanen, welche Sialinsäure enthielten, auf 1-5 % reduziert (Abb. 16). Der Galaktosegehalt der Proben betrug ca. 80 % und wurde durch die enzymatische Behandlung nicht verändert (Abb. 22 [Anhang]).

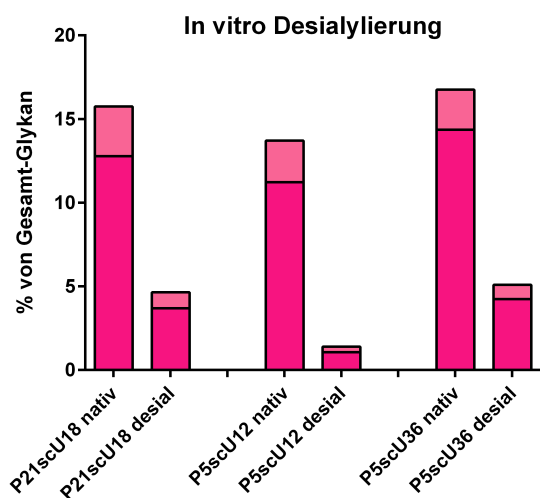


Abbildung 16: *In vitro* Desialylierung von Patienten-IgG. Enzymatische Behandlung von Gesamt-IgG aus Serum von SIT-Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie. Mittels EndoS geschnittenes Glykan wurde über HPLC analysiert. Reduzierung der Sialylierung von 15 % auf 1-5 %. P21scU18: Patient 21 der subkutanen SIT, Monat 18 nach Therapiebeginn, andere Proben analog. Repräsentative Darstellung aus zwei unabhängigen Messungen und weitere Patientenproben.

Um sicherzustellen, dass eventuelle funktionelle Unterschiede nicht auf unterschiedliche Affinitäten der verschiedenen sialylierten IgG zurückzuführen waren, wurde ein Affinitäts-ELISA durchgeführt. Wie in Abb. 17 ersichtlich, hatte die enzymatische Desialylierung keinen Einfluss auf die Affinität der getesteten Antikörper. Die entsprechenden Paare nativer und desialylierter Patienten-IgG zeigen eine vergleichbare Kapazität, Bet v 1 zu binden. Unterschiede zwischen den einzelnen Patientenproben waren auf individuelle und Zeitpunkt-bezogene Differenzen im Titer von Bet v 1-IgG zurückzuführen.

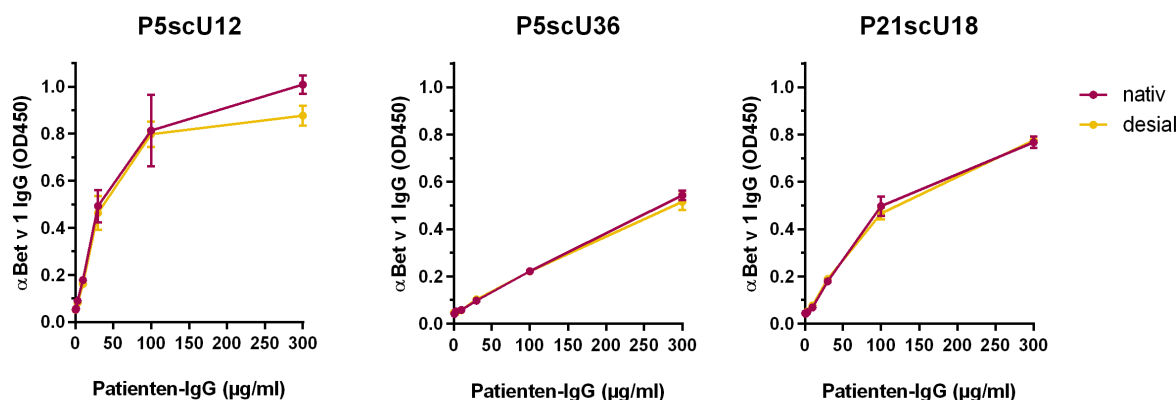


Abbildung 17: Desialylierung hat keinen Einfluss auf die Affinität der Patienten-IgG zu Bet v 1. Zur Detektion Bet v 1-spezifischer IgG wurde immobilisiertes Bet v 1 mit der angegebenen Menge an Gesamt-IgG inkubiert. Korrespondierende native (magenta) und desialytierte Proben (gelb) zeigen vergleichbare Affinität zum Allergen (n=2).

Obwohl über neutrophile Granulozyten im Kontext von allergischen Erkrankungen noch nicht viel bekannt ist, wurde in den letzten Jahren mit zahlreichen Indizien nachgewiesen, dass Neutrophile eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie und der Entwicklung von allergischen Erkrankungen spielen. Daher wurden die verschiedenen sialylierten Patienten-IgG hinsichtlich ihrer Kapazität untersucht, die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) bei neutrophilen Granulozyten zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden normale humane neutrophile Granulozyten von gesunden Spendern mit immobilisierten Immunkomplexen aus Bet v 1 und nativem bzw. desialytiertem α Bet v 1-IgG von drei verschiedenen Patientenproben inkubiert.

Sowohl die Inkubation der Neutrophilen mit Bet v 1 allein (Abb. 18, schwarz) als auch mit Immunkomplexen aus Bet v 1 und nativem Patienten IgG (magenta, 15 % Sialinsäure) resultierten in einer minimalen Induktion der ROS-Freisetzung. Durch die enzymatische Behandlung der Patienten-IgG mit Sialidase konnte der Sialinsäuregehalt der entsprechenden desialytierten Proben auf 1-5 % reduziert werden. Immunkomplexe aus Bet v 1 und dem so modifizierten Patienten-IgG zeigen ein hohes Potential, Neutrophile zur ROS-Freisetzung zu stimulieren. Die Freisetzung erfolgt je nach Patientenprobe nach bis zu 10 Minuten und erreicht zwischen 20 und 40 Minuten ihr Maximum (Abb. 18).

