Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Klinische Medizin

Direktor: Prof. Dr. P. Zabel

Untersuchung eines neuartigen Mechanismus der Aktivierung basophiler Granulozyten durch das sekretorische Schistosomen-Ei-Produkt, IPSE/alpha-1

Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität Lübeck
- Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät -

vorgelegt von
Astrid Mewes
aus Hamburg

Lübeck 2007

Diese Arbeit wurde in der Laborgruppe
Zelluläre Allergologie
(Leiter: PD Dr. med. H. Haas)
am Forschungszentrum Borstel angefertigt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Otto Holst
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Helmut Haas
Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **5**

Zusammenfassung **7**

1 Einleitung **9**

1.1 Angeborene und erworbene Immunantwort 10

1.2 Antikörper (Immunglobuline) als Produkt der erworbenen Immunantwort 11

1.3 Weichenstellung zur Th1-/Th2-Antwort 14

1.4 Humane basophile Granulozyten als Effektorzelle der Th2-Antwort 15

1.5 IgE-vermittelte Aktivierung der Basophilen 15

1.6 Induktion der IL-4 Freisetzung und Th2-Antwort durch Helminthen 16

1.7 *Schistosoma mansoni* – Modellorganismus für die Untersuchung der Weichenstellung zur Th-2-Antwort 17

1.8 IPSE/alpha-1 – ein sekretiertes Protein aus *Schistosoma mansoni*-Eiern induziert die Freisetzung von IL-4 aus humanen Basophilen 20

1.9 Ziel dieser Arbeit 23

2 Materialien **24**

2.1 Reagenzien und Chemikalien 24

2.2 Häufig verwendete Pufferlösungen 27

2.3 Antikörper 28

3 Methoden **29**

3.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen 29

3.1.1 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test (Smith et al., 1985) 29

3.1.2 Proteinbestimmung mit der spektralen Absorptionsmessung 29

3.2 Dialyse von Proteinlösungen 30

3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) 30

3.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen 32

3.5 Dot-Blot 34
3.6 Nachweis membrangebundener Proteine 34
3.7 Biotinylierung von Proteinen 35
3.8 Chemische Quervernetzung von Proteinen 36
3.9 Chromatographische Methoden 37
3.9.1 Größenausschlusschromatographie 37
3.9.1.1 Komplexbildung zwischen Immunglobulin (IgG, IgE) und HEK-IPSE in Lösung 37
3.9.1.2 Komplexbildung zwischen monomerem IgE und HEK-IPSE in Lösung 38
3.9.2 Affinitätschromatographien 38
3.9.2.1 Bindung von IgG an HEK-IPSE mittels einer HEK-IPSE-Säule 38
3.9.2.2 Bindung von IgG/IgE an IPSE mittels IMAC 39
3.9.2.3 Bindung von HEK-IPSE an IgG mittels einer Protein G-Säule 40
3.10 Dynamische Lichtstreumessungen (DLS) mit HEK-IPSE 41
3.11 Aufreinigung humaner basophiler Granulozyten 42
3.11.1 Ficoll / Percoll Dichtegradienten-Zentrifugation 42
3.11.2 Gegenstrom-Elutriation 42
3.11.3 Bestimmung der Zellzahl und Basophilenreinhheit 43
3.11.4 Negative Selektion mit immunomagnetischen Beads 43
3.12 Stimulation der Basophilen zur IL-4-Freisetzung 44
3.13 IL-4 ELISA 45

4 Ergebnisse 46

4.1 Untersuchung der Bindungsstärke von *E. coli*-IPSE an IgG, IgG-Fab und IgG-Fc im Dot Blot 46
4.2 Quervernetzung von IgG durch IPSE im Sandwich-Blot 47
4.2.1 Quervernetzung von E. coli-IPSE durch IgG 47
4.2.2 Quervernetzung von HEK-IPSE durch IgG 49
4.3 Quervernetzung von IgG-Fab durch *E. coli*-IPSE im Sandwich-Blot 50
4.4 Chemische Quervernetzung 51
4.4.1 Bindungsuntersuchung von IgG und *E. coli*-IPSE 51
4.4.2 Chemische Quervernetzung von HEK-IPSE 54

4.5 Untersuchung der Komplexbildung von Immunglobulin (IgG, IgE) und HEK-IPSE in Lösung mittels Größenausschlusschromatographie 55
4.5.1 Untersuchung der Komplexbildung von IgG und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200 10/300 GL 55
4.5.2 Untersuchung der Komplexbildung von IgE und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200 10/300 GL 59
4.5.3 Untersuchung der Komplexbildung von monomerem IgE und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200 PC 3.2/30 64
4.6 Bindungsuntersuchung zwischen Immunglobulin und IPSE mittels Affinitätschromatographie 67
4.6.1 Untersuchung der Bindung von IgG an HEK-IPSE mittels einer HEK-IPSE Säule 67
4.6.2 Untersuchung der Bindung von IgG / IgE an IPSE mittels IMAC 68
4.6.3 Untersuchung der Bindung von HEK-IPSE an IgG mittels einer Protein G-Säule 72
4.7 Untersuchung der Eigenaggregation von HEK-IPSE mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) 76
4.7.1 Untersuchung der IL-4-Freisetzung aus humanen Basophilen durch zentrifugiertes bzw. nicht-zentrifugiertes HEK-IPSE 77

5 Diskussion 79

5.1 E. *coli*-IPSE bindet im Dot Blot mit unterschiedlicher Intensität an das IgG-Gesamtmolekül und dessen Fab- und Fc-Fragmente 81
5.2 *E. coli*-IPSE ist nicht in der Lage zwei Moleküle IgG-Fab im Sandwich-Blot zu binden 82
5.3 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von IPSE und Immunglobulin 82
5.3.1 Sandwich-Blot-Versuche zur Untersuchung der Stöchiometrie – Binden zwei Moleküle IPSE an ein Immunglobulin-Molekül? 83
5.3.2 Untersuchung der Stöchiometrie sowie Komplexbildung von IPSE und IgG mittels chemischer Quervernetzung 83
5.3.3 Untersuchung der Stöchiometrie sowie Komplexbildung von IPSE und IgG bzw. IgE mittels der Größenausschlusschromatographie 84
5.3.3.1 Bindungsuntersuchung von IgG und HEK-IPSE im Verhältnis 1:1 84
5.3.3.2 Bindungsuntersuchung von IgE und HEK-IPSE im 1:1-, 1:4- und 2:1-Verhältnis 85
5.4 Bindungsstudien von IPSE und Immunglobulin mit Hilfe affinitätschromatographischer Methoden 87
5.4.1 Interaktion zwischen löslichem HEK-IPSE und immobilisiertem IgG 87
5.4.2 Interaktion zwischen löslichem IgG/IgE und immobilisiertem IPSE. 88

5.5 Rekombinante IPSE-Moleküle 89
5.5.1 *E. coli*-IPSE und HEK-IPSE neigen zur Selbstaggregation 89
5.6 IPSE – ein unkonventionelles B-Zellsuperantigen? 91

6 Literatur 94
6.1 Literaturquellen 94
6.2 Internetseiten 106

7 Eigene Vorträge 107

8 Danksagung 108

9 Lebenslauf 110

10 Eidesstattliche Erklärung 111

Abkürzungsverzeichnis

Neben den SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bio.	biotinyliert
BSA	Rinderserumalbumin (englisch “bovine serum albumin”)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	englisch “enzyme linked immunosorbent assay”
FcεRI	Fcε-Rezeptor I
h	Stunde (englisch “hour“)
HBSS	englisch “Hank’s balanced Salt Solution“
HEK	englisch “human embryonic kidney cells”
HM	englisch “high marker”
HRP	englisch “horseradish peroxidase“
IL	Interleukin
IMAC	immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie
IMDM	englisch “Iscove’s modified dulbecco’s medium”
IPSE	Interleukin-4-induzierendes Prinzip aus *Schistosoma mansoni*-Eiern
kDa	Kilodalton
LM	englisch “low marker”
min	Minute
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid

NTA	*N*-Nitrilo-tri-essigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (englisch “phosphate-buffered saline)
rpm	Umdrehung pro Minute (englisch “rounds per minute”)
S. mansoni	*Schistosoma mansoni*
SAVAP	Alkalisch Phosphatase-markiertes Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch “sodium dodecyl sulphate”)
SmEA	*Schistosoma mansoni*-Ei-Antigen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (englisch “Tris-buffered saline”)
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin
Th 1	T-Helferzelle Typ 1
Th 2	T-Helferzelle Typ 2
Th	T-Helferzelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
v/v	englisch “volume per volume”
w/v	englisch „weight per volume“

Zusammenfassung

Die Anzahl der Allergieerkrankungen vom Typ-I steigt in westlichen Industrieländern immer weiter an. Typ-I-Allergien sind gekennzeichnet durch eine Th2-Immunantwort mit gesteigerter IgE-Synthese, wobei der Mechanismus ihrer Entstehung noch nicht vollständig geklärt ist. Das Schlüsselzytokin für die Weichenstellung naiver Th-Zellen zu Th2-Zellen ist das so genannte „frühe IL-4“. Als zelluläre Quelle für das frühe IL-4 werden Basophile angenommen. Im Gegensatz zu Allergien führen Infektionen mit parasitären Würmern, z. B. mit dem Trematoden *Schistosoma mansoni*, bei allen Betroffenen zuverlässig zu einer Th2-Immunantwort. *Schistosoma mansoni* ist daher ein geeignetes Modell für die Suche nach Th2-auslösenden Triggerfaktoren. Aus den Eiern von *Schistosoma mansoni* konnte ein Faktor isoliert werden, der Basophile zur Freisetzung von IL-4, IL-13 sowie Histamin aktiviert. Dieser Faktor wurde IPSE für „IL-4 inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs“ genannt. Es stellte sich heraus, dass IPSE mit dem schon früher beschriebenen Antigen alpha-1 identisch ist, und es wird daher als IPSE/alpha-1 bezeichnet. IPSE/alpha-1 ist ein Immunglobulin-bindender Faktor, der neben humanen auch Immunglobuline anderer Spezies bindet. Es bindet dabei wie ein B-Zellsuperantigen an Fab-, $F(ab)_2$- und Fc-Fragmente von IgG und IgE. Frühere Biacore-Daten sowie Ergebnisse aus Sandwich-Blot- und Doppelimmunodiffusions-Experimenten weisen aber daraufhin, dass IPSE/alpha-1 im Gegensatz zu B-Zellsuperantigenen Immunglobuline nicht quervernetzt und daher Basophile nicht über IgE-Quervernetzung, sondern vermutlich über einen neuen Wirkungsmechanismus aktiviert.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Wirkungsmechanismus von IPSE/alpha-1 weiter charakterisiert werden, insbesondere hinsichtlich der Bindungsstöchiometrie von IPSE/alpha-1 und Immunglobulin. Für die Untersuchungen wurden rekombinante IPSE/alpha-1-Moleküle eingesetzt.

IPSE/alpha-1, bindet im Dot Blot mit unterschiedlicher Intensität an IgG und dessen Fragmente IgG-Fab und Fc. Die stärkste Bindung zeigte sich dabei an das komplette IgG-Molekül, was ein Hinweis darauf ist, dass für eine „optimale“ Bindung das Gesamtmolekül benötigt wird und IPSE/alpha-1 dabei sowohl an die Fab- als auch an die Fc-Region bindet. Die Untersuchung, ob zwei Moleküle IgG-Fab an ein Molekül IPSE/alpha-1 binden, in Bezug auf die Frage der Quervernetzung von Immunglobulin durch IPSE/alpha-1, ergab ein negatives Ergebnis und bestätigte frühere Experimente, dass IPSE/alpha-1 Immunglobuline nicht quervernetzen kann.

Für die Untersuchung der Bindungsstöchiometrie zwischen IPSE/alpha-1 und Immunglobulinen wurden zunächst Sandwich-Blot-Experimente durchgeführt. Die hierfür eingesetzten rekombinanten IPSE/alpha-1-Moleküle (*E. coli*- und HEK-IPSE/alpha-1) zeigten beide eine sehr starke unspezifische Autoaggregation, was eine Auswertung dieser Versuche nicht zuließ. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Selbstaggregation beider rekombinanten Moleküle ergaben, dass sowohl *E. coli*-IPSE/alpha-1 als auch HEK-IPSE/alpha-1 komplexiert vorliegen. Ob natürliches IPSE/alpha-1 ebenfalls komplexiert vorliegt, konnte aufgrund der limitierten Mengen dieses Moleküls noch nicht geklärt werden.
Weitere Untersuchungen mittels chemischer Quervernetzung als auch mittels Größenausschlusschromatographie, bei denen IPSE/alpha-1 und Immunglobulin in unterschiedlichen Verhältnissen zusammen gemischt wurden, zeigten keine großen Komplexe im Sinne einer Quervernetzung von Immunglobulin durch IPSE/alpha-1. Umgekehrt weisen die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie auf eine Bindung von zwei bis drei Molekülen IPSE/alpha-1 pro Molekül IgE hin. Zusätzlich ergaben Bindungsstudien, dass IPSE/alpha-1 sowohl mit löslichem als auch mit Matrix-gebundenem Immunglobulin eine nur niedrig affine Bindung eingeht. Ob IPSE/alpha-1 möglicherweise mit FcεRI-gebundenem IgE, welches in einer bestimmten Konformation gebunden vorliegt, mit höherer Affinität interagiert muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. .
Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, sowie aus Ergebnissen früherer Arbeiten, lässt sich folgern, dass IPSE/alpha-1 wie ein B-Zellsuperantigen zwar IgE-vermittelt, über die Bindung an die Fab- und Fc-Region, Basophile zur IL-4-Freisetzung aktiviert, doch im Gegensatz zu einem „klassischen“ B-Zellsuperantigen die Aktivierung nicht über eine Quervernetzung von Rezeptor-gebundenem IgE erfolgt, sondern über einen alternativen Wirkungsmechanismus, etwa durch Konformationsänderung von IgE. IPSE/alpha-1 könnte daher als ein „unkonventionelles“ B-Zellsuperantigen bezeichnet werden.

1 Einleitung

Der Begriff „Allergie“ wurde erstmals 1906 von dem österreichischen Kinderarzt und Universitätsprofessor Clemens von Pirquet in die medizinische Fachsprache eingeführt. Er erkannte als erster, dass Antikörper nicht nur schützende Immunantworten vermitteln, sondern auch Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen können. In den letzten Jahren stieg die Anzahl der Allergieerkrankungen, hauptsächlich in Industrieländern, an (Aberg et al., 1995; Ninan et al., 1992). Es leiden heute ungefähr 20 – 30 % der Weltbevölkerung unter einer Allergie (Ring et al., 2001), wobei ca. 130 Millionen der Bevölkerung an Asthma leiden mit steigender Anzahl (Sears MR, 1997). Unter einer Allergie versteht man generell eine Hyperreaktivität des Immunsystems gegenüber harmlosen Antigenen (Allergenen). Vor dem erstmaligen Auftreten von Beschwerden liegt die so genannte „Sensibilisierungsphase“, d. h., das Immunsystem muss zunächst mit dem Allergen in Kontakt treten und sensibilisiert werden, bevor sich allergische Symptome manifestieren. Die häufigste Form ist die Typ I-Allergie, auch genannt Allergie vom Soforttyp, da die Symptome in der Regel sehr schnell, schon einige Minuten nach dem Allergenkontakt, auftreten. Neben der Typ I-Allergie gibt es nach Coombs und Gell (1963) noch weitere Formen der Allergie (Typ II – IV). In der vorliegenden Arbeit bezieht sich der Begriff Allergie auf die Typ I-Allergie. Die Entstehung einer Allergie ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Hierbei können sowohl die genetische Veranlagung als auch Umweltfaktoren einen Einfluss haben. Eine zentrale Rolle bei einer allergischen Reaktion spielt die gesteigerte Synthese des Immunglobulin E (IgE). Der Klassenwechsel zu IgE in den Plasmazellen wird durch die Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13), welche von aktivierten T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen) freigesetzt werden, induziert (Punnonen et al., 1993; Romagnani, 1990). Die Faktoren für die Auslösung einer Th2-Antwort sind allerdings weitgehend unbekannt. Infektionen mit helminthischen Parasiten führen meist zuverlässig zu einer starken Entwicklung einer Th2-Antwort mit gesteigerter IgE-Produktion (Sher et al., 2003). Um generelle Erkenntnisse über den Mechanismus für die Auslösung einer Th2-Antwort zu erhalten, sind helminthische Parasiten, wie der Pärchenegel *Schistosoma mansoni,* daher als Modell gut geeignet. Bei *S. mansoni* ist es das Eistadium, das eine Th2-Antwort induziert (Grzych et al., 1991). Schramm et al. (2003) gelang es einen Triggerfaktor zu isolieren und zu charakterisieren, der aus basophilen Granulozyten eine starke IL-4-Freisetzung induziert. Dieser Faktor wurde IPSE („IL-4-inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs“) genannt. Da die Differenzierung

der nativen T-Helferzelle zur Th2-Zelle IL-4-abhängig ist (Paul and Seder, 1994), könnte dieser Faktor eine Rolle bei der Weichenstellung zur Th2-Antwort spielen.
Für das Verständnis der vorliegenden Arbeit, werden nun im Folgenden die immunologischen und immunparasitologischen Grundlagen näher erläutert.

1.1 Angeborene und erworbene Immunantwort

An der Bekämpfung von Krankheitserregern, wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, sind grundsätzlich zwei unterschiedliche Immunsysteme beteiligt: die „angeborene Immunantwort“ und die „antigenspezifische erworbene (adaptive) Immunantwort“. Die angeborene Immunantwort stellt die erste Verteidigungslinie dar. Hierbei spielen phagozytische Makrophagen eine wichtige Rolle, die durch ihre Oberflächenrezeptoren Fremdorganismen, wie Bakterien, erkennen, an deren Oberfläche binden, und diese dann aufnehmen und zerstören. Dabei werden die Makrophagen zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen aktiviert, die wiederum einen Entzündungsprozess auslösen, wobei es zur Einwanderung von Leukozyten, hauptsächlich Neutrophilen, aus dem Blutsystem kommt. Können Pathogene diese erste Verteidigungslinie umgehen, muss die Abwehr von der erworbenen Immunantwort übernommen werden. Die angeborene Immunantwort spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der erworbenen Immunantwort. Durch den Entzündungsprozess steigt der Strom der Gewebsflüssigkeit mit den darin enthaltenen antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, in das Lymphgewebe. Hier erfolgen dann das Priming und die Aktivierung der T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen.
1986 konnte Mosman et al. erstmals im Mausmodell zeigen, dass sich die T-Helfer (Th)-Zellen in zwei unterschiedliche Subtypen einteilen lassen, die Th1- und Th2-Zellen. Dieses konnte später auch im humanen System bestätigt werden (Romagnani, 1991). Th1- und Th2-Zellen unterscheiden sich durch das von ihnen sezenierte Zytokinprofil. Th1-Zellen produzieren unter anderem IL-2, Tumornekrosefaktor-β (TNF-β) und Interferon-γ (IFN-γ) und lösen durch Aktivierung der Makrophagen eine zellvermittelte Immunantwort aus, während Th2-Zellen durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 eine antikörpervermittelte (humorale) Immunantwort auslösen. Diese humorale Immunantwort geht auf die Aktivität der B-Zellen zurück. Diese werden durch Th2-Zellen durch Zytokine, u.a. IL-4 und IL-13 und über die Bindung des CD40-Liganden an CD40 aktiviert, und

differenzieren zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Der Antikörperisotyp wird hierbei vom Zytokinmilieu bestimmt Wie schon oben beschrieben, wird z. B. die IgE-Synthese von IL-4 und IL-13 ausgelöst. Neben den Th1- und Th2-Zellen wurde zusätzlich noch eine weitere Th-Zellpopulation im murinen System beschrieben, die in der Lage ist sowohl IL-4, IL-5 als auch IL-2 und IFN-γ zu produzieren. Diese Zellen werden als Th0-Zellen bezeichnet (Firestein et al., 1989). Es konnten weiterhin auch noch mehrere Übergangsformen einer Th-Zelle im Zytokinprofil beobachtet werden (Kelso, 1995). Somit kann eine strenge Dichotomie der Th1- und Th2-Zellen, wie von Mosman beschrieben, nicht eingehalten werden und ist lediglich als Modellvorstellung zu verstehen.