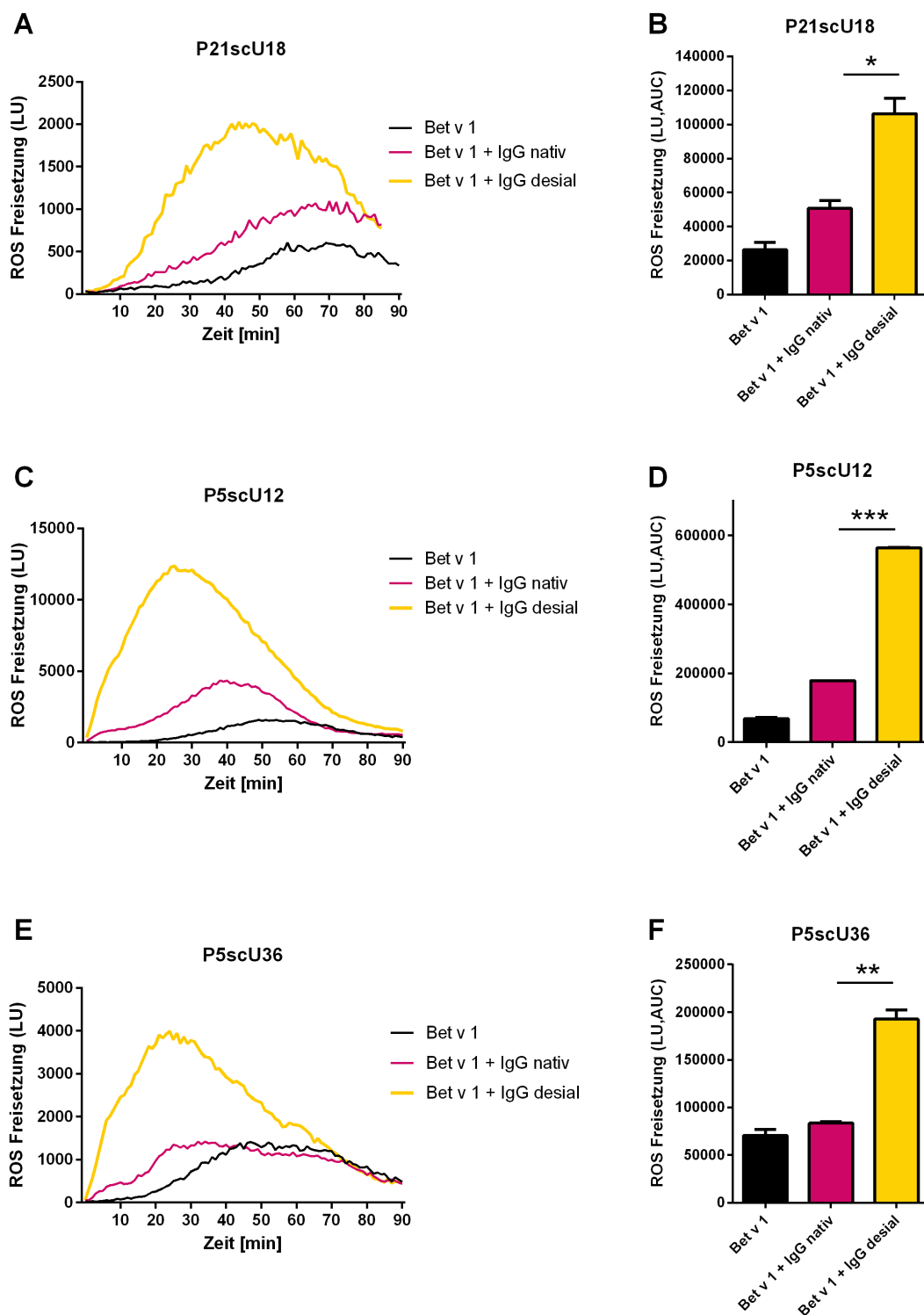


Abbildung 18: *In vitro*-Desialylierung von Patienten-IgG führt zu einer erhöhten Aktivierung von humanen neutrophilen Granulozyten. Humane neutrophile Granulozyten von gesunden Spendern wurden mit immobilisierten Immunkomplexen aus Bet v 1 und nativem bzw. desialytiertem Patienten-IgG inkubiert. A,C,E: Mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz wurde die relative Menge an produzierten Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über 1,5 h bei 37 °C analysiert. B,D,F: Quantifizierung der ROS-Bildung durch die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC, *area under the curve*). P21scU18: Patient 21 der subkutanen SIT, Monat 18 nach Therapiebeginn, andere Proben analog. Repräsentative Darstellung von je einem Experiment (n=2) aus wenigstens zwei Experimenten pro Probe.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der Titer an α Bet v 1-IgG, besonders IgG1 und IgG4, im Verlauf der SIT ansteigt. Diese Allergen-spezifischen Antikörper weisen eine niedrig-inflammatorische Glykosylierung auf, welche vergleichbar mit gepooltem Spender-IgG (IVIg) ist. Wurde jedoch die Glykosylierung des Patienten-IgG *in vitro* desialyliert, so konnte in einem Assay zur Neutrophilenaktivierung ein höheres inflammatorische Potential dieser modifizierten Antikörper festgestellt werden. Dies zeigt, wie wichtig die Induktion von niedrig-inflammatorischen Allergen-spezifischer IgG-Ak während einer SIT ist. Dies sollte in der Entwicklung neuer SIT-Protokolle beachtet werden, da es sonst zu einer inflammatorischen Wirkung der induzierten Allergen-spezifischen IgG-Ak führen kann.

5 Diskussion

Die Spezifische Immuntherapie (SIT) ist derzeit die einzige immunmodulatorische Behandlungsoption bei allergischen Reaktionen gegen Aeroallergene wie Pollen. Durch diese Behandlung werden Allergen-spezifische IgG-Antikörper (Ak) induziert. Bisher ist noch nicht bekannt, wie sich die SIT auf die Fc-Glykosylierung und das damit verbundene inflammatorische Potential dieser Antikörper auswirkt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Allergen-spezifische IgG-Antwort in unbehandelte Birkenpollernallergikern innerhalb und außerhalb der Saison sowie in Patienten, welche über 3 Jahre eine SIT bekommen haben. Die Allergen-spezifische IgG-Antwort wird weiterhin auf ihre Subklassen untersucht. Als Kernpunkt der vorliegenden Arbeit wurden Bet v 1-spezifische IgG-Ak der untersuchten Patienten isoliert und ihre Fc-Glykosylierung analysiert. Weiterhin wird der Einfluss der Fc-Glykosylierung auf das inflammatorische Potential der IgG Antikörper untersucht.

Im Gegensatz zu Allergenkarrenz und symptomatischer Behandlung ist eine SIT derzeit die einzige Möglichkeit, den allergischen Krankheitsverlauf zu modulieren (77; 78; 79; 80). Insbesondere entwickeln therapierte Allergiker seltener neue Sensibilisierungen gegen andere Allergene (81; 82) und weisen eine geringere Wahrscheinlichkeit auf, Asthma zu entwickeln (17; 18; 83; 84). Daher ist es notwendig, den Wirkmechanismus bereits gut etablierter, erfolgreicher Therapieansätze zu verstehen. Eine konventionelle subkutane SIT (SCIT) erfordert durch monatliche Injektionen über drei bis fünf Jahre eine hohe Komplianz der Patienten. Auch wird nur bei ca. 73% der behandelten Patienten eine Besserung der Allergiesymptomatik beobachtet (81). Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren vermehrt neue Therapien zur spezifischen Behandlung von Allergien entwickelt, welche sich unterschiedliche Allergenformen sowie verschiedene Anjuvantien zunutze machen. Ziel dieser neuen Therapie ist es, erhöhte Titer an Allergen-spezifischen IgG-Ak zu induzieren (19; 72; 73). In diesem Zusammenhang ist unklar, welche IgG-Subklassenverteilung und welche Fc-Glykosylierung den besten Effekt bei der Toleranzinduktion aufweist.

5.1 IgE und IgG Subklasse Antikörperantworten in unbehandelten und SIT-behandelten Patienten

Die Seren und Plasmen der in der Studie eingeschlossenen Patienten wurden hinsichtlich der Titer von Bet v 1-spezifischem IgE und IgG untersucht. Laut einer Studie an Bienenallergikern wurde festgestellt, dass eine geringe Menge an Allergen, wie sie bei einzelnen oder seltenen Expositionen vorkommt, zur Produktion von IgE führt. Hohe Allergenmengen oder häufige Expositionen, wie sie im Falle einer SIT oder während natürlicher Toleranzentwicklung vorkommen, resultieren in der Produktion von spezifischem IgG (85).

Die Auswirkung einer SIT auf den Titer des spezifischen Serum-IgE wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird beschrieben, dass durch eine SIT nach einem zunächst initialen Anstieg des spezifischen IgE-Titer ein kontinuierlicher Rückgang, besonders in der Saison, zu verzeichnen ist (78; 86; 87). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien entweder kein oder nur eine sehr geringe Veränderung des spezifischen IgE-Titers beobachtet (88; 89).

Zwar ist belegt, dass IgE-Antikörper eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie allergischer Reaktionen des Typ1 einnehmen, doch auch bei den hier untersuchten Patienten konnte über den Verlauf der dreijährigen SIT keine signifikante Veränderung im Bet v 1-spezifischen IgE Titer festgestellt werden, obwohl die SIT sowohl zu einer Verbesserung des klinischen Scores als auch zu einer verringerten Hautreaktivität im Pricktest geführt hat. Tendenziell war eine Schwächung des saisonalen Anstiegs des IgE-Titers durch die SIT zu verzeichnen.

Anders als bei dem IgE konnte in der vorliegenden Studie ein kontinuierlicher Anstieg an Bet v 1-spezifischem IgG beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der SIT zu einer transienten Induktion von Bet v 1-spezifischem IgG1 im ersten Jahr kommt. Ab Monat 12 der Behandlung fällt der Titer wieder ab. Auch unbehandelte Patienten zeigen einen leichten Anstieg an Bet v 1-spezifischem IgG1 innerhalb der Pollenflugsaison. Der Anstieg während der ersten Saison nach Beginn der Behandlung könnte auf eine Reaktivierung von vorhandenen Gedächtniszellen zurückzuführen sein. Weiterhin kommt es zu einer kontinuierlichen Erhöhung des Titers an Bet v 1-spezifischem IgG2 und vor allem Bet v 1-spezifischem IgG4. Besonders IgG4 wird als ein Toleranzantikörper angesehen, der unter dem Einfluss von IL-4 und IL-10 entsteht und den Bet v 1-spezifischem IgG1-Ak entgegenwirkt. Diese Ergebnisse entsprechen Beobachtungen früherer Studien (19; 27; 28; 30; 78; 90).

Es wird diskutiert, dass die produzierte Allergen-spezifischen IgG die IgE-vermittelte allergische Reaktion durch Antigenmaskierung und Kreuzvernetzung von inhibitorischem Fc γ RIIB inhibieren (34; 35; 91; 92). In unserem Labor konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass murines IgG1, welches strukturell dem humanen IgG4 entspricht, eine IgE-vermittelte systemische Anaphylaxie in Abhängigkeit von Fc γ RIIB inhibiert (93). Kürzlich wurde weiterhin gezeigt, dass die Bindung von IgE, IgG1 und IgG4 an verschiedene Epitope von Bet v 1 unterschiedlich ist (33). Dies lässt vermuten, dass Allergen-spezifische IgG, die während einer SIT entstehen, neben der Antigenmaskierung noch andere Mechanismen zur Toleranzinduktion nutzen.

5.2 Einfluss der SIT auf die Glykosylierung der Antigen-spezifischen IgG

Die immunmodulatorische Wirkung von Antikörpern wird nicht nur über das Fab-Fragment, wie bei der Antigenmaskierung, vermittelt. Der Fc-Teil des Antikörpers vermittelt über die Bindung an Rezeptoren die Regulierung der Aktivität von Immunzellen. Es ist bekannt, dass die Fc-Glykosylierung von IgG-Antikörpern dabei einen entscheidenden Einfluss auf das pro- bzw. anti-inflammatorische Potential hat (42; 44; 94). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass sialylierte murine IgG1-Ak Immunantworten inhibieren können (44; 69; 70; 68), möglicherweise vermittelt durch inhibitorische Signale über Glykan-bindende Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Familie wie SIGN-R1 oder DCIR (44; 47; 71). Weiterhin wurde gezeigt, dass agalaktosylierte murine IgG1-Ak ihrerseits Immunreaktionen auslösen (93). Bezüglich humaner IgG-Subklassen ist der Rolle der Fc-Glykosylierung noch unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fc-Glykosylierung von Bet v 1-spezifischem IgG untersucht werden, welches im Laufe einer dreijährigen SIT produziert wurde. Frühere Daten zeigten, dass die Bet v 1-spezifischen IgG-Ak von 2 Patienten, welche im Anschluss einer erfolgreich abgeschlossene SIT analysiert wurden, eine niedrig inflammatorische Glykosylierung vergleichbar mit IVIg und gesunden Kontrollen aufwies (69). In der vorliegenden Studie wurde analysiert, welches Glykosylierungsmuster Bet v 1-spezifischen IgG bei unbehandelten Patienten innerhalb und außerhalb der Saison ausweisen, sowie seine Entwicklung im Laufe einer SIT und im Vergleich zum Behandlungsbeginn.

Unbehandelte Birkenpollenpatienten zeigen einen niedrigen Serumtiter an Bet v 1-spezifischen IgG. Die Analyse der Glykanstruktur zeigte, dass bereits diese geringe Menge an Allergen-spezifischem IgG einen Sialinsäuregehalt von 10-15 % ausweist, welches vergleichbar mit anti-inflammatorischem IVIg(42; 94) ist und deutlich den Sialinsäuregehalt übersteigt, der bei Autoantikörpern von Patienten mit rheumatoider Arthritis zu finden ist (49; 50). Die während der SIT *de novo* gebildeten Bet v 1-spezifischen IgG zeigen ebenfalls einen hohen Anteil an Sialinsäure.

Zur Verstärkung einer Immunantwort sowie zur Generierung einer Depotwirkung wird in den aktuell gängigen subkutanen SIT-Protokollen, wie auch bei den untersuchten Patienten, Alum als Adjuvant verwendet. Um die Effizienz von Immuntherapien zu erhöhen und einen höheren Titer an Allergen-spezifischem IgG zu erhalten, werden derzeit verschiedene neue Adjuvantien wie z.B. das LPS-Derivat MPLA in SIT-Protokollen etabliert (19; 72; 73). Bei der Entwicklung neuer Therapien wird immer mehr versucht, die Immunantwort sowie die Produktion von Allergen-spezifischem IgG zu verstärken. Hierbei besteht die Gefahr, dass bei hohen Antigen Dosen auch aktivierende Fc γ Rs angeregt werden (92). Eine zu hohe Induktion von IgG birgt hier das Potential, anaphylaktische Reaktionen auszulösen (35; 91; 92; 95; 96). In diesem Zusammenhang scheint die Glykosylierung der produzierten IgGs entscheidend. Eine erfolgreiche SIT sollte einen hohen Anteil an sialylierten Allergen-spezifischen IgG-Ak induzieren. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass sialylierte murines IgG1 und 2b eine IgG-vermittelte Anaphylaxie inhibieren können (93). Ob es einen funktionellen Unterschied zwischen verschiedenen glykosylierten human IgG1, 2 und 4 gibt muss noch untersucht werden.

Es ist bekannt, dass das inflammatorische Milieu bei Antigenpräsentation über die Glykosylierung der antigenspezifischen Antikörper entscheidet. So konnte in Ovalbumin (OVA)-immunisierten Mäusen gezeigt werden, dass verschiedene Adjuvantien die Fc-Glykosylierung beeinflussen (69; 70). Die Injektion von OVA in Verbindung mit stark inflammatorischem eCFA (*enhanced Complete Freund's Adjuvant*) führte zu einem sehr niedrigen Anteil an sialylierten Antigen-spezifischen Antikörpern, wohingegen die Injektion von OVA mit Alum, wie es in etablierten SIT-Protokollen verwendet wird, eine hohe Sialylierung der Antikörper zur Folge hatte, vergleichbar mit der Glykosylierung unter Gleichgewichtsbedingungen. Diese Beobachtungen wurden durch die korrespondierende Expression der Sialyltransferasen in antigenspezifischen Plasmazellen gestützt(69; 70).

Vorläufige Daten weisen darauf hin, dass auch die Verwendung von MPLA, wie es in neueren SIT-Protokollen verwendet wird, im Mausmodell zu einem hohen Anteil an sialylierten antigenspezifischen IgGs führen (Abb. 23, Anhang). Es wird daher davon ausgegangen, dass auch bei einer SIT die Glykosylierung der produzierten Allergen-spezifischen IgG, abhängig vom verwendeten Adjuvant, Einfluss auf das Potential das inflammatorische Potential der Antikörper hat.

5.3 Einfluss der Sialylierung auf die Aktivität von Effektorzellen

Während einer SIT produzierte Bet v 1-spezifische IgG-Ak weisen einen hohen Anteil an sialylierten Antikörpern auf. Zur Untersuchung des Einflusses der Sialylierung der Allergen-spezifischen IgG-Ak wurden verschiedenen sialylierte Bet v 1-spezifisches Patienten-IgG in einem Assay zur Neutrophilenaktivierung untersucht.

Obwohl über neutrophile Granulozyten im Kontext von allergischen Erkrankungen noch nicht viel bekannt ist, wurde in den letzten Jahren mit zahlreichen Indizien gezeigt, dass Neutrophile eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie und der Entwicklung von allergischen Erkrankungen spielen. Neutrophile nehmen eine Kernrolle in der Effektorphase von allergischen Hautentzündungen ein (97; 98). Weiterhin ist bei Pollenallergikern, besonders bei Asthmapatienten nach Polleninhalation, eine deutliche Infiltration von Neutrophilen zu beobachten, welche zur allergischen Sensitivierung und allergischen Entzündung beitragen (99; 100; 101). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Neutrophilen in die Atemwege abhängig von TLR4 und CXCR2 ist (101; 102). Auch konnte nachgewiesen werden, dass Mediatoren, die von den hauptverantwortlichen Zellen von Allergien, den Mastzellen, ausgeschüttet werden, Effektorfunktionen in murinen Neutrophilen fördern (103). Wurden Allergiker mit einer SIT behandelt, so konnte gezeigt werden, dass die CD11b-Expression sowie die LPS-induzierte NF κ B-Aktivierung von Neutrophilen durch die Therapie reduziert wurde (104; 105).

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die während einer SIT produzierten Bet v 1-spezifischen IgG-Ak abhängig von ihrer Glykosylierung Einfluss auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nehmen. Zu diesem Zweck wurde Bet v 1-spezifische IgG-Ak von SIT-Patienten *in vitro* enzymatisch desialyliert und im Vergleich zu ihrem korrespondierenden nativen IgG mit einer hohen Sialylierung auf ihr Potential zur Neutrophilenaktivierung hin untersucht. Es wurde gezeigt, dass native, hoch sialylierte Bet v 1-IgG-Ak ebenso wie Bet v 1 allein kaum zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) von Neutrophilen führen, wohingegen die *in vitro*-desialylierten Varianten derselben Antikörper eine massiven Aktivierung der Zellen und ROS-Freisetzung zur Folge hatte.

Dieses Potential niedrig sialylierter IgGs, Neutrophile zu aktivieren, könnte im Zusammenhang mit IgG-vermittelten Anaphylaxien eine entscheidende Rolle spielen. Es ist bekannt, dass Neutrophile den alternativen, IgG-vermittelten Weg einer systemischen Anaphylaxie in Mäusen vermitteln (106; 107). Zwar konnte im Menschen noch keine IgG-vermittelte Anaphylaxie direkt festgestellt werden, jedoch deuten verschiedene klinische Indizien, wie z.B. Anaphylaxien ohne messbare Aktivierung von Mastzellen oder Basophilen, auf deren Existenz hin (92).

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass besonders sialyliertes murines IgG1, welches strukturell und funktionell dem humanen IgG4 entspricht, eine IgG2b-vermittelte Anaphylaxie inhibieren kann (93). Anhand der vorliegenden murinen Ergebnisse ist es denkbar, dass sialylierte Bet v 1-IgG4-Ak eine humane IgG1-vermittelte Anaphylaxie inhibieren könnten. Bei der Entwicklung neuer SIT-Therapien gegen Allergien sollte daher auf einen hohen Anteil an Sialylierung bei den induzierten Allergen-spezifischen IgG-Ak geachtet werden. Sollte durch die Wahl eines pro-inflammatorischen Adjuvants die Produktion von niedrig sialylierten Allergen-spezifischen IgG-Ak induziert werden, so könnten diese statt einer Toleranzinduktion eine IgG-vermittelte Anaphylaxie über eine Neutrophilenaktivierung auslösen (Abb. 19).