Überschießende Th-1- und Th2-Immunantworten führen zu pathologischen Reaktionen, die sich gegen den eigenen Körper richten können. Somit führt eine vermehrte IL-4-Produktion und die Vermehrung von Th2-Zellen zu einer gesteigerten IgE-Synthese, was zu allergischen Erkrankungen führen kann (Romagnani, 1991). Im Gegensatz dazu können auch überschießende Th1-Antworten pathologische Reaktionen, wie z. B. Autoimmunerkrankungen (Morbus Crohn, Diabetis Mellitus usw.) auslösen. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die ebenso zu der Population der Th-Zellen gehören, sind in der Lage diese Reaktionen zu supprimieren und das Immunsystem zu kontrollieren (Mills, 2004). Verantwortlich hierfür ist die Ausschüttung der Zytokine IL-10 und „transforming growth factor-β“ (TGF-β) sowie Zellkontakt-vermittelter Signale und der daraus resultierende Entzündungs-hemmende Effekt, u.a. durch Hemmung der Aktivierung von T-Helferzellen.

1.2 Antikörper (Immunglobuline) als Produkt der erworbenen Immunantwort

Immunglobuline (Ig) sind die Antigen-Erkennungsmoleküle der B-Zellen. Hierbei gibt es sowohl die membrangebundenen Antigenrezeptoren der B-Zellen als auch die sekretierten Antikörper der aktivierten und differenzierten B-Zellen (Plasmazellen). Antikörper sind die lösliche Form der B-Zell-Rezeptoren und wurden zuerst von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato im Jahre 1890 entdeckt. Sie erkannten, dass im Serum von geimpften Personen Substanzen enthalten sind, die spezifisch gegen das entsprechende Pathogen gerichtet waren. Sie nannten diese Substanzen Antikörper (Janeway et al., 2001). Die Antikörper oder Immunglobuline gehören zur Familie der Immunglobulin-Superfamilie. Dazu gehören z. B. auch der T- Zell-Rezeptor oder das MHC-Protein (Klasse I und II) (Hunkapiller

and Hood, 1986). Antikörper sind „Y"-artig geformte Glykoproteine, die aus zwei schweren und zwei leichten Ketten bestehen, wie erstmals durch Untersuchungen mit dem IgG gezeigt werden konnte (Olins und Edelmann, 1964; Roholt et al., 1964; Fougereau und Edelman, 1964). Sowohl die schweren Ketten als auch schwere und leichte Kette sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Beide Ketten bestehen aus konstanten und variablen Domänen, die aus ca. 110 Aminosäuren aufgebaut sind. Die amino-terminale variable Domäne (V) der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) beschreibt den variablen Bereich und die Antigen-Bindungsstelle, während die konstanten Domänen der schweren und leichten Kette (C_H und C_L) den konstanten Bereich darstellen. Die V- und C-Domänen haben eine ähnliche Struktur. Sie bestehen aus β-Faltblatt-Strukturen die antiparallel angeordnet sind und über flexible Schleifen miteinander verbunden sind. Die konstanten Domänen enthalten drei β-Faltblatt-Strukturen in der einen und vier in der anderen Blattstruktur die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die variablen Domänen enthalten zusätzlich noch zwei weitere β-Faltblatt-Strukturen (Stryer, 1996).

Die verschiedenen Effektorfunktionen der Antikörper werden von der konstanten Region der schweren Kette definiert. Es gibt fünf Hauptklassen oder Isotypen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Ihre schweren Ketten werden hierbei mit den griechischen Buchstaben μ, δ, γ, α, und ε bezeichnet. IgG ist mengenmäßig am reichlichsten vorhanden (Serumkonzentration beträgt 13,5 $g*l^{-1}$, Koolman und Röhm, 2003) und besteht aus vier verschiedenen Subklassen im Menschen (IgG1, 2, 3, 4). Es gibt zwei Typen der leichten Kette, kappa (κ) und lambda (λ). Das Verhältnis beider Typen variiert von Spezies zu Spezies: beim Menschen beträgt es 2:1, bei der Maus dagegen 20:1. Schwere und leichte Ketten werden zunächst jeweils einzeln in der B-Zelle hergestellt und dann zum funktionellen Protein zusammengesetzt. Während schwere Ketten nicht alleine sekretiert werden können, können leichte Ketten sowohl separat im Menschen und in der Maus sekretiert werden. Ein Antikörper-Gesamtmolekül besteht aus drei Bereichen, die durch die flexible *hinge*-Region miteinander verbunden sind. Durch die Proteinase Papain kann das Gesamtmolekül gespalten werden, wobei zwei identische Fab-Fragmente (*Fragment antigen binding*) und ein Fc-Fragment (*Fragment crystallizable*) entsteht. Das Fab-Fragment besteht aus der kompletten leichten Kette und dem variablen Bereich sowie der ersten konstanten Domäne der schweren Kette (V_H und C_H1). Die restlichen konstanten Domänen bilden den Fc-Teil (Porter, 1972). Eine schematische Darstellung der Struktur von IgG1 ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

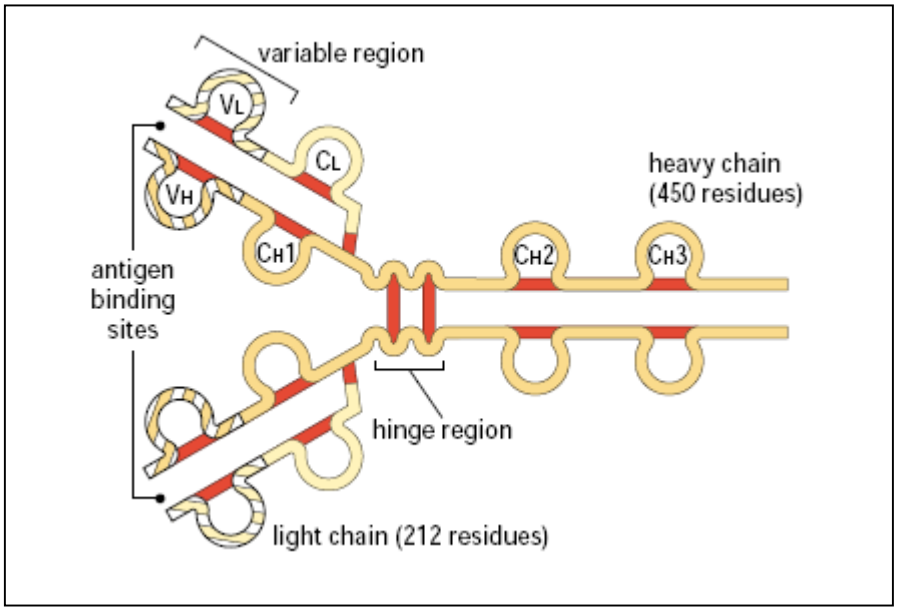


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Struktur von IgG1. V: variable Region. C: konstante Region. L: leichte Kette. H: schwere Kette [aus 1]

Während Fab für die Antigenbindung zuständig ist, ist Fc der Teil der mit Effektormolekülen oder -Zellen interagiert. Die variablen Domänen des Fab-Fragments unterscheiden sich von Antikörper zu Antikörper. Drei Segmente der variablen Region werden als „hypervariable Region“ bezeichnet. Diese Region ist auf den Schleifen der β-Stränge lokalisiert und vermittelt die Antigen-spezifische Bindung und wird daher auch als komplementaritätsbestimmende Region (CDR = *complementarity-determining region*) bezeichnet. Der dazwischen liegende weniger variable Bereich wird „Framework Region“ genannt.

Die Sekretion der Antikörper ist die Haupt-Effektorfunktion der B-Zellen im erworbenen (adaptiven) Immunsystem bzw. in der humoralen Immunantwort. Antikörper befinden sich im Blut, Plasma und extrazellulären Flüssigkeiten und schützen entweder durch Neutralisation von Viren, Bakterien oder bakterielle Toxinen oder durch die Aktivierung von phagozytischen Zellen wie Makrophagen durch Opsonierung der Pathogene. Eine weitere Funktion ist die Aktivierung des „klassischen Weges“ des Komplementsystems, in dem sie mit ihrem Fab-Teil an die Oberfläche des Pathogens binden und gleichzeitig mit ihrem Fc-Teil an die Komponente C1 der Komplement Kaskade (Ravetch and Bolland, 2001).

1.3 Weichenstellung zur Th1-/Th2-Antwort

Für die Induktion einer Th1- oder Th2-Immunantwort werden Zytokine als Schlüsselfaktoren diskutiert. Wie schon erwähnt, differenzieren native Th-Zellen *in vitro* nur in Gegenwart von IL-4 zur Th2-Zelle (Paul and Seder, 1994). Man bezeichnet dieses IL-4 als so genanntes „frühes IL-4“, da es sehr früh (d.h. innerhalb von Stunden) im Rahmen der primären Immunantwort gegen ein Pathogen anwesend sein muss, um diese in Richtung des Th2-Phänotyps zu lenken. Die wichtigsten Auslöser für die Produktion des „frühen IL-4“ sind Allergene und parasitäre Würmer (Helminthen). Das Schlüsselzytokin für die Weichenstellung einer Th1-Differenzierung ist das IL-12 (Hsieh et al., 1993). Die zelluläre Quelle dieses Zytokins sind hauptsächlich dendritische Zellen, welche die höchstspezialisierten antigenpräsentierenden Zellen darstellen (Banchereau and Steinman 1998). Neben den dendritischen Zellen sind aber auch Makrophagen in der Lage IL-12 freizusetzen und eine Th1-Antwort zu induzieren. Aktiviert werden diese Zellen durch phagozytierte Pathogene. Weiterhin kann auch IFN-γ die IL-12-Ausschüttung der Makrophagen stimulieren und gilt damit ebenfalls als ein Th1-Induktor (Paul and Seder, 1994). Die zelluläre Quelle für das „frühe IL-4“ ist dagegen noch nicht bekannt. Neben Th2-Zellen können basophile und eosinophile Granulozyten, NKT-Zellen und in der Maus auch Mastzellen IL-4 freisetzen und kommen somit als Quelle des frühen IL-4 in Frage. Insbesondere basophile Granulozyten (Basophile) sind in der Lage sehr schnell große Mengen an IL-4 freizusetzen (Brunner et al., 1993; Devouassoux et al., 1999; Mitre E et al., 2004; Min et al., 2004). Aus diesem Grund ist es sehr gut vorstellbar, das Basophile die zelluläre Quelle des „frühen IL-4“ darstellen. Neben dem IL-4 scheint auch das IL-1 eine Rolle bei der Th2-Differenzierung zu spielen. So beschrieb Manetti et al. (1994), dass IL-1 die Entwicklung von Th2-Zellen *in vitro* begünstigt. Das Zytokinmilieu stellt einen wichtigen Faktor für die Kontrolle der Th-Differenzierung dar. Pernis et al. (1995) konnten z. B. zeigen, dass die Anwesenheit von IFN-γ die murine Th1-Entwicklung, aufgrund des anti-proliferativen Effekts auf Th2-Zellen, begünstigt. Ebenso inhibiert IL-4 die Entwicklung von Th-1-Zellen. Werden z. B. *Leishmania major* infizierte Mäuse mit dominierender IL-4-Produktion mit anti-IL-4 behandelt, erfolgt ein „switch“ zur IFN-γ-Produktion (Sadick et al., 1990; Chatelein et al., 1992).

Neben der Zytokinfunktion haben noch andere Faktoren einen Einfluss darauf, welche Immunantwort zum Tragen kommt. So spielen auch die Art der antigenpräsentierenden Zelle, die Art des Pathogens und genetische Faktoren eine Rolle bei der Weichenstellung zur Th1- und Th2-Antwort.

1.4 Humane basophile Granulozyten als Effektorzelle der Th2-Antwort

Basophile stellen eine kleine Population von Leukozyten dar, die sich im peripheren Blutkreislauf befinden. Sie wurden erstmals 1879 von Paul Ehrlich beschrieben und standen lange im Schatten der gewebsansässigen Mastzellen, denen sie in ihrer Morphologie und gespeicherten Mediatoren sehr ähneln. Die Granula der Basophilen enthalten vor allem Histamin, Leukotriene und Heparin. Unter normalen Bedingungen befinden sich weniger als 1% Basophile im peripheren Blut. Mehrere Studien konnten aber zeigen, dass die Anzahl der Basophilen in Antwort auf allergische Reaktionen ansteigt und diese in das betroffene Gewebe einwandern können (KleinJan et al., 2000; Mcfarlane et al., 2000; Nouri-Aria et al., 2001). Zudem stellen sie, wie schon oben beschrieben, eine wichtige Quelle für die Th2-Typ-Zytokine IL-4 und IL-13 dar (Brunner et al., 1993; Gibbs et al., 1996). Aus diesem Grund spielen sie sehr wahrscheinlich eine große Rolle bei der Induktion der Th2-Antwort und gesteigerten IgE-Synthese. Wie unter 1.1 erwähnt, bedarf es für den Isotypwechsel von IgM zu IgE einer Interaktion zwischen CD40 und CD40-Ligand auf Th2-Zellen und IL-4 muss vorliegen. Basophile und Mastzellen sind neben den Th2-Zellen ebenfalls in der Lage den CD40-Liganden auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und können daher Th-Zell-unabhängig in B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgE induzieren (Gauchat et al., 1993).

1.5 IgE-vermittelte Aktivierung der Basophilen

Humane Basophile und Mastzellen sowie auch Monozyten, Eosinophile, Blutplättchen und dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den hoch-affinen IgE-Rezeptor (FcεRI) an welchen monomeres IgE mit hoher Affinität bindet. Es gibt sowohl eine klassische tetramere Form des Rezeptors, die aus einer α-Kette, einer β-Kette und zwei homodimeren γ-Ketten ($\alpha\beta\gamma_2$) besteht, und eine trimere Form ohne β-Kette. Die klassische Form wird hierbei hauptsächlich von Basophilen und Mastzellen exprimiert (Kinet, 1999). Die Aktivierung der Basophilen erfolgt bei einer Allergie antigenspezifisch durch die Quervernetzung des FcεRI-ständigen IgEs über ein Allergen, wobei die Mediatoren Histamin, Leukotrien C4, IL-4 und IL-13 freigesetzt werden (Metzger, 1992). Histamin und Leukotrien C4 sind für die Symptome einer Allergie verantwortlich. Da Histamin präformiert in den cytoplasmatischen Granula vorliegt, kann dieser Mediator sehr schnell über Degranulation freigesetzt werden (Kagey-Sobotka et al., 1981). Auch IL-4 liegt zum Teil präformiert vor und wird innerhalb von 10-15 min nach IgE-Quervernetzung abgegeben. Die Hauptmenge von IL-4 und IL-13

wird jedoch *de novo* synthetisiert und kann somit erst später (nach Stunden) freigesetzt werden (Gibbs et al., 1996). Neben dieser antigenspezifischen Aktivierung der Basophilen durch Allergene gibt es auch Substanzen, die Basophile ebenfalls IgE-vermittelt aber antigenunspezifisch aktivieren können. Zu diesen Substanzen gehören Lektine (Haas et al., 1999) und B-Zellsuperantigene. Multivalente B-Zellsuperantigene binden an die variable Region von Schwer- oder Leichtketten humaner Immunglobuline und können diese quervernetzen. Es ist bekannt, dass einige B-Zellsuperantigene auf diese Weise Basophile zur Freisetzung von IL-4 und IL-13 anregen. Hierzu gehören z. B. das humane endogene Protein Fv, das Glykoprotein 120 von HIV-1 (gp 120), Protein L aus *Peptostreptococcus magnus* und Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Patella et al., 1999; Florio et al., 2000; Genovese et al., 2003). Das Protein Fv und gp120 binden hierbei V_H3-spezifisch an das FcεRI-gebundene IgE, während das Protein L an die variable Domäne der κ-Leichtkette von IgE bindet.
Lektine dagegen vermögen über die Bindung der Zuckerseitenketten von IgE, FcεRI-gebundenes IgE querzuvernetzen und Basophile zu aktivieren.

1.6 Induktion der IL-4 Freisetzung und Th2-Antwort durch Helminthen

Wie bereits erwähnt, sind parasitäre Würmer potente Auslöser für die Entwicklung einer Th2-Antwort. Typischerweise findet man dabei neben der gesteigerten IgE-Synthese auch eine Eosinophilie und Mastozytose, die ebenfalls durch Th2-Zytokine hervorgerufen werden (Finkelman et al., 1991). Die verschiedenen Lebensstadien eines Parasiten können sich beträchtlich in ihrer Fähigkeit, eine bestimmte Th-Antwort zu induzieren, unterscheiden. So konnte z. B. für *Schistosoma mansoni* in der Maus gezeigt werden, dass das Larvenstadium eine Th1- und das Eistadium eine Th2-Antwort auslöst (Pearce et al., 1991; Grzych et al., 1991). In BALB/c Mäusen wurde weiterhin gezeigt, dass das adulte Stadium von *Brugia malayi* eine IL-4 induzierende Kapazität besitzt, während *B. malayi*-Mikrofilarien eine IFN-γ Produktion auslösen (Lawrence et al., 1994). Diese stadienspezifische Induktion der Th2-Antwort im Mausmodell konnte später auch auf *S. mansoni*-infizierte Patienten übertragen werden (Williams et al., 1994). In Gen-manipulierten Mäusen (G4-Mäusen), die mit *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert waren, konnte eine IL-4-Freisetzung aus Basophilen beobachtet werden. Bei diesen Mäusen wurde das erste Exon des IL-4-Gens durch das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) ersetzt, so dass IL-4-exprimierende Zellen grün leuchten. Nur in infizierten G4-Mäusen konnten grün leuchtende Zellen beobachtet werden,

bei denen es sich um Basophile handelte (Min et al., 2004). Diese Beobachtung ist ein Indiz für die Rolle der Basophile als Quelle des „frühen IL-4. Die Th2-Antwort des Immunsystems trägt zur Elimination des Parasiten aus dem Körper bei. Maizels und Holland (1998) zeigten, dass die Entfernung intestinaler Würmer aus dem Darm auf zwei Ebenen erfolgt. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 wirken direkt auf die Zellen der Darmschleimwand, wobei es zu einer Erhöhung der Mucussekretion und der Peristaltik kommt. Gleichzeitig erfolgt über IgE die Degranulation der Mastzellen. Hierbei werden IL-4 und IL-13, Histamin und Leukotriene freigesetzt, die die Wirkung auf die Zellen der Darmschleimhaut noch verstärken. Neben dem spezifischen IgE wird auch nichtspezifisches polyklonales IgE während einer Helmintheninfektion produziert. Pritchard (1993) nimmt an, dass die große Menge von nichtspezifischem IgE im Plasma einen Schutz für den Wurm selber darstellt. Dieses konkurriert mit dem spezifischen IgE um die Bindung an den FcεRI-Rezeptor auf Basophile, Mastzellen und Eosinophilen und verhindert dadurch die Antigen-spezifische Elimination der Parasiten. Aber nicht nur die Th2-Antwort ist protektiv gegen den parasitären Wurm, sondern auch die Th1-Antwort (Sher and Coffman, 1992). Die Sekretion von immunmodulatorischen Molekülen und damit die Umgehung der Immunantwort des Wirtes ist eine von mehreren Strategien des Parasiten, sein Überleben im Wirt zu sichern. Weitere Strategien sind u.a. die enzymatische Spaltung von Antikörpern und der Einbau von Wirtsantigenen in das Tegument des Parasiten (molekulare Mimikry) (Pearce und Sher, 1987; Damian, 1997; Maizels et al., 1993). Für Schistosomen wurde eine Überlebensdauer von über 30 Jahren im Menschen festgestellt (Chabasse et al., 1985).

1.7 *Schistosoma mansoni* – Modellorganismus für die Untersuchung der Weichenstellung zur Th-2-Antwort

Schistosomen (auch als „Pärchenegel“ bekannt) gehören zur Klasse der Digenea und werden herkömmlich als Trematoden bezeichnet. Mehr als 200 Millionen Menschen sind mit Schistosomiasis infiziert und ungefähr 280.000 Menschen sterben pro Jahr in Afrika in der Sub-Sahara-Zone an den Folgen der Infektion mit *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma haematobium* (van der Werf, 2003). Die Erkrankung ist auch bekannt als Bilharziose, nach dem Namen des Entdeckers Theodor Bilharz (1825-1862). Der Trematode *Schistosoma mansoni* ist der Erreger der Darmbilharziose. Sein Lebenszyklus ist mit einem Wirtswechsel verbunden. Der spezifische Zwischenwirt ist die Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata*.

Ihr Lebensraum ist vor allem stehendes und langsam fließendes Gewässer. Diese Schnecken geben in das Wasser große Mengen an Zerkarien (Gabelschwanzlarven) ab, die freischwimmend nur für kurze Zeit lebensfähig sind und sich in die Haut ihres Endwirtes (Mensch, Nager) einbohren. Bei diesem Prozess verlieren sie ihre Glykokalix und den Gabelschwanz und entwickeln sich zum Schistosomulum. Die Schistosomula wandern durch die Haut ins Blutsystem und werden über die Lunge und Herz zur Pfortader geschwemmt, verpaaren sich dort und wandern als Pärchen zu ihrem artspezifischen Ansiedlungsort, den Mesenterialvenen des Darmes. Das Weibchen produziert ca. 300 Eier pro Tag. Durch Entzündungsreaktionen in den Venen, in denen die adulten Pärchenegel leben, werden die Gefäße durchlässig und etwa 50 % der Eier gelangen mit Hilfe von proteolytisch wirkenden Proteinen in den Darm und werden mit dem Stuhl ausgeschieden. Die übrigen Eier werden mit dem Pfortaderblut in die Leber geschwemmt und werden dort von Immunzellen (Makrophagen, Eosinophile und CD^{4+}-T-Zellen) umgeben, was zur Granulombildung führt (Pearce und MacDonald, 2002). Gelangen die ausgeschiedenen Eier ins Süßwasser (hypotonischer Reiz) und erhalten Lichtkontakt, schlüpfen aus den Eiern Mirazidien (Flimmerlarven), die den Zwischenwirt (*Biomphalaria glabrata*) chemotaktisch aufsuchen und in ihn eindringen. Dort erfolgt die parthogenetische Vermehrung über Sporozysten zu Zerkarien und der Lebenszyklus ist geschlossen. Abbildung 1.2 zeigt die Eier und ein adultes Pärchen von *S. mansoni*

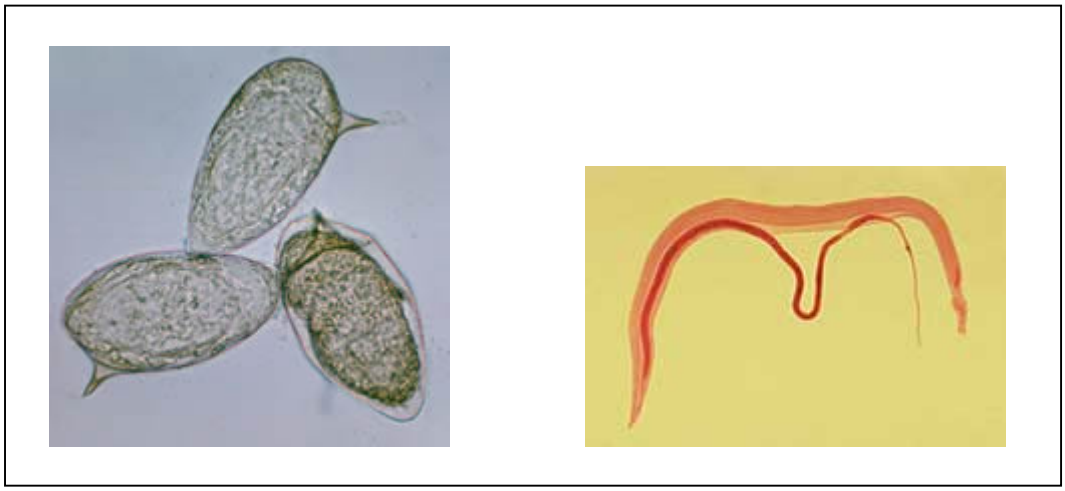


Abbildung 1.2: Eier (links) und adultes Pärchen (rechts) von *Schistosoma mansoni* [aus 2 und 3].
Das breitere und kürzere Männchen bildet durch Übereinanderschlagen der seitlichen Körperränder eine Bauchfalte (Canalis gynaecophorus = Weibchen-tragender Kanal), in dem das längere und dünnere Weibchen liegt. Die Eier zeigen den charakteristischen Seitenstachel bei *S. mansoni*.

Es sind zwei Verlaufsformen der Schistosomiasis bei *S. mansoni* infizierten Patienten bekannt, die akute Schistosomiasis und die chronische Schistosomiasis. Die akute Schistosomiasis tritt vor der Produktion von Eiern auf und ist von einer Th1-Antwort geprägt. Fünf bis sechs Wochen nach der Infektion beginnt die chronische Phase und damit die kontinuierliche Eiproduktion (Pearce und MacDonald, 2002). Dieser Phasenwechsel geht auch mit einem Wechsel der Immunantwort einher. Die chronische Phase ist von einer Th2-Antwort geprägt, mit gleichzeitigem Abfall der Wurmantigen-spezifischen Th1-Antwort (Pearce et al., 1991). Untersuchungen in C57BL/6 IL4$^{-/-}$ Mäusen zeigten, dass die Unfähigkeit eine Th2-Antwort zu entwickeln, in einer übersteigerten Th1-Antwort mit tödlicher Hyperinflammation resultiert. Daraus ergibt sich, dass die Th2-Antwort für das Überleben des Wirtes notwendig ist (Brunet et al., 1997). Dass es das Eistadium ist, welches für die Induktion einer Th2-Antwort im Rahmen der Schistosomeninfektion verantwortlich ist, wurde von Grzych et al. (1991) demonstriert. Wie erwähnt, werden Eier die im Körper verbleiben vom kollagenhaltigen Granulom der Immunzellen umschlossen. Lösliche Ei-Antigene steigern hierbei die Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese, was zur Leberfibrose führt (Prakash und Wyler, 1992). In Mäusen zeigte sich, dass auch das Th2-Zytokin IL-13 für eine Leberfibrose verantwortlich ist. In Schistosomen-infizierten Mäusen konnte in Abwesenheit von IL-13 keine Entwicklung der Leberfibrose und ein anhaltendes Überleben der Mäuse beobachtet werden (Fallon et al., 2000; Chiaramonte et al., 1999). In infizierten Menschen, ist es noch nicht geklärt, ob IL-13 für die Entstehung einer Leberfibrose eine wichtige Rolle spielt.

Etwa 9 Wochen nach der Infektion wird auch die Th2-Antwort supprimiert. Für die Immunregulation von der akuten zur chronischen Phase spielt das IL-10 eine wichtige Rolle. Sadler et al. (2003) konnten in IL-10$^{-/-}$ Mäusen zeigen, dass in Abwesenheit von IL-10 sowohl die Konzentration von IFN-γ als auch von IL-4 erhöht blieb, was sowohl auf eine bleibende Th1- als auch auf eine bleibende Th2-Antwort hindeutet. Zusätzlich zeigte sich, dass die Granulomgröße in IL-10$^{-/-}$ Tieren nach 15 Wochen der Infektion weiter zunahm, während sie in WT Mäusen kleiner wurden. Somit könnte IL-10 ein wichtiges Molekül zur Vermeidung der Entwicklung einer exzessiven Th1- und Th2-Antwort sein.

Ultrastrukturelle Untersuchungen von *S. mansoni* Eiern ergaben, dass das Mirazidium im reifen Ei von zwei Hüllschichten, dem *von Lichtenbergs envelope* und dem *Reynold's layer* umgeben ist, die direkt unterhalb der Eischale liegen und gut von dieser abgrenzbar sind (Ashton et al., 2001) Der direkt an das Mirazidium anschließende *von Lichtenberg's envelope* enthält große Mengen des rauhen endoplasmatischen Retikulums, was auf eine hohe

Proteinsyntheserate in diesem Bereich hindeutet. Die synthetisierten Proteine werden offensichtlich im Reynold's layer zwischengespeichert, bevor sie über Poren in der Eischale in die Umgebung sekretiert werden, wo sie dann mit Zellen des Immunsystems in Wechselwirkung treten können.

1.8 IPSE/alpha-1 – ein sekretiertes Protein aus *Schistosoma mansoni*-Eiern induziert die Freisetzung von IL-4 aus humanen Basophilen

Falcone et al. (1996) konnten zeigen, dass der wasserlösliche Extrakt von *Schistosoma mansoni*-Eiern (SmEA = *Schistosoma mansoni* Ei Antigen) bei humanen Basophilen eine Freisetzung von IL-4, IL-13 und Histamin bewirkt. Schramm et al. (2003) konnte das aktive Prinzip isolieren und charakterisieren. Es ist ein Glykoprotein, welches den Namen IPSE („IL-4 inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs") erhielt. Depletions- und Neutralisationsversuche mit IPSE-spezifischen Antikörpern zeigten, dass ausschließlich IPSE für die Basophilen-Aktivierung durch SmEA verantwortlich ist. In Kulturüberständen von lebenden *S. mansoni*-Eiern sind beträchtliche Mengen an IPSE nachweisbar. Immunhistologische Untersuchungen zeigten IPSE unterhalb der Eischale (vermutlich im von Lichtenberg's *envelope* und Reynold's *layer*) aber auch in zirkum-ovalen Entzündungszellen. Das heißt, dass IPSE von den Eiern sekretiert wird und von den umgebenden Immunzellen aufgenommen wird.

Natürliches IPSE (nIPSE) ist ein stark glykosyliertes Homodimer mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Etwa ein Drittel des Molekulargewichtes bezieht sich hierbei auf den Zuckeranteil. Nach Abspaltung einer Signalsequenz von 20 Aminsosäuren besteht die Einzelkette des maturen Proteins aus 114 Aminosäuren. Sie weist zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen und sieben Cysteinreste auf. Es bestehen keine Homologien zu Proteinen in anderen Spezies als Schistosomen; IPSE ist somit ein einzigartiges Protein. Es zeigte sich allerdings, dass drei andere Schistosomen-Ei-Proteine mit IPSE identisch sind: alpha-1, smCKBP und SmEP25. Das Antigen alpha-1 wurde als stark immunogene Schistosomen-Ei-Komponente von Dunne et al. (1991) beschrieben und später als Vakzine-Kandidat diskutiert. Untersuchungen von Schramm et al. (2006) zeigten, dass alpha-1 und IPSE identisch sind. IPSE wird daher als IPSE/alpha-1 bezeichnet. Bei smCKBP (Smith et al., 2005) handelt es sich um ein Chemokin-bindendes und -neutralisierendes Protein aus *S. mansoni*-Eiern, dem anti-entzündliche Aktivität zugeschrieben wurde. Bei SmEP25 (Williams

et al., 2005) handelt es sich um ein Protein, das die Proliferation sowie Freisetzung von IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-5 aus CD4+-Zellen von infizierten CBA und C57BL/6 Mäusen stimuliert und eine Rolle als T-Zell-Mitogen spielen soll.

Stripping-Experimente mit humanen Basophilen, bei denen FcεRI-gebundenes IgE von der Oberfläche der Basophilen entfernt wurde, zeigten, dass die Basophilenaktivierung durch IPSE/alpha-1 IgE-abhängig ist (Haisch et al., 2001). Sowohl Basophile als auch das IgE stammten von nicht-infizierten Spendern. Dies deutet auf eine antigenunspezifische Bindung von IPSE/alpha-1 hin. IPSE/alpha-1 besitzt eine hohe spezifische Aktivität: zur Basophilenaktivierung reichen bereits Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich (20-100 ng/ml) aus. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass neben der Bindung an humanes IgE, IPSE/alpha-1 auch speziesübergreifend - mit geringerer Affinität - an IgG, IgM und IgA bindet. IPSE/alpha-1 ist somit ein allgemein Immunglobulin-bindender Faktor (Blindow 2004). Weitere Untersuchungen bestätigten zusätzlich die Bindung an Fab- und Fc-Fragmente sowie an Fab_2-Fragmente von IgE und IgG (Blindow, 2004) . Wie unter 1.5 beschrieben erfolgt der allgemein akzeptierte Mechanismus der Basophilenaktivierung durch eine Quervernetzung des FcεRI-rezeptorgebundenem IgEs (Metzger, 1992). Da IPSE/alpha-1 unspezifisch an IgE bindet, kann eine antigenspezifische Quervernetzung ausgeschlossen werden. Unspezifische Quervernetzungen über die Bindung an Zuckerseitenketten, wie bei einem Lektin (Haas et al., 1999) oder über Multivalenz, wie bei einem B-Zellsuperantigen, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Es war bereits bekannt, dass die Aminosäuresequenz von IPSE/alpha-1 keine Ähnlichkeiten zu bekannten tierischen oder pflanzlichen Lektinen aufweist (Schramm et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass IPSE/alpha-1 auch an deglykosyliertes IgG-Fc-Fragment bindet (Blindow, 2004). Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Quervernetzung von Immunglobulinen durch IPSE/alpha-1 mit verschiedenen Sandwich-Experimente im Dot-Blot (Schramm, unveröffentlicht) oder im BIACORE (Blindow, 2004) sowie Doppelimmunodiffusions-Experimente (Blindow, 2004; Wodrich, 2006) mit IgE und IgG zeigten, dass IPSE/alpha-1 Immunglobuline nicht quervernetzen kann und Basophile daher mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch IgE-Quervernetzung, sondern durch einen anderen Wirkungsmechanismus aktiviert. Bindungsstudien von IPSE/alpha-1 an IgG, IgG-Fab und IgG-Fc mittels Biacore-Experimenten in der Arbeit von Silke Blindow (2004) ergaben, dass immobilisiertes IPSE/alpha-1 in der Lage ist sowohl zwei Moleküle IgG-Fab als auch zwei Moleküle IgG-Fc unabhängig voneinander zu binden, aber nur ein Gesamtmolekül IgG, obwohl eine Bindung von zwei Molekülen möglich wäre. Eine

Quervernetzung von IgG durch IPSE/alpha-1 kann somit ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde gefunden, dass immobilisiertes IgG, im Gegensatz dazu, fähig ist zwei Moleküle IPSE/alpha-1 zu binden, und zwar in Form einer positiv kooperativen Bindung, wobei durch die Bindung des ersten IPSE/alpha-1-Moleküls, die Bindung des zweiten IPSE/alpha-1-Moleküls erleichtert wird (s. Abbildung 1.3, Modell aus der Dissertation von Blindow, 2004). Die hierbei aufgestellte Hypothese bezüglich des Aktivierungsmechanismus der Basophile ist, dass durch die erste Bindung von IPSE/alpha-1, sowohl an Fc als auch an Fab, eine Konformationsänderung von IgE erfolgt, die die Bindung des zweiten Moleküls von IPSE/alpha-1 begünstigt. Durch die erneute Bindung eines IPSE-Moleküls an IgE erfolgt eine weitere Konformationsänderung von IgE, die letztendlich zur Signaltransduktion der Zelle führt.

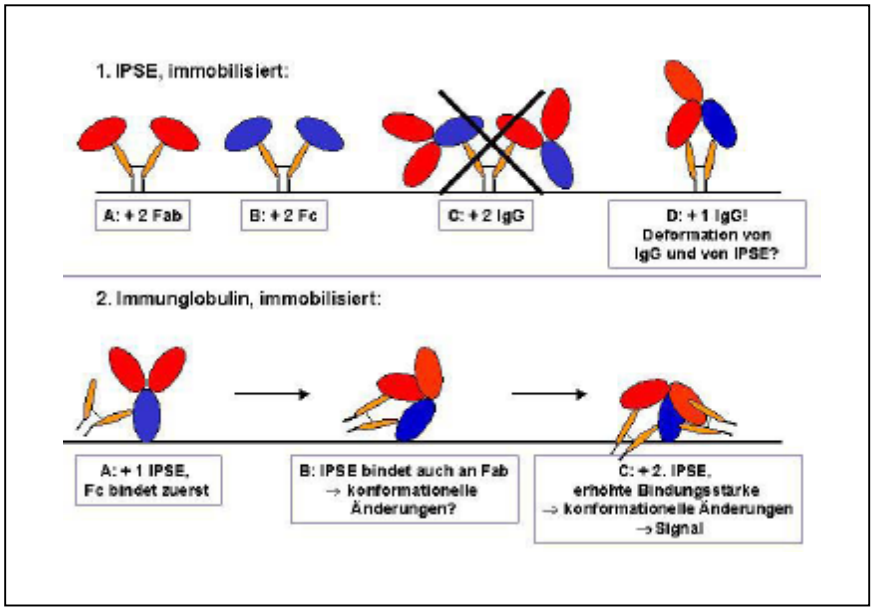


Abbildung 1.3: Modell für die Bindung zwischen IPSE/alpha-1 und Immunglobulin auf der Basis der Biacore-Ergebnisse (übernommen aus der Dissertation von Silke Blindow, 2004). 1. IPSE/alpha-1 ist immobilisiert und interagiert mit IgG-Fab (A), IgG-Fc (B) und dem Gesamtmolekül IgG (C): IPSE/alpha-1 ist in der Lage zwei Moleküle Fab und zwei Moleküle Fc unabhängig voneinander zu binden, aber nur ein Molekül IgG. 2. Das Gesamtmolekül IgG bzw IgE ist immobilisiert und interagiert mit IPSE/alpha-1: Es erfolgt vermutlich zuerst die Bindung an den Fc-Teil und dann an den Fab-Teil. Die dadurch entstehende Konformationsänderung des Immunglobulins erleichtert die Bindung des zweiten IPSE/alpha-1-Moleküls (positiv kooperativer Charakter). Durch die Bindung des zweiten Molküls erfolgt eine weitere Konformationsänderung des Immunglobulins.

1.9 Ziel dieser Arbeit

Wie beschrieben, wurde aus den Eiern des Trematoden *Schistosoma mansoni* ein Triggerfaktor (IPSE/alpha-1) isoliert, der Basophile zur Freisetzung von IL-4 aktiviert und daher mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Entstehung oder Verstärkung der Wurm-induzierten Th2-Antwort spielt. Frühere Bindungsstudien mit IgG und IgE weisen daraufhin, dass IPSE/alpha-1 Immunglobuline wider Erwarten nicht quervernetzen kann und somit Basophile nicht über den allgemein akzeptierten Mechanismus der Quervernetzung von IgE aktiviert.
Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, den Mechanismus der Basophilenaktivierung durch IPSE/alpha-1 weiter zu charakterisieren, insbesondere in Bezug auf die Bindungsstöchiometrie von IPSE/alpha-1 und Immunglobulin, die sich grundsätzlich unterscheiden sollte, je nachdem ob eine Quervernetzung vorliegt oder nicht.

- Um die Frage zu klären, an welchen Abschnitt des Immunglobulinmoleküls IPSE/alpha-1 präferentiell bindet, sollte mittels Dot-Blot-Analyse die Intensität seiner Bindung an das komplette IgG-Molekül und an dessen Fab- und Fc-Fragmente miteinander verglichen werden.

- Hinsichtlich der Fragen der Quervernetzung, Bindungsstöchiometrie und Bindungsaffinität zwischen IPSE/alpha-1 und Immunglobulinen sollte die Art der Komplexbildung zwischen IPSE/alpha-1 und Immunglobulinen in Lösung über Größenausschlusschromatographie und über chemische Quervernetzung präformierter Komplexe mit anschließender Darstellung in der SDS-PAGE charakterisiert werden.

- Eine weitere Charakterisierung der Komplexbildung zwischen IPSE/alpha-1 und Immunglobulinen sollte mit jeweils einem Festphasen-gekoppelten Bindungspartner im Sandwich-Blot und mittels Affinitätschromatographie erfolgen.

2 Materialien

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Für die Arbeit wurden nachstehende Reagenzien und Chemikalien verwendet, die mindestens den Reinheitsgrad *p. a*. aufwiesen

Produkt	**Firma**
Acrylamidlösung (Rotiphores Gel 30)	Roth, Karlsruhe, D
Aktivkohle	Roth, Karlsruhe, D
Alkalisch Phosphatase-markiertes Streptavidin (SAVAP)	Dianova, Hamburg, D
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, D
Aqua destillata	Braun, Melsungen, D
Basophil Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Biotin N-Hydroxysuccinimidester	Sigma, München, D
BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
5-Brom-4-Chlor-indolylphosphat (BCIP)	Serva, Heidelberg, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, D
EDC	Pierce Bitechnology, Rockford, USA
EDTA (Titrierkomplex III)	Roth, Karlsruhe, D
Eisessig	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, 96 %, vergällt	Merck, Darmstadt, D
Ethanolamin	Roth, Karlsruhe, D
Ficoll („Pancoll“)	PAN Biotech, Aidenbach, D
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, D
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D

Produkt	**Firma**
Hank's balanced Salt Solution (HBSS)	PAA, Pasching, A
High Molecular Weight Marker (HMW)	Bio-Rad, München, D
IL-3	Kirin Brewery, Tagasaki-shi, Gunma, J
IL-4 Eli-pair (IL-4 ELISA)	Diaclone, Bresancon, F
Imidazol	Sigma, München, D
Ionomycin	Sigma, München, D
Isopropylgalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Kochsalzlösungen, isotonische	Braun, Melsungen, D
Low Molecular Weight Marker (LMW)	Bio-Rad, München, D
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
May-Grünwald-Färbelösungen (Accustain^{TM})	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
ß-Mercaptoethanol	Sigma, München, D
MES	Roth, Karlruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Micro BCA^{TM} Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid	Sigma, München, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecysulfat (SDS)	ICN, Eschwege, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, D
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Serva, Heidelberg, D
Percoll^{TM}	Amersham, Biosciences, Uppsala, S
Protectomed basal Iscoves Medium (IMDM)	PAA, Pasching, A
Pyronin G	Serva, Heidelberg, D
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Pasching, D
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, D

Produkt	**Firma**
Sulfo-NHS	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
N, N, N’, N’-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, D
Trypanblaulösung	Sigma, München, D
Transferrin, human	Sigma, München, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Tween® 20	Merck, Darmstadt, D

2.2 Häufig verwendete Pufferlösungen

Die Puffer wurden mit einfach destilliertem entionisiertem Wasser (aqua dest.) angesetzt. Puffer, die für säulenchromatographische Methoden verwendet werden, werden mit bidestilliertem Wasser (Milli Q) angesetzt und zusätzlich filtriert (0,2 µm Membranfilter, Firma Schleicher & Schuell) und entgast. Speziell verwendete Puffer werden bei der jeweiligen Methode am Ende angeführt.