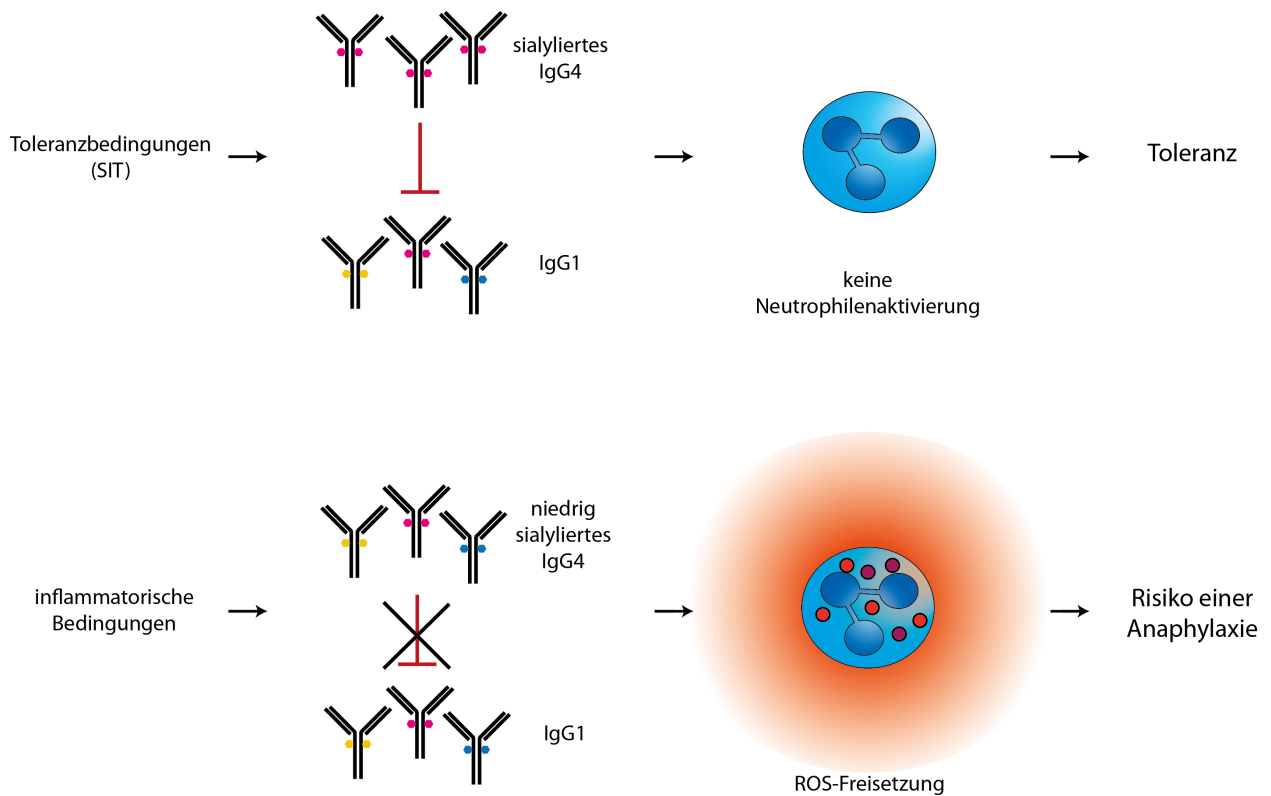


Abbildung 19: Hypothetisches Modell der Wirkung sialylierter Allergen-spezifischer IgG, die während einer SIT produziert werden. Findet die Antigenpräsentation wie im Falle einer konventionellen SIT unter Toleranzbedingungen statt, so wird ein hoher Anteil an sialylierten Allergen-spezifischen IgGs induziert. Es wird vermutet, dass sialylierte IgG4-Ak das inflammatorische Potential von IgG1-Ak inhibieren, sodass es zu keiner Aktivierung von Neutrophilen kommt. Unter proinflammatorischen Bedingungen entstehen niedrig sialylierte IgG-Ak, wodurch IgG4 nicht mehr inhibitorisch auf IgG1 wirken kann. Es kommt zu einer Aktivierung von Neutrophilen (ROS-Freisetzung), was die Gefahr einer IgG-vermittelten Anaphylaxie birgt.

5.4 Fazit und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Bet v 1-spezifischen IgG-Ak, die während einer spezifischen Immuntherapie produziert werden, eine niedrig inflammatorische Glykosylierung, vergleichbar zu IVIg, aufweisen. Zwar zeigte Bet v 1-spezifisches IgG bereits vor Beginn der SIT eine solche Glykosylierung, jedoch ist der Antikörpertiter sehr niedrig. Erst der durch die SIT erhöhte Bet v 1-spezifische IgG-Titer führt zu einer immunregulatorischen Wirkung der Antikörper.

Wie wichtig eine niedrig inflammatorische Glykosylierung der Bet v 1-spezifischen IgG ist, zeigen *in vitro*-Versuche mit neutrophilen Granulozyten. Werden die terminalen Sialinsäurereste entfernt, so führt dies zu einem pro-inflammatorischen Potential des Antikörpers. In zukünftigen Experimenten sollte der Einfluss der Fc-Glykosylierungen von Allergen-spezifischem IgG1 und IgG4 untersucht werden. Weiterhin sollte in Zukunft die Wirkung von verschiedenen glykosylierten Allergen-spezifischen IgG-Ak auf andere Effektorzellen allergischer Erkrankungen, sowie deren Wirkmechanismus analysiert werden. Besonders in der Entwicklung neuer Allergitherapien mit stärkeren Adjuvantien sollte die Glykosylierung der in der Therapie produzierten Antikörper kontrolliert werden, um eine inflammatorische Immunantwort zu vermeiden. Möglicherweise war die Entwicklung der konventionellen SIT-Therapie mit Alum ein Glücksfall hinsichtlich sowohl der IgG-Subklassenverteilung und der Fc-Glykosylierung. Zukünftige Therapien sollten in diesen Punkten der konventionellen Therapie nachempfunden werden.

Literatur

- [1] MURPHY, K: *Janeway's Immunology*. Garland Science, 2012.
 - [2] HUBER, B: *100 Jahre Allergie: Clemens von Pirquet – sein Allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende Krankheitsverständnis*. Wiener Klinische Wochenschrift, 118(19-20):573–9, 2006.
 - [3] KAY, A B: *Allergy and allergic diseases. First of two parts*. New England Journal of Medicine, 344(1):30–7, 2001.
 - [4] D'AMATO, G, L CECCHI, S BONINI, C NUNES, I ANNESI-MAESANO, H BEHRENDT, G LICCARDI, T POPOV und P VAN CAUWENBERGE: *Allergenic pollen and pollen allergy in Europe*. Allergy, 62(9):976–990, 2007.
 - [5] BOUSQUET, P J, S CHINN, C JANSON, M KOGEVINAS, P BURNEY und D JARVIS: *Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I*. Allergy, 62(3):301–309, 2007.
 - [6] BREITENEDER, H, K PETTENBURGER, A BITO, R VALENTA, D KRAFT, H RUMPOLD, O SCHEINER und M BREITENBACH: *The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene*. EMBO Journal, 8(7):1935–1938, 1989.
 - [7] JAROLIM, E, H RUMPOLD, A T ENDLER, H EBNER, M BREITENBACH, O SCHEINER und D KRAFT: *IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of Betula verrucosa*. Allergy, 44(6):385–95, 1989.
 - [8] BUFE, A, M D SPANGFORT, H KAHLERT, M SCHLAAK und W M BECKER: *The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity*. Planta, 199(3):413–415, 1996.
 - [9] FERNANDES, H, K MICHALSKA, M SIKORSKI und M JASKOLSKI: *Structural and functional aspects of PR-10 proteins*. FEBS Journal, 280(5):1169–1199, 2013.
 - [10] VIETHS, S, S SCHEURER und B BALLMER-WEBER: *Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen*. 48 Annals New York Academy of Sciences, 964:47–68, 2002.
 - [11] GALLI, S J, M TSAI und A M PILIPONSKY: *The development of allergic inflammation*. Nature, 454(7203):445–54, 2008.
 - [12] BISCHOFF, S C: *Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data*. Nature Reviews. Immunology, 7(2):93–104, 2007.
 - [13] LARCHÉ, M, C A AKDIS und R VALENTA: *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nature Review Immunology, 6(10):761–71, 2006.
 - [14] NOON, L: *Prophylactic Inoculation against Hay Fever*. The Lancet, Seiten 1572–1573, 1911.
 - [15] FREEMAN, J: *Further observations on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. Historical document*. Annals of allergy, 18:427–34, apr 1960.
-

-
- [16] BURKS, A W, M A CALDERON, T CASALE, L COX, P DEMOLY, M JUTEL, H NELSON und C A AKDIS: *Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 131(5):1288–1296, 2013.
- [17] JACOBSEN, L, B NIGGEMANN, S DREBORG, H A FERDOUSI, S HALKEN, A HØST, A KOIVIKKO, L A NORBERG, E VALOVIRTA, U WAHN und C MÖLLER: *Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-Year follow-up on the PAT study*. Allergy, 62(8):943–948, 2007.
- [18] SCHMITT, J, K SCHWARZ, E STADLER und E G WÜSTENBERG: *Allergy immunotherapy for allergic rhinitis effectively prevents asthma: Results from a large retrospective cohort study*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 136(6):1511–1516, 2015.
- [19] AKDIS, C A und M AKDIS: *Advances in allergen immunotherapy: Aiming for complete tolerance to allergens*. Science Translational Medicine, 7(280):280ps6, 2015.
- [20] AKDIS, M und C A AKDIS: *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 119(1):780–791, 2007.
- [21] NOVAK, N, N METE, C BUSSMANN, L MAINTZ, T BIEBER, M AKDIS, J ZUMKEHR, M JUTEL und C A AKDIS: *Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 130(5):2–9, 2012.
- [22] ROYER, B, S VARADARADJALOU, P SAAS, J J GUILLOSSON, J P KANTELIP und M AROCK: *Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10*. Clinical Experimental Allergy, 31(5):694–704, 2001.
- [23] SCHMID, J M, P A WÜRTZEN, R DAHL und H J HOFFMANN: *Early improvement in basophil sensitivity predicts symptom relief with grass pollen immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 134(3):741–744.e5, 2014.
- [24] SANTOS, A F, A DOUIRI, N B'ECARES, S Y WU, A STEPHENS, S RADULOVIC, S M H CHAN, A T FOX, G DU TOIT, V TURCANU und G LACK: *Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 134(3):645–652, 2014.
- [25] SANTOS, A F, L K JAMES, H T BAHNSON, M H SHAMJI, N C COUTO-FRANCISCO, S ISLAM, S HOUGHTON, A T CLARK, A STEPHENS, V TURCANU, S R DURHAM, H J GOULD und G LACK: *IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 135(5):1249–1256, 2015.
- [26] AKDIS, M und C A AKDIS: *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 133(3):621–631, 2014.
-

-
- [27] MÖBS, C, C SLOTSCH, H LÖFFLER, T JAKOB, M HERTL und W PFÜTZNER: *Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation*. Journal of Immunology, 184(4):2194–203, 2010.
- [28] MÖBS, C, H IPSEN, L MAYER, C SLOTSCH, A PETERSEN, P A WÜRTZEN, M HERTL und W PFÜTZNER: *Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 130(5), 2012.
- [29] MÖBS, C: *Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion unter spezifischer Immuntherapie mit inhalativen Allergenen*. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg, 2010.
- [30] AALBERSE, R C, R VAN DER GAAG und J VAN LEEUWEN: *Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response*. Journal of Immunology, 130(2):722–6, feb 1983.
- [31] JEANNIN, P, S LECOANET, Y DELNESTE, J F GAUCHAT und J Y BONNEFOY: *IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10*. Journal of Immunology, 160(7):3555–61, 1998.
- [32] MEILER, F., S. KLUNKER, M. ZIMMERMANN, C. A. AKDIS und M. AKDIS: *Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors*. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, 63(11):1455–1463, 2008.
- [33] GEPP, B, N LENGGER, C MÖBS, W PFÜTZNER, C RADAUER, B BOHLE und H BREITENENDER: *Monitoring the epitope recognition profiles of IgE, IgG1, and IgG4 during birch pollen immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, Seiten 1–5, 2015.
- [34] ZHU, D, C L KEPLEY, M ZHANG, K ZHANG und A SAXON: *A novel human immunoglobulin Fc gamma Fc epsilon bifunctional fusion protein inhibits Fc epsilon RI-mediated degranulation*. Nature Medicine, 8(5):518–21, 2002.
- [35] STRAIT, R T, S C MORRIS und F D FINKELMAN: *IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and FcγRIIb cross-linking*. Journal of Clinical Investigation, 116(3):833–841, 2006.
- [36] BURTON, O T, S L LOGSDON, J S ZHOU, J MEDINA-TAMAYO, A ABDEL-GADIR, M NOVAL RIVAS, K J KOLEOGLU, T A CHATILA, L C SCHNEIDER, R RACHID, D T UMETSU und H C OETTGEN: *Oral immunotherapy induces IgG antibodies that act through FcγRIIb to suppress IgE-mediated hypersensitivity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 134(6):1310–1317.e6, 2014.
- [37] MÜLLER, U R, A HELBLING und M BISCHOF: *Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom*. Allergy, 44(6):412–8, 1989.
- [38] MÜLLER, U R: *Bee venom allergy in beekeepers and their family members*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 5(4):343–7, 2005.
-

-
- [39] SAPHIRE, E O, P W PARREN, R PANTOPHLET, M B ZWICK, G M MORRIS, P M RUDD, R A DWEK, R L STANFIELD, D R BURTON und I A WILSON: *Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design*. *Science*, 293(5532):1155–9, 2001.
- [40] VIDARSSON, G, G DEKKERS und T RISPENS: *IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions*. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT):1–17, 2014.
- [41] ANTHONY, R M, F WERMELING und J V RAVETCH: *Novel roles for the IgG Fc glycan*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253(1):170–180, 2012.
- [42] KANEKO, Y, F NIMMERJAHN und J V RAVETCH: *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation*. *Science*, 313(5787):670–3, 2006.
- [43] COLLIN, M und A OLSÉN: *EndoS, a novel secreted protein from Streptococcus pyogenes with endoglycosidase activity on human IgG*. *EMBO Journal*, 20(12):3046–3055, 2001.
- [44] COLLIN, M und M EHLERS: *The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies*. *Experimental Dermatology*, 22(8):511–514, 2013.
- [45] ALBERT, H, M COLLIN, D DUDZIAK, J V RAVETCH und F NIMMERJAHN: *In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39):15005–15009, 2008.
- [46] SCALLON, B J, S H TAM, S G MCCARTHY, A N CAI und T S RAJU: *Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality*. *Molecular Immunology*, 44(7):1524–1534, 2007.
- [47] PINCETIC, A, S BOURNAZOS, D J DiLILLO, J MAAMARY, T T WANG, R DAHAN, B-M FIEBIGER und J V RAVETCH: *Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity*. *Nature Immunology*, 15(8):707–716, 2014.
- [48] PAREKH, R B, R A DWEK, B J SUTTON, D L FERNANDES, A LEUNG, D STANWORTH, T W RADEMACHER, T MIZUOCHI, T TANIGUCHI, K MATSUTA, F TAKEUCHI, Y NAGANO, T MIYAMOTO und A KOBATA: *Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG*. *Nature*, 316(6027):452–457, 1985.
- [49] SCHERER, H U, D VAN DER WOUDE, A IOAN-FACSINAY, H EL BANNOUDI, L A TROUW, J WANG, T HÄUPL, G BURMESTER, A M DEELDER, T W J HUIZINGA, M WUHRER und R E M TOES: *Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid*. *Arthritis and Rheumatism*, 62(6):1620–9, 2010.
- [50] MATSUMOTO, A, K SHIKATA, F TAKEUCHI, N KOJIMA und T MIZUOCHI: *Autoantibody activity of IgG rheumatoid factor increases with decreasing levels of galactosylation and sialylation*. *Journal of Biochemistry*, 128(4):621–8, oct 2000.
- [51] LEIRISALO-REPO, M, H E HERNANDEZ-MUNOZ und G A ROOK: *Agalactosyl IgG is elevated in patients with active spondyloarthritis*. *Rheumatology International*, 18(5-6):171–6, 1999.
-

-
- [52] TOMANA, M, R E SCHROHENLOHER, W J KOOPMAN, G S ALARCON und W A PAUL: *Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases*. Arthritis and Rheumatism, 31(3):333–338, 1988.
- [53] DUBÉ, R, G A ROOK, J STEELE, R BREALEY, R DWEK, T RADEMACHER und J LENNARD-JONES: *Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein*. Gut, 31(4):431–4, 1990.
- [54] HOLLAND, M, K TAKADA, T OKUMOTO, N TAKAHASHI, K KATO, D ADU, A BEN-SMITH, L HARPER, C O S SAVAGE und R JEFFERIS: *Hypogalactosylation of serum IgG in patients with ANCA-associated systemic vasculitis*. Clinical and Experimental Immunology, 129(1):183–190, 2002.
- [55] GEIJN, F E VAN DE, M WUHRER, M H SELMAN, S P WILLEMSSEN, Y DE MAN, A M DEELDER, J M HAZES und R J DOLHAIN: *Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study*. Arthritis Research & Therapy, 11(6):R193, 2009.
- [56] ROOK, G A, J STEELE, R BREALEY, A WHYTE, D ISENBERG, N SUMAR, J L NELSON, K B BODMAN, A YOUNG und I M ROITT: *Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy*. Journal of Autoimmunity, 4(5):779–94, 1991.
- [57] PASEK, M, M DUK, M PODBIELSKA, R SOKOLIK, J SZECIŃSKI, E LISOWSKA und H KROTKIEWSKI: *Galactosylation of IgG from rheumatoid arthritis (RA) patients—changes during therapy*. Glycoconjugate Journal, 23(7-8):463–71, 2006.
- [58] CROCE, A, O FIRUZI, F ALTIERI, M EUFEMI, R AGOSTINO, R PRIORI, M BOMBARDIERI, C ALESSANDRI, G VALESINI und L SASO: *Effect of infliximab on the glycosylation of IgG of patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 21(5):303–14, 2007.
- [59] PAREKH, R B, I ROITT, D ISENBERG, R DWEK und T RADEMACHER: *Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG*. Journal of Experimental Medicine, 167(5):1731–6, 1988.
- [60] YAMADA, E, Y TSUKAMOTO, R SASAKI, K YAGYU und N TAKAHASHI: *Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum*. Glycoconjugate Journal, 14(3):401–5, 1997.
- [61] SHIKATA, K, T YASUDA, F TAKEUCHI, T KONISHI, M NAKATA und T MIZUOCHI: *Structural changes in the oligosaccharide moiety of human IgG with aging*. Glycoconjugate Journal, 15(7):683–9, 1998.
- [62] SHIELDS, R L, J LAI, R KECK, L Y O’CONNELL, K HONG, Y GLORIA MENG, S H A WEIKERT und L G PRESTA: *Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity*. Journal of Biological Chemistry, 277(30):26733–26740, 2002.
-