10x PBS-Stammlösung (pH 7,4 und pH 8,5)

1,37 M	NaCl
27 mM	KCl
100 mM	Na_2HPO_4 x $2H_2O$
20 mM	KH_2PO_4

Die Stammlösung wird für den Gebrauch 1:10 verdünnt und der pH-Wert auf 7,4 oder 8,5 eingestellt.

10x TBS-Stammlösung (pH 7,5)

1 M	Tris-HCl
1 M	NaCl
20 mM	$MgCl_2$

Der pH-Wert wird mit konz. Salzsäure auf 7,3 eingestellt.
Die Stammlösung wird für den Gebrauch 1:10 verdünnt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

TBST

Entspricht dem TBS-Puffer (pH 7,5) mit Zusatz von 0,05 % (v/v) Tween.

1x TBS-Puffer (pH 9,5)

0,1 M	Tris-HCl
0,1 M	NaCl
5 mM	$MgCl_2$

Der pH-Wert wird mit 1 M HCl auf 9,5 eingestellt.

2.3 Antikörper

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Antikörper

Name (Quelle)	Konjugation	Firma	Verdünnung
IgG (human, polyklonal)	-	Octapharma	unterschiedlich
IgG-Fab Fragment (human)	-	Acris	unterschiedlich
IgG-F(c) Fragment (human)	-	Acris	unterschiedlich
IgE (human, monoklonal, Klon HE1)	-	Diatec	unterschiedlich
anti-IPSE/alpha-1 (Kaninchen)	-	*	unterschiedlich
anti-IPSE/alpha-1 (monoklonal, Klon 74-4B7)	-	Labsoft	1:50
anti-Kaninchen IgG (Esel)	AP	Dianova	1:15000
anti-Maus IgG (Ziege)	AP	Dianova	1:20000
anti-human IgG (Fc) (Ziege)	AP	Dianova	1:20000
anti-human Ig (κ) (Ziege)	AP	Tago	unterschiedlich

* zur Verfügung gestellt von Prof. Michael J. Doenhoff (University of Bangor, Wales)

3 Methoden

Alle Experimente wurden mit rekombinanten IPSE/alpha-1-Molekülen durchgeführt. Rekombinantes IPSE/alpha-1 wurde sowohl in einem prokaryotischen Expressionsystem (*E. coli*) als auch in einem eukaryotischen Expressionssystem (293 HEK-Zellen) als His-getaggtes Fusionsprotein hergestellt. Es wird je nach Herstellungsweise entweder *E. coli*-IPSE/alpha-1 oder HEK-IPSE/alpha-1 genannt. In dieser Arbeit wurde mit beiden Molekülen gearbeitet. Zur Vereinfachung werden die Moleküle im Folgenden nur als *E. coli*-IPSE bzw. HEK-IPSE bezeichnet.

3.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

3.1.1 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test (Smith et al. 1985)

Für den BCA-Test wurde der „BCA™ Protein Assay Reagent Kit“ (Firma Pierce) verwendet. Für eine sensitivere Proteinbestimmung wurde mit dem „Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit“ (Firma Pierce) gearbeitet. Dieser besitzt eine Nachweisgrenze bis 0,5 µg/ml. Beide Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} in einer alkalischen Lösung durch Proteine, die mit Cu^{2+} einen Komplex bilden. 2,2´- Bicinchoninsäure (BCA) bildet mit dem Cu^{+} einen violetten Farbkomplex (Biuret-Reaktion), was den Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 570 nm ermöglicht.

3.1.2 Proteinbestimmung mit der spektralen Absorptionsmessung

Proteinkonzentrationen können mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 280 nm Wellenlänge bestimmt werden. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin (in geringerem Maß auch Phenyalanin) absorbieren bei dieser Wellenlänge. Über den spezifischen Extinktionkoeffizienten und der Absorption lässt sich die Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ermitteln:

$$\mathbf{A_{280\ nm} = \log (I_o / I) = \varepsilon_s \times c \times d \ \rightarrow \ c = A_{280\ nm} \times \varepsilon_s^{-1} \ (für\ d = 1)}$$

A = Absorption

ε_s = spezifischer Extinktionkoeffizienten [1 x mol^{-1} x cm^{-1}]

c = Proteinkonzentration [g x l^{-1}]

d = Schichtdicke der Küvette

I_0 = einfallendes Licht

I = austretendes Licht

Die spezifischen Extinktionkoeffizienten von HEK-IPSE (ε = 1,27) und *E. coli*-IPSE (ε = 1,77) wurden über das Programm ProtParam [4] ermittelt. Für die Messungen wurden 60 µl Probe in eine Kunststoff-Einmalküvette (UVette, Firma Eppendorf) gegeben und bei einer Wellenlänge von 280 nm im Photometer (BioPhotometer, Firma Eppendorf) gemessen. Als Leerwert diente das jeweilige Lösungsmittel der Probe, in dem es sich befand.

3.2 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse wird zum Entfernen von niedermolekularen Bestandteilen und zur Umpufferung einer Lösung eingesetzt. Kleine Moleküle diffundieren durch eine semipermeable Membran längs eines Konzentrationsgradienten, bis auf beiden Seiten ein Gleichgewicht eingestellt ist. Die Wahl der Dialysemembranen ist abhängig von dem Molekulargewicht der zu dialysierenden Probe. Bevor die Probe in den Dialyseschlauch gefüllt wurde, musste dieser vorher für 20 min in aqua dest. gewaschen und eingeweicht werden. Für das Einfüllen der Probe, wurde der Dialyseschlauch zuerst auf einer Seite verschlossen. Nach dem Einfüllen wurde die andere Seite ebenfalls verschlossen und der Schlauch und in das 100 – 1000fache Volumen Dialyselösung gelegt. Die Dialyse fand über 24 h bei 4°C unter rühren statt, wobei die Dialyselösung nach 1 und 3 Stunden gewechselt wurde. Nach der Dialyse wurde die Probe wieder aus dem Schlauch entnommen, und es wurde die Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.1)

3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Die SDS-PAGE wird zur Trennung von Proteinen aus einem Molekülgemisch eingesetzt. Dabei werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch SDS (sodium dodecyl sulfate), ein anionisches Detergenz, werden die hydrophoben Bindungen innerhalb des Proteins aufgehoben. Das Protein geht in eine lineare Form über. Die Eigenladung des Proteins wird durch das SDS überdeckt und es erhält eine negative Nettoladung. Aus diesem Grund werden Proteine nur noch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, anders als bei einer nativen PAGE. Dort wird sowohl nach Größe als auch nach Ladung getrennt. Wird zu dem Protein zusätzlich zum SDS noch β-Mercaptoethanol (β-ME) oder Dithiothreitol (DTT)

zugegeben kommt es zur Reduktion der Disulfidbrücken und somit zu einer vollständigen Denaturierung des Proteins.

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE eingesetzt. Diskontinuierlich bedeutet die Verwendung von zwei Gelen, ein Sammelgel und ein Trenngel. Das Sammelgel ist großporig und dient dazu, die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel zu fokussieren. Durch den sauren pH-Wert (pH 6,8) des Sammelgels liegen die im Laufpuffer enthaltenen Glycinionen ungeladen vor. Diese haben eine sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeit (Folgeionen) im Gegensatz zu den schnellwandernden Chloridionen (Leitionen). Zwischen Leit- und Folgeionen baut sich aufgrund des Mangels an Ladungsträgern, nach Anlegen eines elektrischen Feldes, eine hohe elektrische Spannung auf. Die dort befindlichen Proteine wandern dadurch schneller und werden zu einer scharfen Bande fokussiert. Dieser Effekt geht beim Eintritt in das Trenngel verloren. Das Trenngel besitzt einen pH-Wert von 8,8, was bewirkt, dass die Glycinionen eine negative Nettoladung enthalten und der Mangel an Ladungsträgern aufgehoben wird. Jetzt erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die Porengröße eines Gels wird durch die Gesamtkonzentration (T) von Acrylamid (Ac) und des quervernetzenden Methylenbisacrylamid (Bis) bestimmt. Den Vernetzungsgrad nennt man C (Cross-linking). Die Zusammensetzung für das Sammel- und Trenngel sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Sammelgel wurden diese zu gleichen Teilen mit nicht-reduzierendem 2x Probenpuffer versetzt. Neben den Proben wurde ein Marker (High Molecular Weight / Low Molecular Weight, Firma Biorad) zur Abschätzung des Molekulargewichtes mitlaufen gelassen. Dieser ist vorher entsprechend der Herstellerangaben 1:20 in 1x reduzierendem Probenpuffer verdünnt worden. Für die nachfolgenden Silberfärbungen der Gele (s. 3.8) wurden 2 µl des jeweiligen Markers aufgetragen. Zur Auftrennung der Proben wurde eine Elektrophoresekammer der Firma Phase verwendet. Die Fokussierung und das Eintreten der Proteine in das Trenngel erfolgten bei 50 V. Danach wurde die Spannung auf 100 V erhöht.

4x Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Tris-HCl

4x Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M Tris-HCl

2x Probenpuffer (pH 6,8, nicht-reduzierend)

0,12 M Tris-HCl

20 % (v/v) Glycerin

4 % (v/v) SDS

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrodenpuffer

50 mM Tris-HCl
384 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

2x Probenpuffer (pH 6,8, reduzierend)

Zusatz von 1 % (w/v) DTT in dem nicht-reduzierenden Probenpuffer

Tabelle 3.1: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel für die SDS-PAGE

	Sammelgel	Trenngel (C = 2,7 %)		
	T = 4%	T = 7,5 %	T = 10 %	T = 12 %
Aqua dest.	2,9 ml	8 ml	6,6 ml	5,5 ml
Acrylamidlösung (T = 30 %, Bis = 0,8 %)	850 µl	4 ml	5,4 ml	6,5 ml
4x Sammelgelpuffer	1,3 ml	-		
4x Trenngelpuffer	-	4 ml		
Pyronin G	16 µl	-		
SDS (10 % (w/v))	51 µl	163 µl		
TEMED	5 µl	16 µl		
APS (10 % (w/v))	30 µl	100 µl		

3.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Das Prinzip der Silberfärbung, ist die Komplexbildung von Ag^+-Ionen mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten von Proteinen. Durch alkalisches Formaldehyd wird das Ag^+ der Komplexe zu Ag reduziert und die Proteinbanden sichtbar gemacht. Für die Silberfärbung der Gele wurde ein Protokoll nach Heukeshoven und Dernick (1988) verwendet. Die Nachweisgrenze liegt hierbei bei 50 bis 100 pg Protein pro Bande.

Vor dem Färben wurden die Proteine im Gel für 2h fixiert und das Gel anschließend über Nacht in einer thiosulfathaltige Lösung inkubiert. Danach wurde das Gel 3x für 10 min mit aqua bidest gewaschen und dann für 1 h in der Silberlösung inkubiert. Nach erneutem kurzem Waschen mit aqua bidest wurden die Banden in der Entwicklerlösung bis zur gewünschten Färbung entwickelt. Durch 10 min Inkubation in einer Stopplösung wurde die Reaktion beendet. Danach wurde erneut für 10 min gewaschen und das Gel dann für mind. 1 Stunde zur

Konservierung in eine 3 % Glycerinlösung gelegt. Zur Aufbewahrung wurde das Gel danach in zwei Lagen in aqua dest eingeweichter Einmachhaut auf einer Glasscheibe getrocknet.

Fixierlösung

30 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Eisessig

Inkubationslösung

30 % (v/v) Ethanol
500 mM Natriumacetat
0,5 % (v/v) Glutaraldehyd
0,3 % (w/v) Natriumthiosulfat
Glutaraldehyd und Natriumthiosulfat wurden erst kurz vor dem Gebrauch zugefügt.

Silberlösung

0,1 % (w/v) Silbernitrat
0,05 % (v/v) Formaldehyd
Die Silberlösung wurde direkt vor dem Gebrauch in aqua bidest. angesetzt.

Entwicklerlösung

230 mM Natriumcarbonat
0,05 % (v/v) Formaldehyd
Formaldehyd wurde erst kurz vor dem Gebrauch zugefügt.

Stopplösung

50 mM EDTA

3.5 Dot-Blot

Der Dot-Blot wird als immunologische Nachweistechnik eingesetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden mittels einer Filtrationsapparatur (SCR 96 D Minifold II, Firma Schleicher & Schuell) punktförmig auf eine zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran („Protran“ BA 85, Firma Schleicher & Schuell) gebracht. Dafür wurden zwei Blottingpapiere (GB 003, Firma Schleicher & Schuell) auf die Filterplatte gelegt, die wiederum auf der Vakuumkammer liegt, und diese mit PBS pH 7,4 getränkt, um so die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf die Blottingpapiere zu bringen. Die Membran wurde dann mit der „96-well“-Probenauftragsplatte (SRC 60) bedeckt und die Apparatur fest verschlossen. Damit wird verhindert, dass sich die Proben auf der Membran mischen. Es wurden insgesamt 100µl Probe (in PBS pH 7,4) pro Dot pipettiert und gewartet, bis die Flüssigkeit durch die Kapillarkräfte der Blottingpapiere eingesaugt wurde. Danach wurde pro Dot mit 200 µl PBS pH 7,4 gewaschen, wobei der Puffer durch Anlegen von Vakuum durch die Membran hindurchgezogen wurde. Anschließend wurden die Proben auf der Membran durch Erhitzen mit einem Fön fixiert und die Membran in TBST für 2h bis über Nacht blockiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran nochmals trocken gefönt und konnte dann für verschiedene Versuche eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde der Dot-Blot entweder für den Bindungsnachweis von *E. coli*-IPSE an IgG, IgG-Fab und IgG-Fc verwendet als auch für verschiedene Sandwich-Blot-Experimente, um die Bindungsstöchiometrie von IPSE an Immunglobulin zu untersuchen. Dafür wurde die Membran mit den enthaltenen Proben ausgeschnitten und für den jeweiligen Versuch mit den verschiedenen Bindungspartnern inkubiert (mind. 1,5 h). Die Bindungspartner wurden dafür in TBST verdünnt. Nach jeder Inkubation wurde die Membran 3x für 10 min mit TBST gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Vor der Detektion mit NBT/BCIP (s. 3.6) wurden die einzelnen Dots oder Streifen mit Tesafilm am oberen nicht-proteinenthaltenen Bereich der Membran zusammengeklebt und für 10 min in TBS pH 9,5 gewaschen.

3.6 Nachweis membrangebundener Proteine

Der immunologische Nachweis membrangebundener Proteine erfolgte mit Alkalischer Phosphatase. Alkalische Phosphatase (AP) ist entweder direkt an den eingesetzten Antikörpern gebunden oder an Streptavidin (SAVAP). AP ist ein Enzym, das Dephosphorylierungen katalysiert und wird in dieser Arbeit dazu eingesetzt von einem

Substrat-Chromogengemisch Phosphat abzuspalten Als Substrat wurde in dieser Arbeit 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) verwendet, welches nach Dephosphorylierung in einem blauen Farbstoff umgewandelt wird. Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) diente in dieser Reaktion als Oxidationsmittel, welches nach der Reaktion ebenfalls einen blauen Farbstoff ergibt und damit farbverstärkend wirkt.

BCIP-Stammlösung

5mg/ml BCIP gelöst in TBS-Puffer pH 9,5

NBT-Stammlösung

33 mg/ml NBT gelöst in TBS-Puffer pH 9,5

Anwendung des NBT/BCIP-Chromogengemisches

Es wurden 1ml BCIP-Stammlösung in 30 ml NBT-Stammlösung gemischt und auf 37° C erwärmt.

3.7 Biotinylierung von Proteinen

Biotin besitzt eine sehr hohe Affinität zu Avidin oder Streptavidin. Biotinylierte Proteine können daher sehr gut mit AP-gekoppelten Streptavidin nachgewiesen werden (s. 3.6). Die Biotinylierung von Proteinen erfolgt durch die Kopplung von Biotin über N-Hydroxysuccinimid an Amingruppen unter milden alkalischen Bedingungen. Für die Kopplung wurde NHS-Biotin in DMSO gelöst (1mg/ml). Das verwendete Protein wurde mit der Biotinlösung im Verhältnis 1 mg Biotin auf 6 mg Protein vermischt. Danach wurde für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösung durch Schwenken des Reaktionsgefäßes zwischendurch gemischt wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration von 50 mM) abgestoppt.

3.8 Chemische Quervernetzung von Proteinen

Für die chemische Quervernetzung von Proteinen wurden in dieser Arbeit die Reagenzien EDC [1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid] und Sulfo-NHS (*N*-Hydroxysulfosuccinimid) verwendet. EDC reagiert mit der Carboxylgruppe eines Moleküls und formt dabei ein Amin-reaktives Zwischenprodukt (*O*-acylisourea), welches unstabil in einer wässrigen Lösung vorliegt. Durch Zugabe von Sulfo-NHS wird das Produkt durch die Entstehung eines Amin-reaktiven Sulfo-NHS- Ester stabilisiert und es folgt die stabile Amidbindung an ein weiteres Molkül (s. Abbildung 3.1).

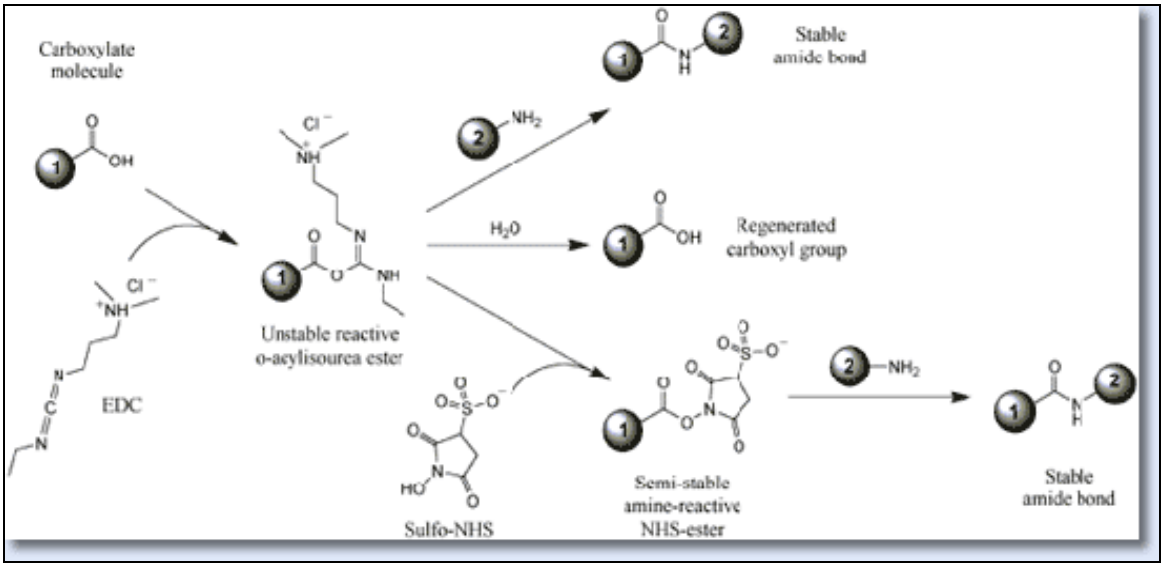


Abbildung 3.1: Chemische Quervernetzung von Proteinen mit EDC und Sulfo-NHS [aus 5]

Für die Versuche in dieser Arbeit wurde nach der Methode von Daniela M. Schulz et al. (2004) vorgegangen. Hierbei wurden die zu vernetzenden Proben in dem Aktivierungspuffer (0,1 M MES-Puffer, pH 5,5) auf eine bestimmte Konzentration verdünnt (Gesamtvolumen 300 µl) und das EDC, welches kurz vorher in aqua dest gelöst wurde, in 1000 fachen Überschuss zugegeben und sofort anschließend Sulfo-NHS (vorher in aqua dest gelöst) in 500 fachen Überschuss zugeführt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden 50 µl Aliquots abgenommen und die Reaktion mit 20 mM Glycin (Endkonzentration) gestoppt (nach Herstellerprotokoll, Pierce). Die Proben wurden anschließend entweder in einem bereits fertigen Tris-Acetat Gel (NuPage^{TM} 7% Tris-Acetat Gel, Invitrogen) oder in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung untersucht (s. 3.4).

3.9 Chromatographische Methoden

3.9.1 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Moleküle in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Ab einer bestimmten Größe können die Moleküle nicht mehr in die Zwischenräume oder in die Poren des Säulenmaterials eindringen und eluieren im Ausschlussvolumen (V_0). Moleküle mit kleinerer Größe durchwandern entweder die Partikelzwischenräume oder dringen in die Poren ein. Dadurch wird ihre Elution verzögert. Größere Moleküle werden daher eher von der Säule eluiert als kleinere Moleküle.

In dieser Arbeit wurde das Prinzip der Größenausschlusschromatographie für die Untersuchung der Komplexbildung von Immunglobulin und HEK-IPSE in Lösung genutzt. Für die Auftrennung der Moleküle wurden sowohl die Tricorn-Säule Superdex 200 10/300 GL als auch die Superdex 200 PC 3.2/30 (Firma Amersham Bioscience) eingesetzt. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe und in der Probenauftragsmenge Die Superdex 200 PC 3.2/30 wird für kleine Volumen ≤ 50 µl eingesetzt. Die poröse Matrix dieser Säulen besteht aus quervernetzter Agarose mit Dextran. Die Superdex 200-Säulen trennen globuläre Proteine im Größenbereich von 10000 – 600000 Da auf. Die Säulenläufe erfolgten an einer ÄktaPurifier-Anlage (Firma Amersham Bioscience). Das Proteinprofil wurde während der gesamten Läufe über einen UV-Monitor bei 280 nm aufgezeichnet.

3.9.1.1 Komplexbildung zwischen Immunglobulin (IgG, IgE) und HEK-IPSE in Lösung

Für die Untersuchung der Komplexbildung von Immunglobulin und HEK-IPSE in Lösung wurden entweder IgG und HEK-IPSE im 1:1-Verhältnis oder IgE und HEK-IPSE im 1:1-, 1:4- oder 2:1-Verhältnis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Firma Eppendorf) zusammengemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß zwischendurch geschwenkt wurde. Danach wurden die Proben mit PBS pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt und mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,4 ml/min über die Tricorn-Säule Superdex 200 10/300 GL gegeben. Als Laufpuffer diente PBS pH 7,4. Der Durchlauf wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und die erhaltenen Peaks in der SDS-PAGE (s 3.3) mit nachfolgender Silberfärbung (s. 3.4) untersucht.

Als Kontrolle wurden sowohl IgG und Protein L (Firma Pierce) als auch IgE und Protein L im 1:1-Verhältnis vermischt, inkubiert und über die Superdex 200 gegeben. Da für IgE und

Protein L kleine Mengen eingesetzt wurden, wurde für diesen Versuch die Superdex 200 PC 3.2/30 verwendet. Als Laufpuffer diente PBS pH 7,4.

3.9.1.2 Komplexbildung zwischen monomerem IgE und HEK-IPSE in Lösung

Für die Untersuchung der Komplexbildung von monomerem IgE und HEK-IPSE wurde zuerst nicht-aggregiertes IgE von aggregiertem IgE abgetrennt. Dafür wurden große Mengen IgE über die Tricorn-Säule Superdex 200 10/300 GL aufgetrennt und die monomeres (nicht aggregiertes) IgE enthaltenen Fraktionen gesammelt und mittels Vivaspin 500 (Firma Vivascience) eingeengt und die Proteinkonzentration (s. 3.1) bestimmt. Das monomere IgE wurde dann im 1:1- und 1:4-Verhältnis mit HEK-IPSE in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Firma Eppendorf) vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß zwischendurch geschwenkt wurde. Danach wurden die Proben mit PBS pH 7,4 auf 30 µl aufgefüllt und über die Tricorn-Säule Superdex 200 PC 3.2/30 mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,04 ml/min gegeben. Als Laufpuffer diente PBS pH 7,4. Der Durchlauf wurde in 0,1 ml Fraktionen gesammelt.

3.9.2 Affinitätschromatographien

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Bindung eines Moleküls an einen matrixgebundenen Bindungspartner. Dieses Prinzip wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Bindung von Immunglobulin (IgG, IgE) an IPSE und umgekehrt eingesetzt.

3.9.2.1 Bindung von IgG an HEK-IPSE mittels einer HEK-IPSE-Säule

Für die Bindungsuntersuchung von IgG an HEK-IPSE wurde 1,5 mg HEK-IPSE zuerst an eine 1 ml NHS-aktivierte HiTrap Sepharose-Säule (Firma Amersham Bioscience) nach Herstellerprotokoll kovalent gekoppelt. Dafür wurde HEK-IPSE zuerst gegen den Kopplungspuffer dialysiert. Die Kopplungseffizienz betrug 98,8 %. Die anschließende Bindung von 6 mg IgG an das gekoppelte HEK-IPSE erfolgte mittels eines ÄktaPurifiers (Firma Amersham Bioscience). Es wurden 100 µl IgG mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml/min über die Säule laufen gelassen. Als Laufpuffer wurde dabei PBS pH 7,4 verwendet. Das Proteinprofil wurde während des gesamten Laufes über einen UV-Monitor bei 280 nm

aufgezeichnet. Nichtgebundenes IgG (Durchlauf) wurde während des Laufes in 500 µl Fraktionen gesammelt und die Konzentration im BCA-Test gemessen (s. 3.1.1). Das an HEK-IPSE gebundene IgG wurde durch den Einsatz eines Elutionspuffers mit niedrigem pH-Wert (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7) wieder gelöst (Laufgeschwindigkeit 0,5 ml/min) und ebenfalls in 500 µl Fraktionen gesammelt. Der pH-Wert wurde durch sofortige Zugabe von 1 M Tris-HCl pH 9,0 (25 µl auf 500 µl) hochgestellt. Die Fraktionen konnten nicht im BCA-Test ausgewertet werden, da der Neutralisationspuffer störend auf die Messung wirkte. Die erhaltenen Fraktionen vom Durchlauf und Elution wurden nachträglich in einer SDS-PAGE (s. 3.3) untersucht.

Kopplungspuffer (pH 8,3)

200 mM $NaHCO_3$

500 mM NaCl

3.9.2.2 Bindung von IgG/IgE an IPSE mittels IMAC

Bei der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC) werden zweiwertige Ionen wie z. B. Ni^{2+} durch, an Agarose gebundene *N*-Nitrilo-tri-essigsäure (NTA) über vier Bindungsstellen chelatiert. Diese zweiwertigen Ionen haben eine hohe Affinität zu Histidin, welches als His_6-Tag an den rekombinant exprimierten IPSE-Molekülen vorliegt.

Für diesen Versuch wurde zuerst entweder *E. coli*-IPSE oder HEK-IPSE an die Ni-NTA-Agarose gebunden. Dafür wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose in einem 1,5 ml Reaktionsgefäßes (Firma Eppendorf) erst mit aqua dest gewaschen und dann mit 4x Inkubationspuffer äquilibriert, wobei die Agarose jedes Mal abzentrifugiert wurde (1000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde jeweils mit einer Pasteurpipette abgesogen. Die Bindung von IPSE erfolgte dann in 1x Inkubationspuffer, wobei zuerst die Menge an IPSE auf die Ni-NTA-Agarose gegeben wurde und anschließend mit 1x Inkubationspuffer auf 1 ml aufgefüllt wurde. Für die Bindung wurde auf einem Rollenmischer für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Bindung von IgG oder IgE an das Festphasen-gebundene IPSE. Dafür wurden die Immunglobuline im gleichen Verhältnis zu IPSE hinzugegeben und es wurde für weitere 30 min inkubiert, wobei hierbei das Reaktionsgefäß nur ab und zu geschwenkt wurde. Danach wurde die Mischung in eine Chromatographiesäule gefüllt und der Durchlauf gesammelt. Es wurde zwei bis drei Mal mit 1x Inkubationspuffer gewaschen und die

Waschfraktionen ebenfalls gesammelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit dem Elutionspuffer in 6-10 Fraktionen à 1 ml. Die gesammelten Fraktionen wurden nachträglich in der SDS-PAGE (s. 3.3) mit anschließender Silberfärbung (s. 3.4) untersucht.
Zusätzlich wurde auch die Bindung von HEK-IPSE und IgG mittels Vorinkubation der Moleküle in Lösung untersucht. Dafür wurden HEK-IPSE und IgG im 2:1-Verhältnis gemischt und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Äquilibrierung der Ni-NTA-Agarose (s. oben) wurde das Gemisch auf die Agarose gegeben und das Reaktionsgefäß auf 1 ml mit 1x Inkubationspuffer aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation von 90 min bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer. Danach wurde genauso weiterbehandelt wie oben beschrieben.

4x Inkubationspuffer

200 mM NaH_2PO_4
1,2 M NaCl
50 mM Imidazol
pH-Einstellung auf 8,0 mit 10 M NaOH

1x Inkubationspuffer

Hierfür wurde der 4x Inkubationspuffer mit aqua dest 1:4 verdünnt

Elutionspuffer

50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH- Einstellung auf 8,0 mit 1M NaOH

3.9.2.3 Bindung von HEK-IPSE an IgG mittels einer Protein G-Säule

Um die Bindung von HEK-IPSE an IgG zu untersuchen wurde IgG an das Protein G einer HiTrap Protein G Sepharose-Säule (Firma Amersham Bioscience) reversibel gebunden. Die Bindung von IgG an das Protein G der Sepharose-Säule erfolgte an einer ÄktaPurifier-Anlage (Firma Amersham Bioscience). Mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde 1 mg IgG über die Säule gegeben und der Durchlauf in 1 ml Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden dann 0,22 mg HEK-IPSE mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säule gegeben und der Durchlauf ebenfalls in 1 ml Fraktionen gesammelt. Als Laufpuffer diente jeweils PBS pH 7,4. Die Elution beider Moleküle erfolgte mit 0,1 M Glycin-HCl, pH

2,7 und einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min. Es wurden wieder 1 ml Fraktionen gesammelt. Das Proteinprofil wurde während der gesamten Läufe über einen UV-Monitor bei 280 nm aufgezeichnet. Die gesammelten Fraktionen wurden nachträglich in einer SDS-PAGE (s. 3.3) mit anschließender Silberfärbung (s. 3.4) untersucht.

3.10 Dynamische Lichtstreumessungen (DLS) mit HEK-IPSE

Die dynamische Lichtstreuung oder Photonen-Korrelationsspektroskopie ermöglicht die Bestimmung der Größenverteilung von Partikeln in Lösung. Die Untersuchung zur Größe von HEK-IPSE wurde im Institut für Biochemie an der Universität zu Lübeck in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hilgenfeld von Herrn Dr. Jeroen R. Mesters durchgeführt. Hierfür wurde das Gerät „Spectroscatter 201“ (Firma RiNA GmbH) verwendet.
Bei dieser Methode wird die Streuung von Laserlicht durch die Partikel ausgenutzt. Partikel in Lösung unterliegen einer Brownschen Molekularbewegung, wobei sich kleinere Partikel schneller bewegen als größere. Aus diesem Grund ändert sich die Lichtstreuungsintensität permanent. Bei größeren Partikeln bleibt die gemessene Streurate für längere Zeit konstant, während sie sich für kleinere Partikel in kürzerer Zeit wieder ändert. Aufgrund dieser Fluktuationsrate kann auf die Größe bzw. auf den hydrodynamischen Radius geschlossen werden. Der hydrodynamische Radius, auch „Stokes Radius“ genannt, beschreibt den Radius einer hypothetischen Kugel, die den gleichen Diffusionskoeffizienten besitzt wie das beschriebene Partikel. Dieser hydrodynamische Radius wird über die Stokes-Einstein-Beziehung definiert:

$$\mathbf{D = k_B T / 6\pi\eta r}$$

D = Diffusionskonstante
k_B = Boltzmannkonstante
T = Temperatur
η = Viskosität der Lösung
r = Hydrodynamischer Radius

Dieses Prinzip wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Aggregation von HEK-IPSE in PBS-Puffer eingesetzt. Für die Untersuchung wurde die Probe sowohl nicht-zentrifugiert als auch zentrifugiert (10 min; 13000 rpm) verwendet. Zusätzlich wurde ein Basophilenstimulationstest zur IL-4-Freisetzung durchgeführt (s. 3.12), wobei die Probe ebenfalls nicht-zentrifugiert und zentrifugiert untersucht wurde.

3.11 Aufreinigung humaner basophiler Granulozyten

Die Aufreinigung der humanen basophilen Granulozyten (Basophile) erfolgte nach der Methode von Haisch et al. (1999). Das Verfahren besteht aus einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll / Percoll, einer Gegenstrom-Elutriation und einer negativen Selektion mit immunomagnetischen Beads. Die Basophilen wurden aus Frischblut von freiwilligen, gesunden Spendern gewonnen. Eine Zustimmung der Ethikkommision der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck lag vor (Aktenzeichen 03-003). Das Blut wurde direkt bei der Abnahme mit 10 % (v/v) einer 100 mM EDTA-Lösung (pH 7,4) als Antikoagulanz vermischt.

3.11.1 Ficoll / Percoll Dichtegradienten-Zentrifugation

Eine 100:6 Ficoll / Percoll-Mischung (Dichte = 1080 g/l) wurde langsam mit dem frischen Blut-EDTA-Gemisch überschichtet (30 ml Blut auf 15 ml Ficoll / Percoll) und 25 min bei 4 °C und 1800 rpm zentrifugiert. Der Rotor wurde nach Beendigung der Zentrifugation nicht gebremst sondern langsam auslaufen gelassen, um eine Vermischung der Phasen zu vermeiden. Die leukozytenreiche Interphase wurde abgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt (2 Interphasen / Reaktionsgefäß). Diese wurden dann mit kalter, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (10 min Zentrifugation bei 4 °C; 1800 rpm) und die Zellpellets zusammen in 50 ml kaltem HBSS-Puffer aufgenommen.

HBSS-Puffer (pH 7,4)

10x HBSS-Lösung (Firma PAA) 1:10 mit aqua dest (Firma Braun) verdünnt
4,2 mM $NaHCO_3$
0,25 % (w/v) BSA

3.11.2 Gegenstrom-Elutriation

Bei der Gegenstrom-Elutriation ist eine Zentrifuge an eine Peristaltikpumpe angeschlossen, und ein Zellgemisch wird bei konstanter niedriger Fließgeschwindigkeit in die Zentrifuge eingespeist. Die Fließrichtung der Zellen und die Zentrifugalkraft sind einander entgegengesetzt, so dass die Zellen entsprechend ihrer Größe sortiert werden. Durch

stufenweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit können die Zellen nacheinander eluiert werden.

Die Anlage wurde zuerst mit aqua dest. und nachträglich mit eisgekühltem HBSS-Puffer gespült, und dann das aus der Dichtegradienten-Zentrifugation erhaltene Zellgemisch bei 3500 U/min und 30 ml/min in das System eingespeist. Als Laufpuffer diente der HBSS-Puffer. 200 ml des Durchflusses wurde bei dieser Fließgeschwindigkeit verworfen und die Fließgeschwindigkeit auf 33 ml/min erhöht und weitere 300 ml verworfen. Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass Basophile bei einer Fließgeschwindigkeit von 36 bis 45 ml/min eluieren. Aus diesem Grund wurden 4 x 50 ml bei 42 ml/min gesammelt und über Zentrifugation (10 min; 4 °C; 1800 rpm) eingeengt. Die Zellpellets wurde in insgesamt 5 ml HBSS-Puffer aufgenommen und vereinigt und die Zellzahl und Basophilenreinheit bestimmt.

3.11.3 Bestimmung der Zellzahl und Basophilenreinhheit

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellen mit 10 µl Trypanblau gemischt und die Zellen in der Neugebauer-Kammer gezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

Formel:

(ausgezählte Zellen x Verdünnung / mm^2 der ausgezählten Quadrate x Kammertife) x 10^3 = Zellen/ml

Quadratgröße: 0,25 mm
Kammertiefe: 0,1 mm

Für die Bestimmung der Reinheit wurden Zytospin-Präparate mit 150.000 Zellen/Objekträger angefertigt (500 U/min; 1 min) und 3 min mit May-Grünwald-Lösung gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop konnte dann die Reinheit bestimmt werden, wobei 100 Zellen ausgezählt wurden.

3.11.4 Negative Selektion mit immunomagnetischen Beads

Für die weitere Aufreinigung der Fraktion aus der Gegenstrom-Elutriation wurde das MACS Basophil Isolationskit (Firma Miltenyi) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die vorher abzentrifugierten Zellen (10 min; 4 °C; 1800 rpm) wurden dafür mit einem Gemisch aus monoklonalen Hapten-gekoppelten Antikörpern gegen Epitope von verunreinigenden Zellen (B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen, Plättchen, Neutrophile, Eosinophile

und T-Zellen) versetzt und für 10 min bei 8 °C inkubiert. Durch Inkubation mit einem Zweitantikörper (15 min; 8 °C), der gegen das Hapten gerichtet ist und an den magnetische Beads gekoppelt sind, wurden die Nicht-Basophilen markiert. Das Zellgemisch wurde über eine Säule mit magnetisierter Matrix gegeben, die die markierten Zellen im Magnetfeld festhält, während die unmarkierten Basophilen im Durchlauf zu finden sind. Der Durchlauf wurde über Zentrifugation (10 min; 4 °C, 1800 rpm) eingeengt, in 500 µl kaltem HBSS-Puffer aufgenommen und erneut die Zellzahl und Basophilenreinheit (s. 3.11.3) bestimmt. Die Zellen wurden bis zur Stimulation auf Eis aufbewahrt.

3.12 Stimulation der Basophilen zur IL-4-Freisetzung

Für die Stimulation von Basophilen zur IL-4-Freisetzung wurden diese nach der Aufreinigung in einer Endkonzentration von 50.000 Basophilen/ml in Medium mit HEK-IPSE versetzt in einem Endvolumen von 100 µl. Von HEK-IPSE wurden 1:5 Verdünnungsreihen angefertigt, wobei die Anfangskonzentration bei 2500 ng/ml lag. Die Verdünnungsreihen wurden in Medium mit Zusatz von IL-3 angefertigt. Es ist bekannt, dass die Zugabe von IL-3, einem Wachstums- und Differenzierungsfaktor von Basophilen, die IgE-vermittelte IL-4-Freisetzung der Zellen zusätzlich stimuliert (Brunner et al. 1993), somit wurde zu allen Stimulationsansätzen IL-3 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml zugegeben. Von der jeweiligen Verdünnung wurden dann 50 µl in eine sterile Rundbodenplatte (Firma Nunc) gegeben und jeweils mit 2500 Basophilen in 50 µl Medium versetzt, so dass pro Well ein Endvolumen von 100 µl vorhanden ist. Es wurden immer Doppelbestimmungen angefertigt. Als Kontrollen wurden bei jedem Ansatz folgende Stimulantien mitgeführt:

Medium mit IL-3 (Negativkontrolle):	2,5 ng/ml
Ionomycin (IgE unabhängige Kontrolle):	2 µM
anti-IgE (Positvkontrolle):	50 ng/ml

Die Platten wurden nach Anfertigung der Stimulationsansätze bei 37 °C und 6 % CO_2-Gehalt in einem befeuchteten Brutschrank über Nacht inkubiert.

Medium zur Stimulation der Basophilen

Protectomed basal Iscoves Medium (IMDM 1x) versetzt mit

50 µg/ml	Transferrin
5 µg/ml	Insulin
100 U/ml	Penicillin G
100 µg/ml	Streptomycin-Sulfat

3.13 IL-4 ELISA

Die IL-4- Konzentration im Überstand der Basophilenansätze (s. 3.12) wurde mit Hilfe des Sandwich-ELISAs IL-4 Elipair (Firma Diaclone) bestimmt. Leichte Abweichungen vom Herstellerprotokoll wurden zur optimalen Ausnutzung des Kits etabliert. Zur Beschichtung der 96-Loch Maxisorp-Platte (Firma Nunc) wurde der im Kit enthaltene anti-human IL-4-Antikörper 1:1000 in PBS pH 7,4 verdünnt und die Platte über Nacht bei 8 °C in einer feuchten Metallkammer inkubiert. Anschließend wurden verbleibende Bindungsstellen für 2 h mit 5 % (w/v) BSA in PBS pH 7,4 blockiert und die Platte 24 h getrocknet. Die Platte wurde dann mit den Proben aus der Basophilenstimulation bzw. mit dem in Medium verdünntem Standard beschichtet und 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte nacheinander mit folgenden Reagenzien inkubiert: 60 min mit biotinyliertem Detektionsantikörper (1:100 in PBS + 1 % (w/v) BSA verdünnt; 60µl/well), 60 min mit Streptavidin-HRP (1:1800 in PBS + 1 % (w/v) BSA verdünnt; 60 µl/well), 2 h TMB (Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig; 100 µl/well). Alle Inkubationen wurden auf einem Schüttler in einer feuchten Metallkammer durchgeführt. Nach jeder Inkubation wurde die Platte mit PBS pH 7,4 + 0,05 % (v/v) Tween gewaschen. Zum Abschluss wurde die Enzymreaktion mit 1 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA Reader gemessen.