-
- [63] HADLEY, A G, B ZUPANSKA, B M KUMPEL, C PILKINGTON, H L GRIFFITHS, K A LEADER, J JONES, D J BOOKER, R STAMPS und R J SOKOL: *The glycosylation of red cell autoantibodies affects their functional activity in vitro*. British Journal of Haematology, 91(3):587–94, 1995.
- [64] YAMADA, K, K ITO, J I FURUKAWA, J NAKATA, M ALVAREZ, J S VERBEEK, Y SHINOHARA und S IZUI: *Galactosylation of IgG1 modulates FcγRIIB-mediated inhibition of murine autoimmune hemolytic anemia*. Journal of Autoimmunity, 47:104–110, 2013.
- [65] KARSTEN, C M, M K PANDEY, J FIGGE, R KILCHENSTEIN, P R TAYLOR, M ROSAS, J U McDONALD, S J ORR, M BERGER, D PETZOLD, V BLANCHARD, A WINKLER, C HESS, D M REID, I V MAJOU, R T STRAIT, N L HARRIS, G KÖHL, E WEX, R LUDWIG, D ZILLIKENS, F NIMMERJAHN, F D FINKELMAN, G D BROWN, M EHLERS und J KÖHL: *Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1*. Nature Medicine, 18(9):1401–6, 2012.
- [66] ITO, K, J FURUKAWA, K YAMADA, N L TRAN, Y SHINOHARA und S IZUI: *Lack of galactosylation enhances the pathogenic activity of IgG1 but Not IgG2a anti-erythrocyte autoantibodies*. Journal of Immunology, 192(2):581–8, 2014.
- [67] SCHWAB, I und F NIMMERJAHN: *Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system?* Nature Reviews. Immunology, 13(3):176–89, 2013.
- [68] OHMI, Y, W ISE, A HARAZONO, D TAKAKURA, H FUKUYAMA, Y BABA, M NARAZAKI, H SHODA, N TAKAHASHI, Y OHKAWA, S JI, F SUGIYAMA, K FUJIO, A KUMANOGOH, K YAMAMOTO, N KAWASAKI, T KUROSAKI, Y TAKAHASHI und K FURUKAWA: *Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis*. Nature Communications, 7:11205, 2016.
- [69] OEFNER, C M, A WINKLER, C HESS, A K LORENZ, V HOLECSKA, M HUXDORF, T SCHOMMARTZ, D PETZOLD, J BITTERLING, A L SCHOEN, A D STOEHR, D VU VAN, Y DARCANNIKOLAISEN, V BLANCHARD, I SCHMUDDE, Y LAUMONNIER, H A STRÖVER, A N HEGAZY, S EIGLMEIER, C T SCHOEN, M M M MERTES, C LODDENKEMPER, MAX LÖHNING, PETER KÖNIG, ARND PETERSEN, E O LUGER, M COLLIN, J KÖHL, A HUTLOFF, E HAMELMANN, M BERGER, H WARDEMANN und M EHLERS: *Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 129(6):1647–1655, 2012.
- [70] HESS, C, A WINKLER, A K LORENZ, V HOLECSKA, V BLANCHARD, S EIGLMEIER, A L SCHOEN, J BITTERLING, A D STOEHR, D PETZOLD, T SCHOMMARTZ, M M M MERTES, C T SCHOEN, B TIBURZY, A HERRMANN, J KÖHL, R A MANZ, M P MADAIO, M BERGER, H WARDEMANN und M EHLERS: *T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies*. The Journal of Clinical Investigation, 123(9):3788–96, sep 2013.
- [71] MASSOUD, A H, M YONA, D XUE, F CHOUIALI, H ALTURAIHI, W ABLONA, A AND MOURAD, C A PICCIRILLO und B D MAZER: *Dendritic cell immunoreceptor: A novel receptor*
-

- for intravenous immunoglobulin mediates induction of regulatory T cells.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, 133(3):853–863.e5, 2014.
- [72] CASALE, THOMAS B. und JEFFREY R. STOKES: *Future forms of immunotherapy.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, 127(1):8–15, 2011.
- [73] CASALE, THOMAS B. und JEFFREY R. STOKES: *Immunotherapy: What lies beyond.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, 133(3):612–619, 2014.
- [74] POETHKO-MÜLLER, C und R SCHMITZ: *Impfstatus von Erwachsenen in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1).* Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 56(5-6):845–857, 2013.
- [75] BARTSCH, Y: *Etablierung einer HPLC-Methode zur Messung des Fc-Glykans Antigen-spezifischer IgG-Antikörper und Anwendung in einem Tierversuch.* Masterarbeit, Universität zu Lübeck, 2014.
- [76] HONG, D. und P. STEVENS: *The role of protein synthesis in the chemotaxis and chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes.* Pharmacology, 28(5):281–8, 1984.
- [77] BODTGER, U, A M EJRNAES, L HUMMELSHOJ, H H JACOBI, L K POULSEN und M SVENSON: *Is immunotherapy-induced birch-pollen-specific IgG4 a marker for decreased allergen-specific sensitivity?* International Archives of Allergy and Immunology, 136(4):340–346, 2005.
- [78] JUTEL, MAREK, LOTHAR JAEGER, ROLAND SUCK, HANNS MEYER, HELMUT FIEBIG und OLIVER CROMWELL: *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, 116(3):608–613, 2005.
- [79] PASSALACQUA, G und G W CANONICA: *Long-lasting clinical efficacy of allergen specific immunotherapy.* Allergy, 57(4):275–6, 2002.
- [80] WALKER, S M, V A VARNEY, M GAGA, M R JACOBSON und S R DURHAM: *Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study.* Allergy, 50:405–413, 1995.
- [81] CALDERON, M A, B ALVES, M JACOBSON, B HURWITZ, A SHEIKH und S DURHAM: *Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis.* The Cochrane Database of Systematic Reviews, 5(1):CD001936, 2007.
- [82] DES ROCHES, A, L PARADIS, J L MENARDO, S BOUGES, J P DAURÉS und J BOUSQUET: *Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children.* The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 99(4):450–3, 1997.
- [83] PAJNO, G B, G BARBERIO, F DE LUCA, L MORABITO und S PARMIANI: *Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study.* Clinical and Experimental Allergy, 31(9):1392–7, 2001.
-

-
- [84] PURELLO-D'AMBROSIO, F, S GANGEMI, R A MERENDINO, S ISOLA, P PUCCINELLI, S PARMIANI und L RICCIARDI: *Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study.* Clinical and Experimental Allergy, 31(8):1295–302, 2001.
- [85] BLASER, K: *Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production.* Advances in Experimental Medicine and Biology, 409:295–303, 1996.
- [86] FENNERTY, A G, K P JONES, B H DAVIES, R FIFIELD und J EDWARDS: *Immunological changes associated with a successful outcome of pollen immunotherapy.* Allergy, 43(6):415–9, 1988.
- [87] VAN REE, R, W A VAN LEEUWEN, P H DIEGES, R G VAN WIJK, N DE JONG, P Z BREWCZYSKI, A M KROON, P P SCHILTE, K Y TAN, I F SIMON-LICHT, A M ROBERTS, S O STAPEL und R C AALBERSE: *Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy.* Clinical and Experimental Allergy, 27(1):68–74, 1997.
- [88] GEHLHAR, K, M SCHLAAK, W M BECKER und A BUFE: *Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: The ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome.* Clinical and Experimental Allergy, 29(4):497–506, 1999.
- [89] PILETTE, C, K T NOURI-ARIA, M R JACOBSON, L K WILCOCK, B DETRY, S M WALKER, J N FRANCIS und S R DURHAM: *Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression.* Journal of Immunology, 178(7):4658–4666, 2007.
- [90] NIEDERBERGER, VERENA, BODO NIGGEMANN, DIETRICH KRAFT, SUSANNE SPITZAUER und RUDOLF VALENTA: *Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms.* European journal of immunology, 32(2):576–84, 2002.
- [91] FINKELMAN, F D: *Anaphylaxis: Lessons from mouse models.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, 120(3):506–515, 2007.
- [92] FINKELMAN, F D, M V KHODOUN und R STRAIT: *Human IgE-independent systemic anaphylaxis.* Journal of Allergy and Clinical Immunology, 137(6):1674–1680, 2016.
- [93] EPP, A: *Murine sialylated IgG1 antibodies prevent IgG-dependent allergic reactions.* Doktorarbeit, Universität zu Lübeck, 2016.
- [94] ANTHONY, ROBERT M und FALK NIMMERJAHN: *The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo.* Current Opinion in Organ Transplantation, 16(1):7–14, 2011.
- [95] QUAKKELAAR, E D, M F FRANSEN, W W C VAN MAREN, J VANEMAN, N M LOOF, S H VAN HEININGEN, J S VERBEEK, F OSSENDORP und C J M MELIEF: *IgG-mediated anaphylaxis to a synthetic long peptide vaccine containing a B cell epitope can be avoided by slow-release formulation.* Journal of Immunology, 192(12):5813–20, 2014.
-

-
- [96] BEUTIER, H, C M GILLIS, B IANNASCOLI, O GODON, P ENGLAND, R SIBILANO, L L REBER, S J GALLI, M S CRAGG, N VAN ROOIJEN, D A MANCARDI, P BRUHNS und F JÖNSSON: *IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016.
- [97] DILULIO, N A, T ENGEMAN, D ARMSTRONG, C TANNENBAUM, T A HAMILTON und R L FAIRCHILD: *Gro α -mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity*. European Journal of Immunology, 29(11):3485–3495, 1999.
- [98] OYOSHI, M K, R HE, Y LI, S MONDAL, J YOON, R AFSHAR, M CHEN, D M LEE, H R LUO, A D LUSTER, J S CHO, L S MILLER, A LARSON, G F MURPHY und R S GEHA: *Leukotriene B₄-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation*. Immunity, 37(4):747–58, 2012.
- [99] LOMMATZSCH, M, P JULIUS, M KUEPPER, H GARN, K BRATKE, S IRMSCHER, W LUTTMANN, H RENZ, A BRAUN und J C VIRCHOW: *The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 118(1):91–7, 2006.
- [100] HOSOKI, K, I BOLDOGH und S SUR: *Innate responses to pollen allergens*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 15(1):79–88, 2015.
- [101] HOSOKI, K, T ITAZAWA, I BOLDOGH und S SUR: *Neutrophil recruitment by allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 16(1):45–50, 2016.
- [102] HOSOKI, K, L AGUILERA-AGUIRRE, A R BRASIER, A KUROSKY, I BOLDOGH und S SUR: *Facilitation of Allergic Sensitization and Allergic Airway Inflammation by Pollen-Induced Innate Neutrophil Recruitment*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 54(1):81–90, 2016.
- [103] DOENER, F, A MICHEL, S REUTER, P FRIEDRICH, LIVIA BÖHM, M RELLE, L CODARRI, S TENZER, M KLEIN, T BOPP, E SCHMITT, H SCHILD, M P RADSAK, C TAUBE, M STASSEN und M BECKER: *Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions*. International Immunology, 25(10):553–561, 2013.
- [104] MÅNSSON, A, O BACHAR, M ADNER, S BJÖRNSSON und L O CARDELL: *Leukocyte phenotype changes induced by specific immunotherapy in patients with birch allergy*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 20(6):476–483, 2010.
- [105] VENTURA, I, A VEGA, C CHAMORRO, R AROCA, E GOMEZ, F PINEDA, R PALACIOS, M BLANCA und J MONTESEIRIN: *Allergen immunotherapy decreases LPS-induced NF- κ B activation in neutrophils from allergic patients*. Pediatric Allergy and Immunology, 25(2):129–135, 2014.
- [106] JÖNSSON, F, D A MANCARDI, Y KITA, H KARASUYAMA, B IANNASCOLI, N VAN ROOIJEN, T SHIMIZU, M DAËRON und P BRUHNS: *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis*. The Journal of Clinical Investigation, 121(4):1484–96, 2011.
-