4 Ergebnisse

In der Einleitung wurde erwähnt, dass IPSE identisch mit dem Molekül alpha-1 ist und daher IPSE/alpha-1 genannt wird. Im Folgenden dieser Arbeit wird zur Vereinfachung IPSE/alpha-1 stets nur „IPSE“ genannt. Dies bezieht sich sowohl auf das natürliche IPSE als auch auf die rekombinanten Moleküle *E. coli*-IPSE und HEK-IPSE.

4.1 Untersuchung der Bindungsstärke von *E. coli*-IPSE an IgG, IgG-Fab und IgG-Fc im Dot Blot

Schon früher wurde herausgefunden, dass die IL-4-Freisetzung aus Basophilen durch IPSE IgE-vermittelt ist (Haisch et al., 2001; Schramm et al., 2003). Neben der Bindung an IgE konnte Silke Blindow (2004) in ihrer Arbeit zeigen, dass *E. coli*-IPSE auch an IgG, IgA und IgM bindet, wenn auch mit geringerer Affinität. Ebenfalls konnte mit HEK-IPSE die Bindung an IgE und IgG bestätigt werden (Wodrich, 2006). Zusätzlich zeigten Ergebnisse aus Western Blot- und Biacore-Experimenten von Silke Blindow, dass *E. coli*-IPSE neben dem Gesamtmolekül auch an IgG-Fragmente (IgG-F(ab)$_2$, IgG-Fab und IgG-Fc) bindet. Über die Bindungsstärke von IPSE an IgG und seine Fragmente konnte aber keine Aussage getroffen werden. Deshalb wurde die Bindungsintensität von *E. coli*-IPSE vergleichend an IgG, IgG-Fab und IgG-Fc mittels eines Dot Blots weiter untersucht. Hierfür wurden IgG, IgG-Fab und IgG-Fc in einer Konzentrationsreihe (330 - 0,1 pmol/Dot) auf eine Nitrozellulosemembran gebracht und nach Blockierung der Membran mit *E. coli*-IPSE (50 pmol/ml) inkubiert. Die Bindung wurde dann durch monoklonalen anti-IPSE-Antikörper (Klon 74-4B7, 1:50) und über einen AP-konjugierten anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen, ist eine Bindung von *E. coli*-IPSE sowohl an das Gesamtmolekül IgG als auch an dessen Fragmente IgG-Fab und IgG-Fc sichtbar. Die Bindung an das Gesamtmolekül IgG zeigt hierbei das stärkste Signal. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Bindung an IgG-Fab ein stärkeres Signal ergibt als die Bindung an IgG-Fc, was auf eine stärkere Bindung hinweist.

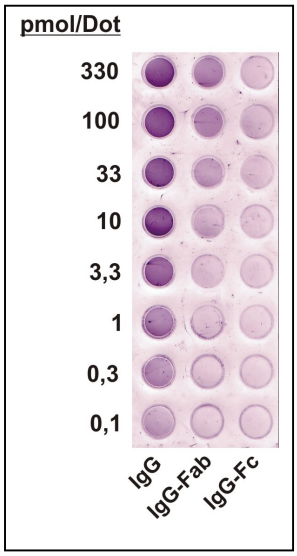


Abbildung 4.1: Vergleich der Bindungsintensität von *E. coli*-IPSE an IgG, IgG-Fab und IgG-Fc im Dot Blot. IgG, IgG-Fab und IgG-Fc wurden in einer Konzentrationsreihe (pmol/Dot) auf Nitrozellulosemembran gedottet und mit *E. coli*-IPSE (50 pmol/ml) inkubiert. Die Bindung wurde mit monoklonalem anti-IPSE-Antikörper als Primärantikörper und AP-anti-Maus-Antikörper als Sekundärantikörper nachgewiesen.

4.2 Quervernetzung von IgG durch IPSE im Sandwich-Blot

Erste Biacore-Untersuchungen von Silke Blindow (2004) zeigen, dass mindestens zwei Moleküle IPSE an ein Molekül Immunglobulin binden können. Dieser Befund sollte mit Hilfe von Sandwich-Blot-Experimenten weiter untersucht werden und gezeigt werden, dass ein Molekül IPSE an zwei Moleküle Immunglobulin in einer Art Quervernetzung binden kann. Diese Frage wurde am Beispiel von IgG untersucht, da dieses Immunglobulin leichter verfügbar ist und IPSE, wie unter 4.1 gezeigt, an IgG bindet.

4.2.1 Quervernetzung von E. coli-IPSE durch IgG

Für die Untersuchung der Quervernetzung von *E. coli*-IPSE durch IgG wurde *E. coli*-IPSE in einer Konzentrationsreihe (330 – 0,1 pmol/Dot) auf die Membran gedottet und die Streifen dann in einer 8-Kanalschale entweder mit IgG in unterschiedlichen Konzentrationen (62,5 pmol/ml, 125 pmol/ml, 250 pmol/ml und 500 pmol/ml) oder mit TBST als Negativkontrolle oder mit anti-IPSE-Antiserum (942Y; 1:1000) als Positivkontrolle inkubiert. Im zweiten Schritt wurde dann wieder mit biotinyliertem *E. coli*-IPSE inkubiert (50 pmol/ml) und die Bindung über SAVAP (1:15000) nachgewiesen (s. Abbildung 4.2). Ein zusätzlicher Streifen,

der im ersten Schritt mit IgG (62,5 pmol/ml) inkubiert wurde, wurde anschließend im zweiten Schritt mit AP-anti human IgG (Fc)-Antikörper inkubiert, um die Bindung von IgG an *E. coli*-IPSE nachzuweisen. Auf diesem Streifen (Nr. 1) in der Abbildung 4.2 ist deutlich zu erkennen, dass das IgG an das *E. coli*-IPSE auf der Membran gebunden hat. Die Quervernetzung durch das IPSE-Antiserum konnte auch hier wieder sichtbar gemacht werden, es ist eine starke Anfärbung der Dots zu erkennen. Zusätzlich zeigte sich diesmal aber auch deutlich eine Bindung durch IgG und zwar in allen vier gewählten Konzentrationen. Allerdings ist aber auch wieder sehr deutlich die Anfärbung in der Negativkontrolle, mit TBST-Puffer in der Mitte, zu erkennen. Sie ist ebenso stark wie die Färbung, die durch die Quervernetzung durch IgG oder das IPSE-Antiserum hervorgerufen wird.

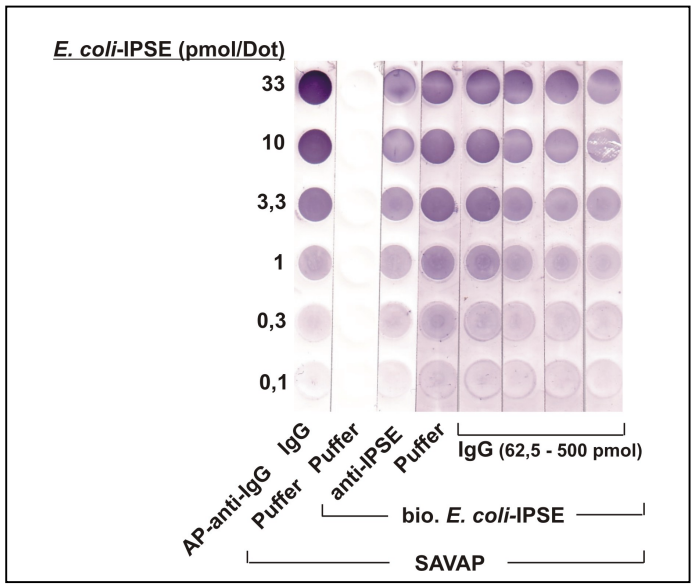


Abbildung 4.2: Quervernetzung von *E. coli*-IPSE durch IgG im Sandwich-Blot. *E. coli*-IPSE wurde in einer Konzentrationsreihe (pmol/Dot) auf die Nitrozellulosemembran gedottet. Erster Inkubationsschritt: IgG (62,5 pmol/ml; 125 pmol/ml; 250 pmol/ml; 500 pmol/ml), anti-IPSE-Antiserum (anti-IPSE) als Positivkontrolle oder TBST-Puffer als Negativkontrolle bzw. SAVAP-Kontrolle. Zweiter Inkubationsschritt: biotinyliertes *E. coli*-IPSE (50 pmo/ml); TBST-Puffer (SAVAP-Kontrolle). Die Bindung wurde über SAVAP nachgewiesen. Erster Streifen zeigt den Bindungsnachweis von IgG (62,5 pmol/ml) mit AP-anti human IgG (Fc)-Antikörper (AP-anti-IgG).

4.2.2 Quervernetzung von HEK-IPSE durch IgG

Da bei dem Versuch der Quervernetzung von *E. coli*-IPSE durch IgG die Negativkontrollen mit TBST-Puffer durchweg ein positives Signal im Sinne einer Autoaggregation zeigten (s. 4.2.1), wurde dieser Versuch mit HEK-IPSE wiederholt (s. Abbildung 4.3). Dies erfolgte speziell im Hinblick auf die Frage, ob HEK-IPSE als glykosyliertes Molekül im Gegensatz zum nicht-glykosylierten *E. coli*-IPSE eine geringere oder fehlende Tendenz zur Autoaggregation aufweist. Bei dieser Untersuchung wurde das biotinylierte HEK-IPSE in geringerer Konzentration (7 pmol/ml) als das biotinylierte *E. coli*-IPSE eingesetzt, um eine mögliche Eigenbindung, die schon mit *E.* coli-IPSE gezeigt wurde, zu verringern. Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen, kann auch hier deutlich eine Quervernetzung von HEK-IPSE durch das IPSE-Antiserum gezeigt werden. Ebenso ist auch wieder eine Bindung durch IgG sichtbar, wenn auch diesmal etwas schwächer als mit *E. coli*-IPSE zu sehen war (s. Abbildung 4.2), was am ehesten durch die geringere Menge des eingesetzten biotinyliertem HEK-IPSE zu erklären ist. Aber auch in diesem Versuch trat wieder das Problem der positiven Negativkontrolle auf, in der Intensität vergleichbar der Quervernetzung durch IgG.

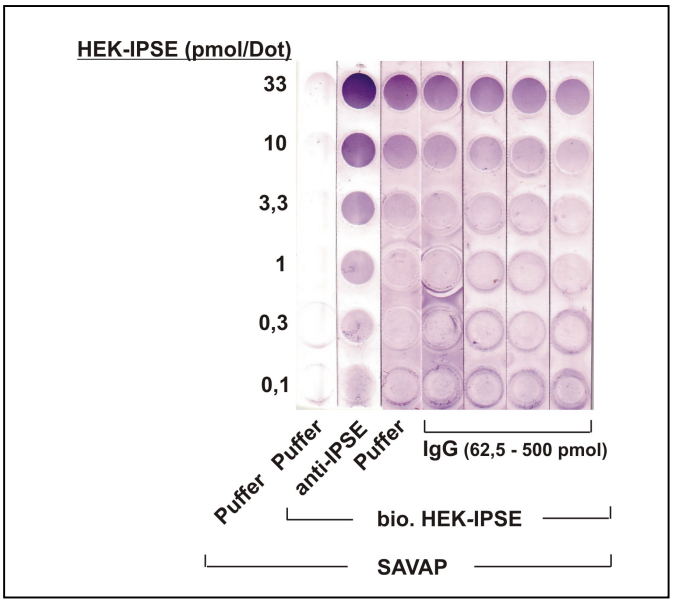


Abbildung 4.3: Quervernetzung von HEK-IPSE durch IgG im Sandwich-Blot. HEK-IPSE wurde in einer Konzentrationsreihe (pmol/Dot) auf die Nitrozellulosemembran gedottet. Erster Inkubationsschritt: IgG (62,5 pmol/ml; 125 pmol/ml; 250 pmol/ml; 500 pmol/ml), anti-IPSE-Antiserum (anti-IPSE) als Positivkontrolle oder TBST-Puffer als Negativkontrolle bzw. SAVAP-Kontrolle. Zweiter Inkubationsschritt: biotinyliertes HEK-IPSE (7 pmol/ml) oder TBST-Puffer (SAVAP-Kontrolle). Die Bindung wurde über SAVAP nachgewiesen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die rekombinanten IPSE-Moleküle die Eigenschaft im Sandwich-Blot besitzen an sich selber zu binden. Eine Quervernetzung von IgG durch IPSE konnte mit diesem Verfahren nicht gezeigt werden.

4.3 Quervernetzung von IgG-Fab durch *E. coli*-IPSE im Sandwich-Blot

Wie bereits gezeigt, bindet *E. coli*-IPSE an IgG und dessen Fragmente IgG-Fab und IgG-Fc (s. 4.1 und Blindow, 2004). Frühere Versuche (Blindow, 2004; Schramm, unveröffenlicht) zeigen, dass IPSE offenbar nicht in der Lage ist, komplette Moleküle von IgE bzw. IgG querzuvernetzen. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob ein Molekül IPSE an zwei Moleküle IgG-Fab binden kann. Dafür wurde wieder das Verfahren des Sandwich-Blots angewendet. Hierfür wurde IgG-Fab in einer Konzentrationsreihe (33 – 0,1 pmol/Dot) auf eine Nitrozellulosemembran gedottet. Die Membranstreifen mit dem darauf enthaltenen IgG-Fab wurden im ersten Schritt entweder mit *E. coli*-IPSE (50 pmol/ml; 500 pmol/ml) inkubiert oder mit anti-human Ig (κ) (1:1000) und Protein L (50 pmol/ml), ein B-Zellsuperantigen, als Positivkontrollen und TBST als Negativkontrolle. Im zweiten Schritt wurde dann mit biotinyliertem IgG-Fab (50 pmol/ml) inkubiert und die Bindung über SAVAP (1:15000) nachgewiesen. Ein zusätzlicher Streifen, der im ersten Schritt mit *E. coli*-IPSE (50 pmol/ml) inkubiert wurde, wurde im zweiten Schritt mit anti-IPSE-Antiserum (942Y) inkubiert und die Bindung über AP-anti-Kaninchen IgG (1:10000) nachgewiesen. In Abbildung 4.4 ist deutlich die Bindung von *E. coli*-IPSE an IgG-Fab zusehen (1. Streifen), wenn IgG-Fab vorher auf die Membran gedottet wurde. Ebenso kann eine Quervernetzung von IgG-Fab durch seinen Antikörper und Protein L gezeigt werden, die Dots sind sichtbar angefärbt, wenn auch schwächer mit Protein L. Eine Quervernetzung durch *E. coli*-IPSE ist dagegen nicht sichtbar. Hier ist nur eine sehr schwache Anfärbung zu erkennen, die nicht über den Hintergrund (Negativkontrolle mit TBST-Puffer in der Mitte) hinausgeht. Der letzte Streifen mit 500 pmol *E.coli*-IPSE zeigt zudem eine hohe Hintergrundfärbung auf der Membran zwischen den Dots, was durch die hohe Konzentration des eingesetzten *E.coli*-IPSE zu erklären ist. Die Negativkontrolle zeigt deutlich ein negatives Signal (keine Anfärbung der Dots).

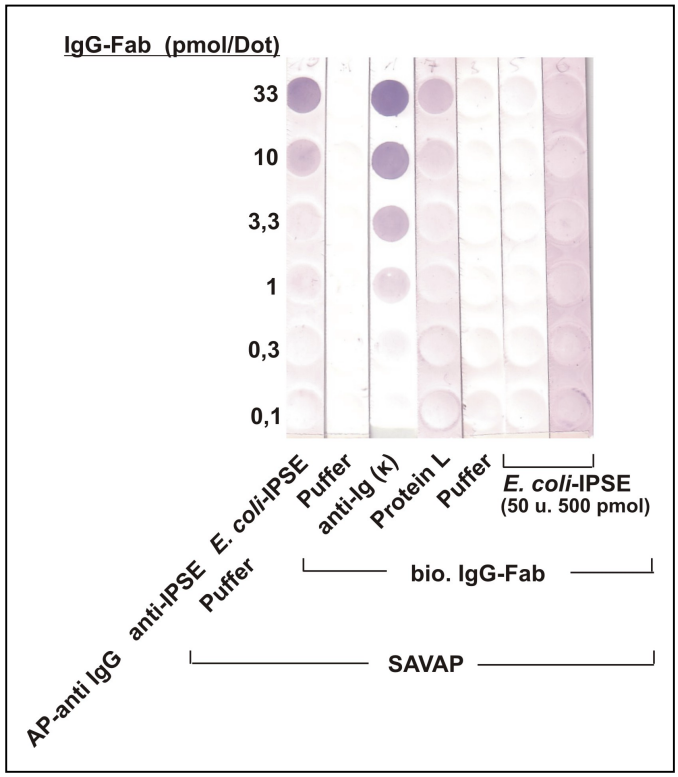


Abbildung 4.4: IgG-Fab wurde in einer Konzentrationsreihe (pmol/Dot) auf die Nitrozellulosemembran gedottet. Erster Inkubationsschritt: *E. coli*-IPSE (50 pmol/ml; 500 pmol/ml), anti-human Ig (κ) und Protein L (50 pmol/ml) als Positivkontrollen als oder TBST-Puffer als Negativkontrolle bzw. SAVAP-Kontrolle. Zweiter Inkubationsschritt: biotinyliertes IgG-Fab (50 pmol/ml) oder TBST-Puffer (SAVAP-Kontrolle). Die Bindung wurde über SAVAP nachgewiesen. Erster Streifen zeigt den Bindungsnachweis von *E. coli*-IPSE (50pmol/ml) an IgG-Fab mit anti-IPSE-Antiserum (anti-IPSE) und AP-anti human IgG (Fc)-Antikörper (AP-anti-IgG).

In diesem Sandwich-Blot ist keine Eigenbindung von IgG-Fab in der Negativkontrolle zu erkennen, im Gegensatz zu dem Sandwich-Blot mit IPSE (s. 4.2). Ebenso konnte aber auch keine Quervernetzung von IgG-Fab durch *E. coli*-IPSE gezeigt werden, während durch Protein L oder anti-human Ig (κ) deutlich eine Quervernetzung zu erkennen ist.

4.4 Chemische Quervernetzung

4.4.1 Bindungsuntersuchung von IgG und *E. coli*-IPSE

Nachdem die Fragestellung, ob IPSE zwei Moleküle IgG binden kann aufgrund der Eigenbindung von IPSE im Sandwich-Blot nicht gezeigt werden konnte (s. 4.2), sollte in diesem Versuch die Bindung von IgG und *E. coli*-IPSE durch chemische Quervernetzung mit

anschließender Analyse in einem Tris-Acetat-Gel untersucht werden. Mit dieser Methode ist es gleichzeitig möglich größere Komplexe von IgG und IPSE sichtbar zu machen, um damit auf die Fragestellung hinsichtlich der .Quervernetzung von IPSE und Immunglobulin weitere Aussagen treffen zu können.

Als chemische Reagenzien wurden EDC und Sulfo-NHS eingesetzt (s. 3.8). IgG und *E. coli*-IPSE wurden in einem 1:1, 1:2 und 1:3-Verhältnis in dem Aktivierungspuffer miteinander vermischt und inkubiert (25 min). Danach wurden EDC und Sulfo-NHS zugegeben und nach 2 min und 15 min Aliquots abgenommen und die Reaktion abgestoppt. IgG und *E. coli*-IPSE wurden zusätzlich jeweils alleine mit den Reagenzien versetzt, um mögliche Eigenbindungen auszuschließen. Die Proben wurden zur Untersuchung auf ein Tris-Acetat-Gel aufgetragen mit anschließender Silberfärbung (s. 3.8). Abbildung 4.5 A zeigt IgG und *E. coli*-IPSE getrennt nebeneinander aufgetragen.