-
- [107] JÖNSSON, F, D A MANCARDI, M ALBANESI und P BRUHNS: *Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions*. Journal of Leukocyte Biology, 94(4):643–56, 2013.
-

Abbildungsverzeichnis

1	Sensitivierungsphase einer allergischen Erkrankung	5
2	Effektorphase einer allergischen Erkrankung	6
3	Mechanismus der Spezifischen Immuntherapie	7
4	Struktur von Immunglobulinen	9
5	Fc-Glykosylierung von IgG-Molekülen	11
6	Entstehung verschieden glykosylierter IgG	13
7	Dichtegradienten zur Aufreinigung von Leukozyten	24
8	Spezifische Immuntherapie resultiert in verringerter Reaktivität der Allergiker auf Birkenpollen	27
9	Relativer Titer von Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern	28
10	Relativer Titer von Bet v 1-spezifischen IgG-Antikörpern.	29
11	Relativer Titer von Bet v 1-spezifischen IgG-Subklassen	30
12	Aufreinigungsprinzip zur Isolation von α Bet v 1-IgG-Ak	31
13	Kontrolle der α Bet v 1-IgG-Aufreinigung anhand von α Tetanustoxoid-IgG als unspezifisches IgG	32
14	Anteil an agalaktosyliertem (G0) α Bet v 1-IgG bleibt unverändert im Verlauf der SIT	33
15	Anteil an sialylierten α Bet v 1-IgG im Verlauf der SIT vergleichbar mit IVIg	33
16	In vitro-Desialylierung von Patienten-IgG	34
17	Desialylierung hat keinen Einfluss auf die Affinität der Patienten-IgG zu Bet v 1	35
18	<i>In vitro</i> -Desialylierung von Patienten-IgG führt zu einer erhöhten Aktivierung von humanen neutrophilen Granulozyten.	36
19	Hypothetisches Modell der Wirkung sialylierter Allergen-spezifischer IgG	42
20	Glykoanalyse von SIT-Patienten	XIV
21	Glykoanalyse unbehandelter Birkenpollenallergikern	XV
22	Glykoanalyse <i>in vitro</i> -modifizierter Patienten-IgG-Proben.	XV
23	Verschiedene Adjuvantien induzieren verschieden glykosylierte IgG-Antikörper in Mäusen	XVI
24	Kreuzreaktivität der verwendeten Detektionsantikörper für IgG Subklassen	XVI

Tabellenverzeichnis

1	Eigenschaften humaner IgG-Subklassen	10
2	Numerische Beurteilung des Hautpricktest	20
3	Detektionsantikörper für Serologie	21
4	Klinische Charakteristika der SIT-Patienten vor Beginn der Spezifischen Immuntherapie	26
5	Klinische Charakteristika unbehandelter Patienten außerhalb und innerhalb der Saison	28

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung (<i>englische Bezeichnung</i>)
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle <i>antigen-presenting cells</i>
AS	Aminosäure
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BPA	Birkenpollenallergen
BSA	Bovines Serumalbumin
Bet v1	Hauptallergen der Hängebirke (<i>Betula verrucosa</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CNBr	Cyanobromid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoS	Endoglycosidase S
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HC	schwere Kette, <i>heavy chain</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITP	Immunthrombozytopenie
IVIg	Intevenöses Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
LC	leichte Kette, <i>light chain</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OCl ⁻	Hypochlorid-Anion
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PBMC	<i>periph al blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate Saline Buffer</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	<i>polymorph nuclear cells</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	reaktive Saustoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
SIGN-R1	<i>specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related 1</i>
SIT	Spezifische Immuntherapie
SQ-Einheiten	standartisierte Qualitätseinheiten
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
v/v %	Volumenprozent
w/v %	Gewichtsprozent

Anhang

Glykoanalysen

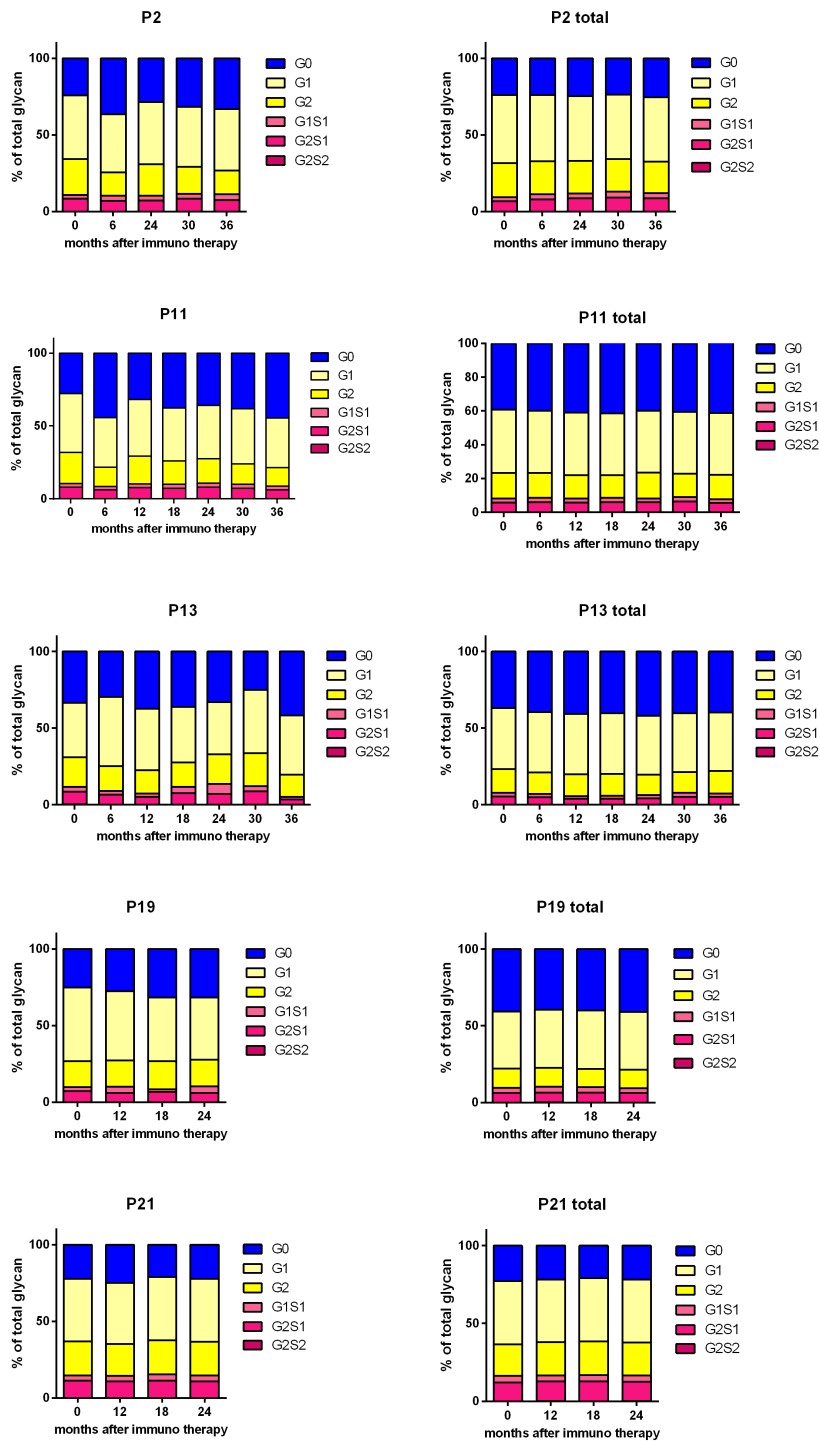


Abbildung 20: Glykoanalyse von SIT-Patienten. Vergleich der Glykoanalysen von Bet v1-spezifischem IgG (links) zu Gesamt-Serum-IgG (rechts) von Patienten unter 36-monatiger Immuntherapie. Mittels EndoS geschnittenes Glykan wurde über HPLC analysiert. Repräsentativ für zwei Messungen.