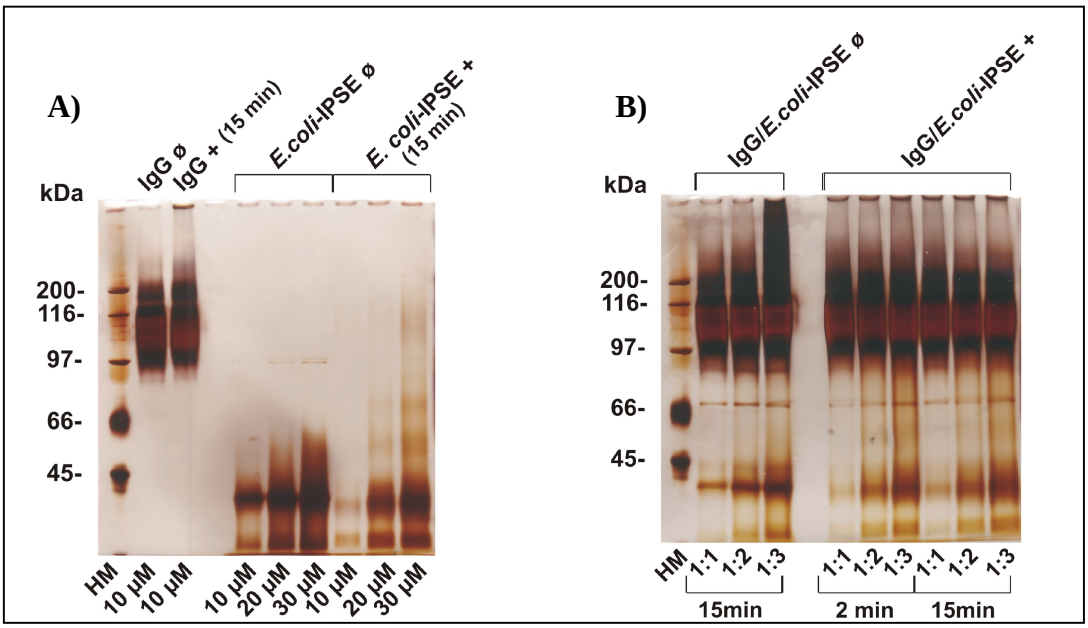


Abbildung 4.5: Silbergefärbte Tris-Acetat Gele zur Untersuchung der chemischen Quervernetzung von IgG und *E. coli*-IPSE. A) IgG und *E. coli*-IPSE mit und ohne Zusatz von EDC und Sulfo-NHS. **B)** IgG und *E. coli*-IPSE wurden zusammen gemischt (1:1; 1:2; 1:3), mit und ohne Zusatz von EDC und Sulfo-NHS. Ø: ohne Zusatz (Kontrolle); +: mit Zusatz; HM: High Marker

Beide Moleküle wurden entweder mit EDC und Sulfo-NHS versetzt (15 min) oder im natürlichen Zustand beibehalten. Die eingesetzte IgG-Präparation bandet über einen relativ

weiten Bereich. Es ist kein großer Unterschied zwischen IgG ohne und mit Zusatz zu erkennen. Am Boden der Auftragstasche von IgG, das mit den Reagenzien versetzt wurde, findet sich vermutlich als Ausdruck von IgG-Komplexen eine zusätzliche Bande. Die Banden des *E. coli*-IPSE-Dimers (32 kDa) (ohne Zusatz) sind gut zu erkennen. Zusätzlich zeigt sich auch eine Bande im niedrigeren Molekularbereich, was höchstwahrscheinlich monomeres *E. coli*-IPSE (16 kDa) darstellt. Daneben ist aber bei 20µM und 30 µM (*E. coli*-IPSE ohne Zusatz) deutlich eine Bande bei ungefähr 97 kDa zu erkennen. Diese entstand vermutlich durch Verunreinigungen der Probe. Wird *E. coli*-IPSE mit den Reagenzien versetzt, zeigt sich eine Abschwächung der Anfärbung der *E. coli*-IPSE-Banden, besonders deutlich bei 10 µM *E. coli*-IPSE zu erkennen. Zusätzlich treten weitere Banden im Bereich von ca. 60 kDa und 70 kDa bei der eingesetzten Menge von 20 µM und 30 µM auf, und noch eine weitere Bande verschwommen in der Höhe von IgG (also ca. 150 kDa) ebenfalls bei 30 µM. Diese Banden lassen auf Aggregationen von *E. coli*-IPSE-Molekülen schließen, die auf Grund der chemischen Quervernetzung nicht wieder durch SDS gelöst wurden. In Abbildung 4.5 B sind die IgG / *E. coli*-IPSE-Gemische (1:1; 1:2; 1:3) mit und ohne Zusatz von EDC und Sulfo-NHS aufgetragen. Trotz Zusatz der Reagenzien sind IgG und *E. coli*-IPSE noch deutlich getrennt von einander zu sehen. Es ist auch kein Unterschied zwischen der Inkubation von 2 min und 15 min zu erkennen. Die Banden von *E. coli*-IPSE scheinen aber schwächer zu sein im Vergleich zu der Bandenstärke ohne Zusatz der Reagenzien. Es könnte auf eine Bindung an IgG hindeuten. Aber es treten keine weiteren Banden auf, die auf Komplexe zwischen den beiden Molekülen schließen lassen. Wie bereits bei IgG mit Zusatz der quervernetzenden Agenzien, zeigt sich auch hier wieder eine Proteinanfärbung in den Auftragstaschen des Gels bei allen IgG / *E. coli*-IPSE-Verhältnissen. Diese könnten somit von IgG-Komplexen oder von IgG / *E. coli*-IPSE-Komplexen stammen. Die zusätzlichen Banden, die bei *E. coli*-IPSE alleine ohne IgG auftraten (im Bild A), sind unter diesen Umständen nicht zu erkennen. Die schwächere Anfärbung der Banden könnte auch durch eine schlechtere Anfärbbarkeit der Proteine, durch Zusatz der chemischen Reagenzien, herrühren. Es ist aber auffällig, dass nur die Banden von *E. coli*-IPSE eine schwächere Färbung zeigen.

Zusammenfassend ist nach Zusatz der chemischen Crosslinker zwar eine mäßige Aggregation von *E. coli*-IPSE alleine bzw. IgG alleine zu beobachten, nicht jedoch eine eindeutige Komplexbildung zwischen beiden Molekülen.

4.4.2 Chemische Quervernetzung von HEK-IPSE

Nachdem *E. coli*-IPSE ohne IgG nach Zusatz von EDC und Sulfo-NHS zusätzliche Banden im höheren Molekularbereich zeigte, die auf aggregiertes *E. coli*-IPSE hinweisen (s. Abbildung 4.5 A), stellte sich die Frage, ob der gleiche Effekt auch bei HEK-IPSE zu beobachten ist. Hierfür wurde HEK-IPSE in Aktivierungspuffer auf eine Konzentration von 6 µM verdünnt und mit den chemischen Reagenzien versetzt (s. 3.8).

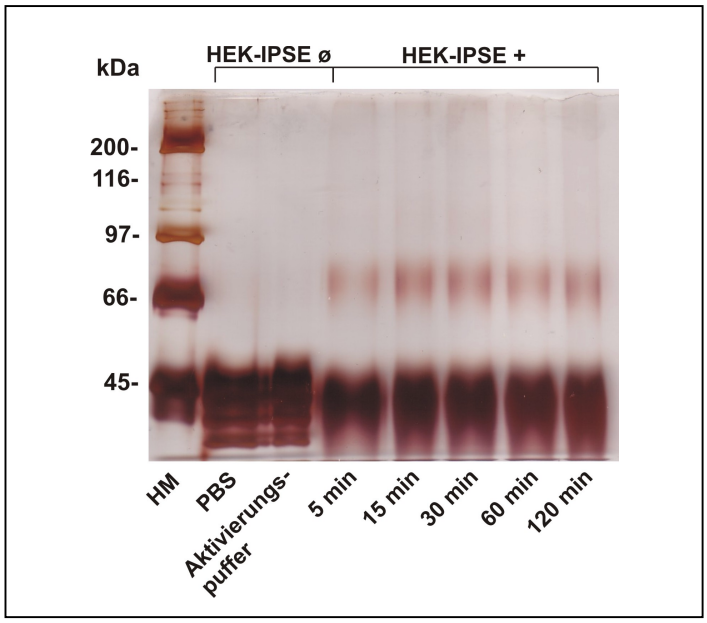


Abbildung 4.6: Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung der chemischen Quervernetzung von HEK-IPSE. HEK-IPSE wurde mit EDC und Sulfo-NHS versetzt und für 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min inkubiert. Ø: ohne Zusatz der Reagenzien (Kontrolle); +: mit Zusatz der Reagenzien; HM: High Marker

Nach 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min wurde die Reaktion gestoppt und die Proben in einem SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung untersucht (s. Abbildung 4.6). Die Kontrollen mit PBS-Puffer und Aktivierungspuffer zeigen die Banden des glykosylierten HEK-IPSE im Bereich von 45 kDa. Es macht keinen Unterschied, ob HEK-IPSE in PBS-Puffer oder in dem Aktivierungspuffer verdünnt wird. Nach der Inkubation mit EDC und Sulfo-NHS zeigt sich deutlich eine zusätzliche Bande knapp über 66 kDa, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von komplexiertem HEK-IPSE stammt. Die Inkubationszeit ist hier nicht von Bedeutung. Es gibt keinen Unterschied in der Bandenbildung. Es ist weiterhin noch

auffällig, das sich die Bandenform von HEK-IPSE nach Zugabe der chemischen Reagenzien verändert hat. Statt vier einzelne Banden, zeigt sich nun eher eine stark verschmierte Bande.

4.5 Untersuchung der Komplexbildung von Immunglobulin (IgG, IgE) und HEK-IPSE in Lösung mittels Größenausschlusschromatographie

Wie schon vorher erwähnt konnte bisher eine Quervernetzung von Immunglobulin und IPSE nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie sollte die mögliche Bildung von großen Komplexen zwischen IgG oder IgE und HEK-IPSE in Lösung untersucht werden. Hierfür wurden die Immunglobuline mit HEK-IPSE in einem bestimmten Verhältnis miteinander in Lösung vermischt und nachträglich über eine Tricorn-Säule (Superdex 200) gegeben. Es wurde in diesem Versuch nur HEK-IPSE verwendet, da *E. coli*-IPSE an der Matrix der Superdex-Säulen (Superdex 200 und 75) unspezifisch bindet.

4.5.1 Untersuchung der Komplexbildung von IgG und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200 10/300 GL

IgG und HEK-IPSE wurde in einem 1:1-Verhältnis miteinander vermischt und das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch über die Superdex 200 10/300 GL aufgetrennt (s. 3.9.1.1). Abbildung 4.7 B zeigt die Proteinprofile beider Moleküle aus separaten Läufen nebeneinander aufgetragen. IgG, welches mit ca. 150 kDa das größere Molekül ist, läuft schneller durch die Säule (blaue Kurve). Neben dem IgG-Hauptpeak (ca. Fraktionen B7 – B11) sind davor noch zwei kleine Peaks in Fraktion A15, B1 und B4, B5 zu erkennen, was auf aggregierte IgG-Komplexe hindeutet. Das kleinere HEK-IPSE mit 34 – 39 kDa läuft langsamer durch die Säule (grüne Kurve). Bild C in Abbildung 4.7 zeigt die Auftrennung der Einzelmoleküle (blaue und grüne Kurve) zusammen mit der Auftrennung des IgG / HEK-IPSE-Gemisches im 1:1-Verhältnis (rote Kurve). Es ist zu erkennen, dass HEK-IPSE und IgG aus dem Gemisch an derselben Position wieder von der Säule kommen, wie die vorher einzeln aufgetrennten Moleküle. Es haben sich somit keine stabilen Komplexe von IgG und HEK-IPSE gebildet.

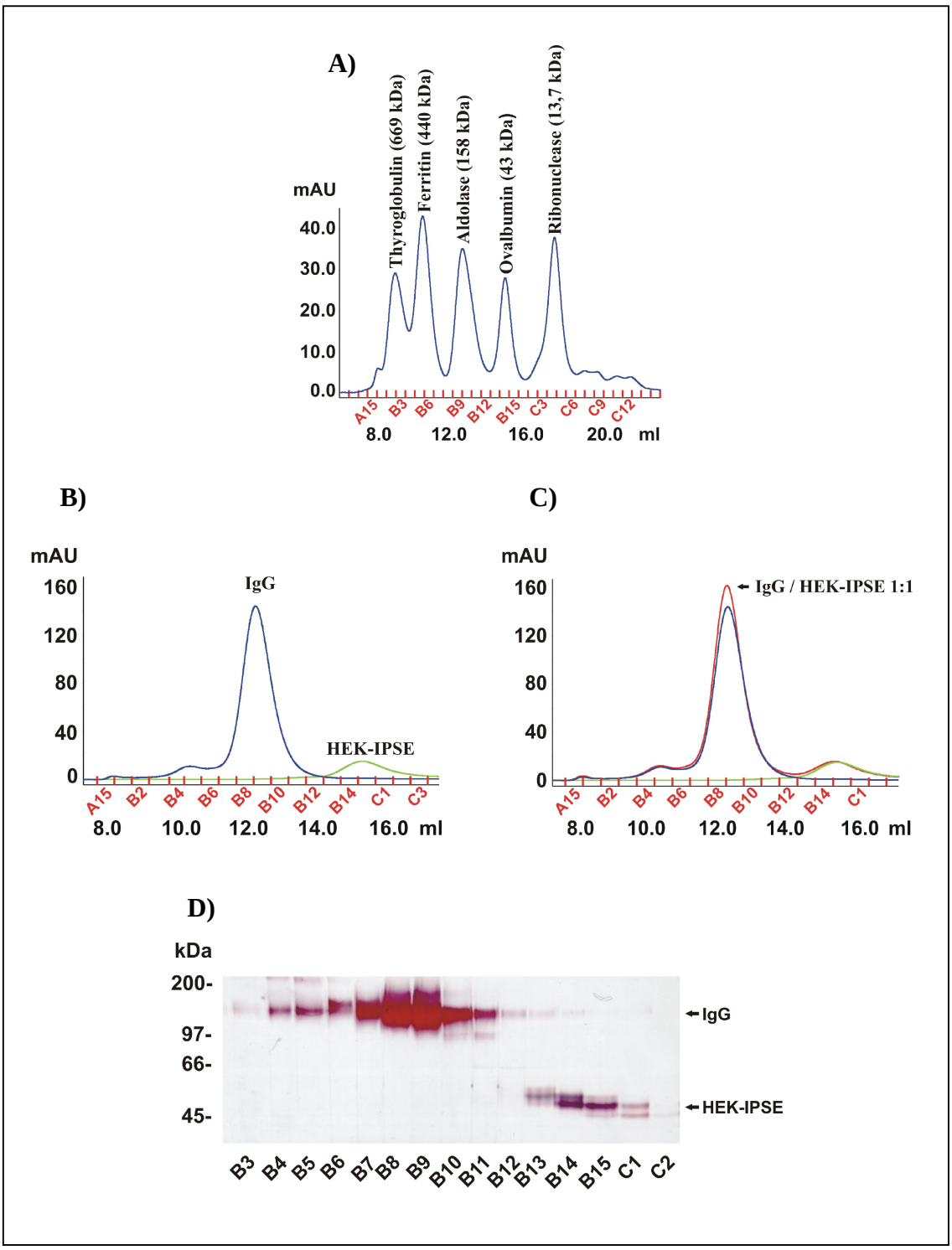


Abbildung 4.7: Untersuchung der Komplexbildung von IgG und HEK-IPSE (1:1) in Lösung mittels Superdex 200. IgG und HEK-IPSE wurden in Lösung 1:1 miteinander vermischt und nachträglich über eine Superdex 200-Säule aufgetrennt. **A)** Markerlauf . **B)** Proteinprofil von IgG (blaue Kurve) und HEK-IPSE (grüne Kurve), einzeln aufgetrennt. **C)** Proteinprofil von IgG (blau) und HEK-IPSE (grün) im Vergleich zu dem Proteinprofil von dem IgG / HEK-IPSE 1:1-Gemisch (rote Kurve). **D)** Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen von dem Proteinprofil des IgG / HEK-IPSE 1:1-Gemisches. B3 – C2: Fraktionen.

In der Untersuchung der einzelnen Fraktionen in der SDS-PAGE mit nachträglicher Silberfärbung (Bild D) zeigte sich, wie schon nach dem Ergebnis des Säulenlaufes vermutet, das kein HEK-IPSE zusammen mit IgG in den Fraktionen B2 – B11 enthalten ist. Es sind nur die Banden von IgG im oberen Bereich des Trenngeles sichtbar. In den Fraktionen B12 – C2 sind die Banden des glykosylierten HEK-IPSE, das hier ungebunden vorliegt, in ihren unterschiedlichen Größen aufgetrennt zu sehen. Ganz schwach zeigen sich hier auch Banden von IgG. Dies ist vermutlich durch Interaktionen mit der Matrix der Säule zu erklären, wobei wenig IgG erst später, zusammen mit HEK-IPSE, von der Säule gespült wird. Es deutet nicht auf eine Bindung von IgG und HEK-IPSE hin, da die sonst entstandenen größeren Komplexe als erstes von der Säule hätten kommen müssen (s. 3.9).

Da bekannt ist, dass das B-Zell-Superantigen Protein L mit hoher Affinität an alle humanen Immunglobulinklassen bindet und dieses Molekül auch erfolgreich in Gelpräzipiationsversuchen in der Arbeit von Silke Blindow (2004) und Maren Wodrich (2006) als Positivkontrollen mit IgG eingesetzt wurde, wurde hier zusätzlich die Bindung von Protein L und IgG in Lösung als Kontrollversuch untersucht, um mögliche Bildungen von großen Komplexen vergleichen zu können. Protein L besitzt eine ähnliche molekulare Größe (38,5 kDa) wie HEK-IPSE (34 – 39 kDa). IgG und Protein L wurden in einem 1:1-Verhältnis miteinander vermischt und 30 min inkubiert. Während der Inkubation traten nach kurzer Zeit Präzipitate von großen Komplexen auf, die vor dem Auftragen der Säule abzentrifugiert wurden. Solche Präzipitate waren mit IgG und HEK-IPSE nicht sichtbar. In Abbildung 4.8 B) sind die Proteinprofile von IgG (blaue Kurve) und Protein L (braune Kurve) getrennt nebeneinander aufgezeichnet und zusätzlich das Proteinprofil von der Auftrennung des Gemisches (rote Kurve). Im Gegensatz zu IgG und HEK-IPSE ist eine Bindung von IgG und Protein L erkennbar. Der IgG-Peak ist kleiner geworden, von ca. 140 mAUs auf ca. 70 mAUs, und ein Anstieg der Peaks im Bereich der aggregierten IgG-Moleküle (Fraktionen B2 – B8) ist zu sehen. Die Bildung von größeren Komplexen ist hier nicht sichtbar, da diese vorher präzipitierten und abzentrifugiert wurden. Das Silbergel zur Untersuchung der Fraktionen von der Auftrennung des IgG / Protein L-Gemisches (Bild B) zeigt Banden von Protein L zusammen mit Banden von IgG in den Fraktionen B2 – B10, was eine Bindung beider Moleküle bestätigt.