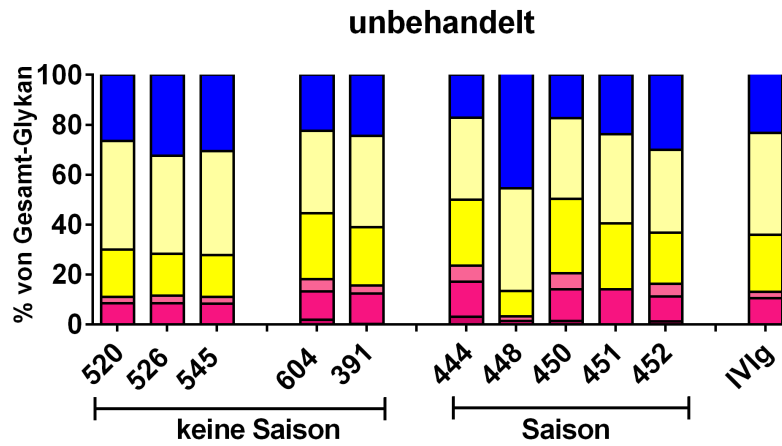


Abbildung 21: Glykoanalyse unbehandelter Birkenpollenallergikern Vergleich der Glykoanalysen von Bet v1-spezifischem IgG (A) zu Gesamt-Serum-IgG (B) von unbehandelten Birkenpollenallergikern innerhalb und außerhalb der Pollenflugsaison, sowie gepooltes IgG von gesunden (IVIg). Mittels EndoS geschnittenes Glykan wurde über HPLC analysiert. Repräsentativ für zwei Messungen.

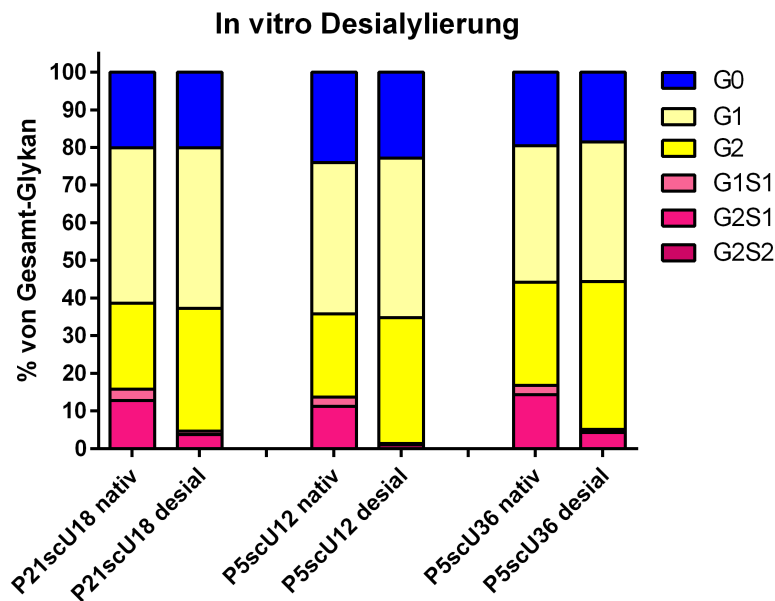


Abbildung 22: Glykoanalyse *in vitro*-modifizierter Patienten-IgG-Proben. Enzymatische Behandlung von Gesamt-IgG aus Serum von SIT-Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie. Repräsentativ für zwei Messungen.

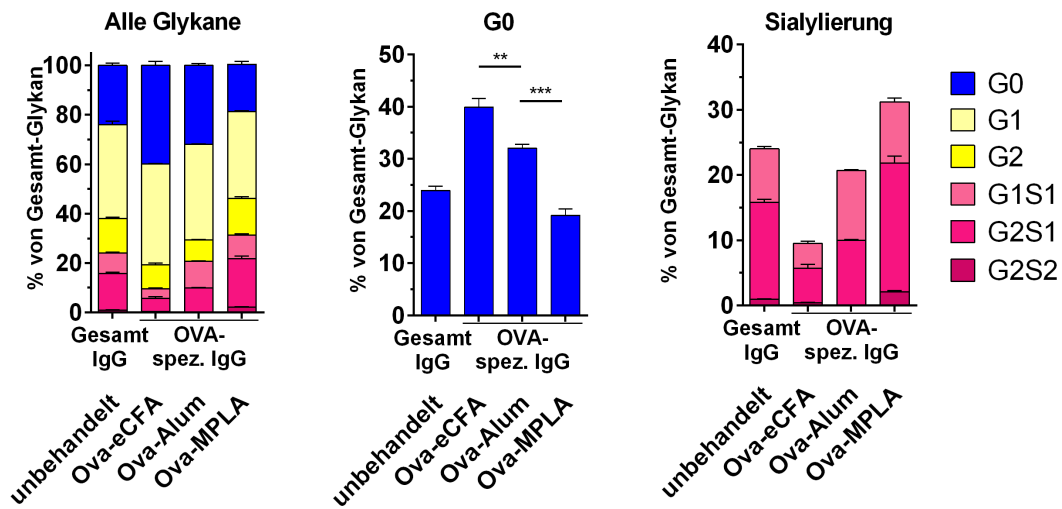


Abbildung 23: Verschiedene Adjuvantien induzieren verschieden glykosylierte IgG-Antikörper in Mäusen. Induktion von verschieden glykosylierten OVA-spezifischen IgG-Antikörpern mit verschiedenen Adjuvantien. C57/BL6-Mäusen wurde intraperitoneal (i.p.) 100 µg OVA plus eCFA (n=10), Alum (n=5) oder MPLA (n=5) injiziert. An Tag 14 wurden unbehandelte und behandelte Mäuse geblutet und das Fc-Glykosylierungsprofil von Gesamt-IgG bei unbehandelten und OVA-spezifischem IgG bei behandelten Mäusen analysiert. Daten dargestellt als Mittelwert+SEM. Repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Durchgeführt von Yannic Bartsch.

ELISA

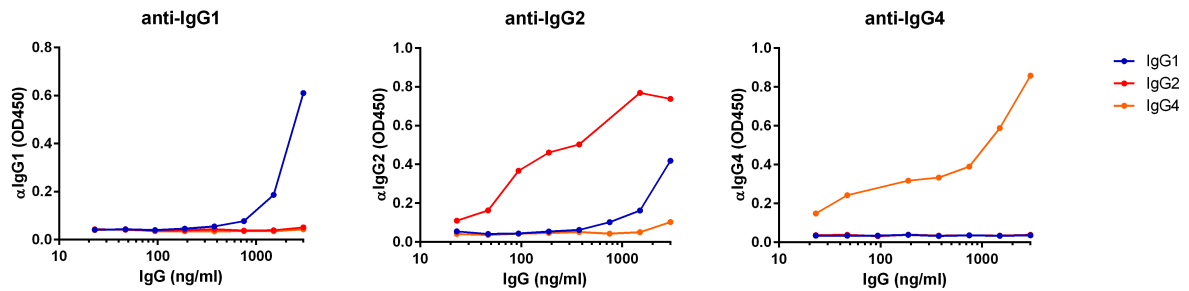


Abbildung 24: Kreuzreaktivität der verwendeten Detektionsantikörper für IgG Subklassen An die Platte gekoppelte IgG1, IgG2 oder IgG4-Antikörper in der gekennzeichneten Menge wurden jeweils mit αIgG1, αIgG2, αIgG4 inkubiert. Der Detektionsantikörper gegen IgG2 zeigt leichte Kreuzreaktivität gegenüber IgG4. Für αIgG1 und αIgG4 konnte keine Kreuzreaktivität festgestellt werden

Danksagung

Während der Anfertigung meiner Dissertation haben mich viele Menschen unterstützt. Ich möchte ihnen auf diesem Wege ganz herzlich bei ihnen allen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Marc Ehlers für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Betreuung. Seine stetige Unterstützung und hilfreichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Wolfgang Pfützner, Dr. Christian Möbs und allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philips-Universität Marburg für die Bereitstellung von Serumproben ihrer Birkenpollenkohorte. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Uta Jappe der Abteilung Klinische und Molekulare Allergologie des Forschungszentrums Borstel für die Bereitstellung von Serumproben unbehandelter Birkenpollenallergikern. Ohne diesen reichen Fundus an Patientenproben wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Instituts für Systemische Entzündungsforschung danke ich für die wertvollen Tipps zur Durchführung von Versuchen, der ständigen Hilfsbereitschaft.

Für die guten Ratschläge, interessanten Diskussionen und gute Gesellschaft bei unzähligen Seminaren, Retreats, Posterpräsentationen und Gemeinschaftsaktivitäten danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des internationalen Graduiertenkollegs (IRTG 1911). Ich danke auch meinen Mentoren Prof. Dr. Uta Jappe und Prof. Dr. Ralf Ludwig für interessante Diskussionen und hilfreiche Ratschläge.

Für all die kleinen und großen Gefallen, Ratschläge und gemeinsam verbrachte Zeit („Käffchen?“) danke ich den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der AG Ehlers: Josephine Bitterling, Alexandra Epp, Gina Lilienthal, Janina Petry, Simon Eschweiler, Johann Rahmöller, Alexei Leliavski, Moritz Steinhaus, Mirja Meyer. Mein besonderer Dank gilt Yannic Bartsch und Robina Thurmann für die Durchführung der Glykoanalysen an der HPLC.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre Unterstützung danken. Danke an Christian, der mich immer unterstützt hat und mich wieder aufgebaut hat, wenn die Experimente mal nicht so wollten wie ich. Danke an meine Eltern, die mich in allen meinen Entscheidungen unterstützt haben und auf meinem gesamten Weg immer hinter mir standen.

Vielen Dank!