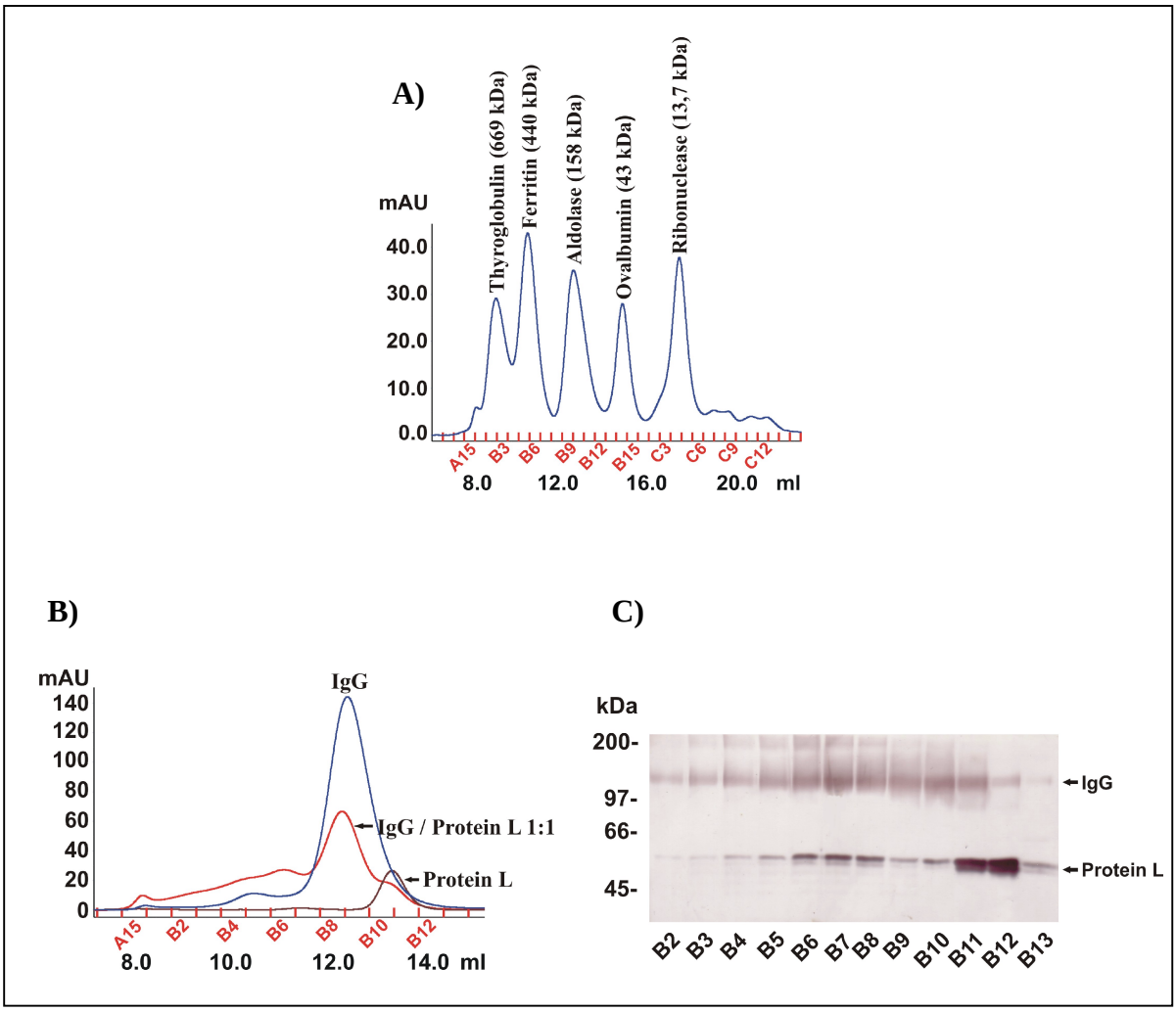


Abbildung 4.8: Untersuchung der Komplexbildung von IgG und Protein L in Lösung mittels Superdex 200. IgG und Protein L wurden in Lösung 1:1 miteinander vermischt und nachträglich über eine Superdex 200-Säule aufgetrennt. **A)** Markerlauf. **B)** Proteinprofile von den Einzelmolekülen IgG (blaue Kurve) und Protein L (braune Kurve) und das Proteinprofil von dem IgG / Protein L-Gemisch (1:1) (rote Kurve). **C)** Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen des IgG / Protein L-Gemisches. B2 – B13: Fraktionen.

Allerdings liegen die Banden von Protein L bei einem höheren Molekularbereich (zwischen 45 und 66 kDa), als das Molekulargewicht von Protein L (38,5 kDa) tatsächlich vorgibt. Dies liegt am unterschiedlichen Laufverhalten von Molekülen in einer SDS-PAGE. In den Fraktionen B11 – B12 sind die Banden von Protein L am stärksten angefärbt. Das Proteinprofil (rote Kurve) zeigt in dem Bereich eine kleine Schulter an dem IgG-Peak, was auf nichtgebundenes Protein L schließen lässt. Da sich in dem Bereich beide Peaks überlagern, sind hier ebenfalls IgG und Protein L zusammen in den Fraktionen zu sehen.

4.5.2 Untersuchung der Komplexbildung von IgE und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200 10/300 GL

IgE und HEK-IPSE wurden in einem 1:1-, 1:4- und 2:1-Verhältnis miteinander vermischt und jeweils für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachträglich wurde das jeweilige Gemisch mit der Superdex 200 10/300 GL aufgetrennt (s. 3.9.1.1). Während der Inkubation sind keine Präzipitate aufgetreten, die auf eine Bildung von großen Komplexen hindeuten könnten. Abbildung 4.9 B zeigt die Auftrennung der Einzelmoleküle im 1:1-Verhältnis nebeneinander aufgetragen. IgE mit ca. 180 kDa kommt wieder als erstes von der Säule (blaue Kurve). Neben dem IgE-Hauptpeak (Fraktion B5 – B8) sind, wie bei IgG, noch zwei kleinere Peaks bei den Fraktionen A15 – B4 zu erkennen, die ebenfalls auf aggregiertes IgE hindeuten. Das kleinere Molekül HEK-IPSE kommt, wie erwartet, später von der Säule (grüne Kurve). Bild C in Abbildung 4.9 zeigt die Auftrennung des IgE / HEK-IPSE-Gemisches im 1:1-Verhältnis (rote Kurve) im Vergleich zu den einzelnen Molekülen. Hier ist nun deutlich eine Bindung zu erkennen, im Gegensatz zu IgG und HEK-IPSE. Der IgE-Hauptpeak wird kleiner, während die Peaks der IgE-Aggregate davor größer und einheitlicher werden. Insgesamt wird der ganze IgE-Peak breiter, die Trennung zwischen den IgE-Aggregaten und dem monomeren IgE geht zum Teil verloren. Gleichzeitig ist eine kleine Linksverschiebung des „Monomer-Peaks“ in einen höheren Molekularbereich zu erkennen. Zusätzlich fällt auf, dass der Peak von HEK-IPSE fast verschwunden ist. Abbildung 4.9 D zeigt zusätzlich das Proteinprofil nach der Auftrennung von IgE und HEK-IPSE im 1:4-Verhältnis (braune Kurve). Die Linksverschiebung des „Monomer-Peaks“ hat zugenommen, was auf eine weitere Bindung von HEK-IPSE an IgE hindeuten könnte. Die Höhe des Peaks hat sich aber nicht wesentlich verändert. Die Peaks der Aggregate sind im Wesentlichen gleich geblieben. Weiterhin ist unter diesen Bedingungen erwartungsgemäß reichlich ungebundenes HEK-IPSE zu sehen Abbildung 4.9E zeigt das Proteinprofil nach der Auftrennung von IgE und HEK-IPSE im 2:1-Verhältnis (graue Kurve) im Vergleich zu den anderen beiden Kurven (1:1 und 1:4). Die Linksverschiebung des „Monomer-Peaks“ von IgE nimmt hier wieder deutlich ab. Gleichzeitig werden die IgE-Aggregate kleiner und der Peak von HEK-IPSE ist verschwunden. Dies und die Verschiebung zurück nach rechts, deuten daraufhin, dass HEK-IPSE gebunden hat, aber noch ungebundenes IgE weiterhin vorliegt.

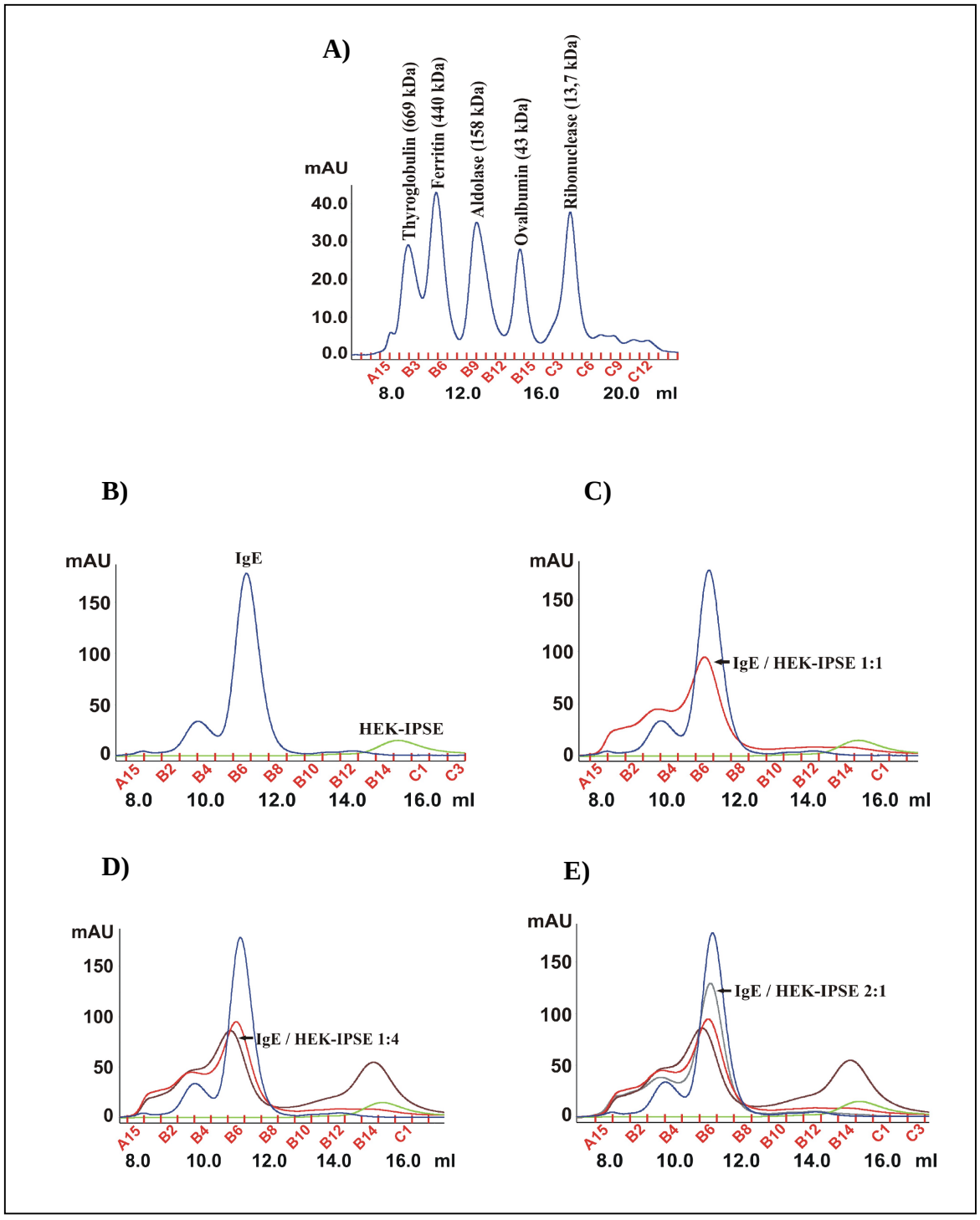


Abbildung 4.9: Untersuchung der Komplexbildung von IgE und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200. IgE und HEK-IPSE wurden im Verhältnis 1:1, 1:4 und 2:1 miteinander inkubiert und anschließend über eine Superdex 200-Säule aufgetrennt. **A)** Markerlauf. **B)** Proteinprofile von IgE (blaue Kurve) und HEK-IPSE (grüne Kurve) einzeln aufgetrennt **C)** Proteinprofil von der Auftrennung des 1:1-Gemisch (rote Kurve) im Vergleich zu den Einzelmolekülen. **D)** Proteinprofil von der Auftrennung des 1:4-Gemisches (braune Kurve) im Vergleich zum 1:1-Gemisch (rote Kurve) und den Einzelmolekülen. **E)** Proteinprofil von der Auftrennung des 2:1-Gemisches (graue Kurve) im Vergleich zum 1:1- und 1:4-Gemisch (rote und braune Kurve) und den Einzelmolekülen

Abbildung 4.10 zeigt die Untersuchung der Fraktionen der einzelnen IgE / HEK-IPSE-Gemische (1:1, 1:4, 2:1) in silbergefärbten SDS-Gelen. Bild A zeigt die Untersuchung des 1:1-Gemisches. Es ist zu erkennen, dass HEK-IPSE zusammen mit IgE in den Fraktionen B1 – B8 enthalten ist (IgE bei ca. 200 kDa und HEK-IPSE bei ca. 45 kDa) und somit eine Bindung, wie schon aus dem Proteinprofil (Abbildung 4.9) vermutet, bestätigt ist. Zusätzlich sind aber auch immer noch Banden von HEK-IPSE in den hinteren Fraktionen (B9 – B14) zu erkennen, was auf einen Rest von nichtgebundenen HEK-IPSE-Molekülen schließen lässt. Weiterhin sieht man aber auch in diesen Fraktionen noch schwach angefärbte Banden von IgE. Dies ist vermutlich wieder durch Interaktionen mit der Säulenmatrix zu erklären, wobei wenig IgE durch unspezifische Bindungen zurückgehalten wird und später zusammen mit HEK-IPSE von der Säule gespült wird. Bild B zeigt die Untersuchung des 1:4-Gemisches. Auch hier ist wieder die Bindung von HEK-IPSE an IgE bestätigt, beide Moleküle sind in den Fraktionen B1 – B8 enthalten. Die kräftigere Bandenfärbung spricht dafür, dass etwas mehr HEK-IPSE an IgE gebunden hat. Besonders in den Fraktionen B4 und B5 ist die Anfärbung am stärksten, was darauf hindeutet, dass in diesem Bereich das meiste HEK-IPSE gebunden hat. Daneben sind in den Fraktionen B11-B15, d.h. im Bereich des HEK-IPSE-Monomers, in Übereinstimmung mit dem Proteinprofil sehr kräftige HEK-IPSE Banden zu sehen. Zusätzlich treten in diesem Bereich auch wieder schwach angefärbte IgE-Banden auf. Bild C zeigt die Untersuchung des 2:1-Gemisches. Hier sind ebenfalls wieder die Banden von HEK-IPSE zusammen mit den IgE-Banden zu sehen, wobei hier die HEK-IPSE-Banden schwächer angefärbt sind, was auf die weniger eingesetzte Menge zurückzuführen ist. Obwohl IgE hier im 2:1-Verhältnis eingesetzt wurde, ist immer noch ungebundenes HEK-IPSE in den hinteren Fraktionen zu erkennen, besonders in Fraktion C2.

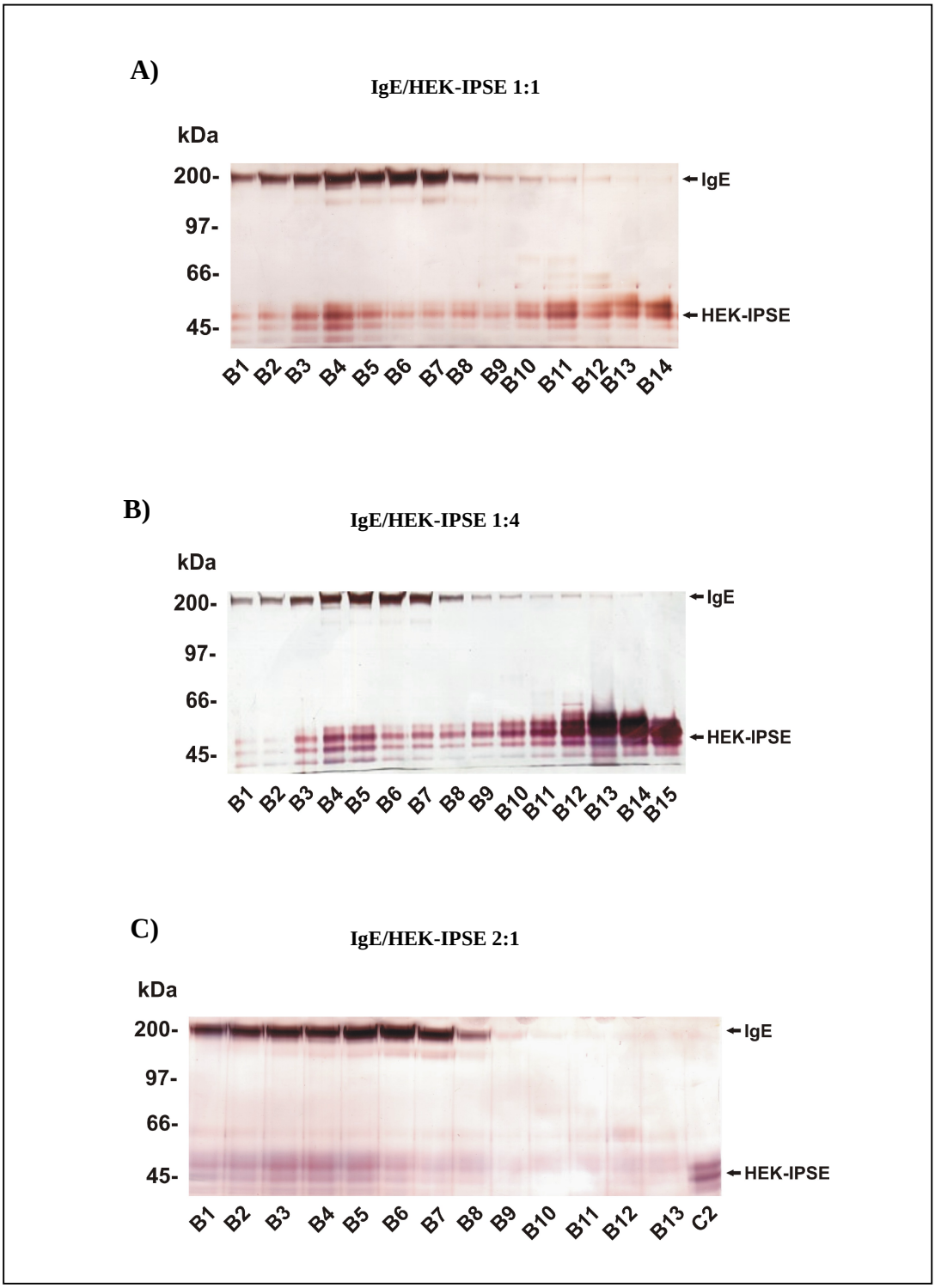


Abbildung 4.10: Silbergefärbte SDS-Gele zur Untersuchung der Fraktionen nach Auftrennung der IgE / HEK-IPSE-Gemische (1:1, 1:4, 2:1) mittels Superdex 200. A) Untersuchung der Fraktionen des 1:1-Gemisches. **B)** Untersuchung der Fraktionen des 1:4-Gemisches. **C)** Untersuchung der Fraktionen des 2:1-Gemisches. B1 – C2: Fraktionen.

Wie schon vorher bei IgG wurde auch bei IgE die Komplexbildung mit Protein L im 1:1-Verhältnis untersucht. Da nur geringe Mengen an IgE zur Verfügung standen, wurden die Untersuchungen mit niedrigen Konzentrationen durchgeführt, sodass keine sichtbaren Präzipitate nachweisbar waren. Das Gemisch wurde nachträglich mit der Superdex 200 PC 3.2/30 aufgetrennt.

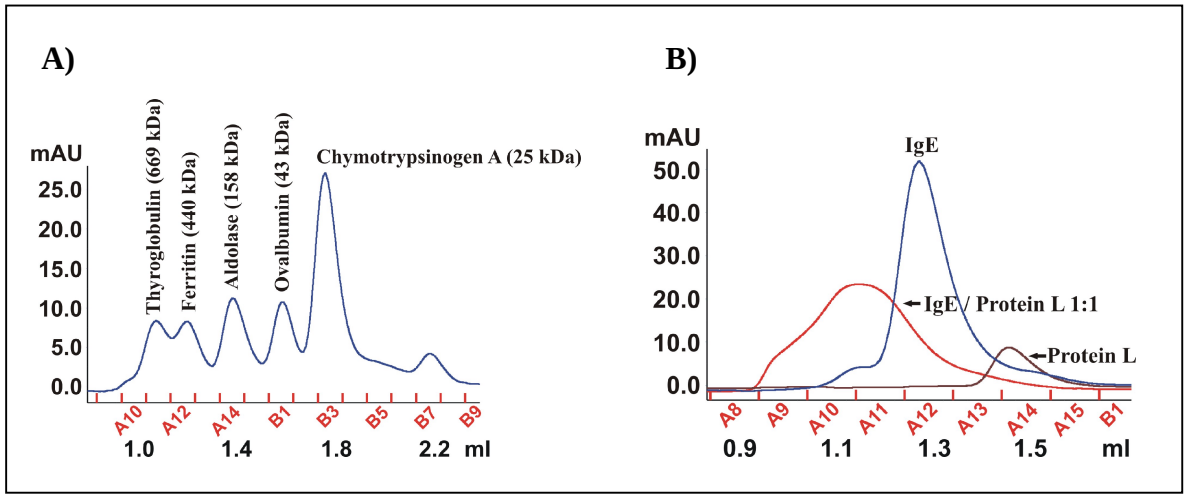


Abbildung 4.11: Untersuchung der Komplexbildung von IgE und Protein L in Lösung mittels Superdex 200. IgE und Protein L wurden in Lösung 1:1 miteinander vermischt und nachträglich über eine Superdex 200-Säule aufgetrennt. **A)** Markerlauf. **B)** Proteinprofile von den Einzelmolekülen IgE (blaue Kurve) und Protein L (braune Kurve) und das Proteinprofil von dem IgE / Protein L-Gemisch (1:1) (rote Kurve).

Auf Grund der kleinen Mengen war es hier nicht möglich die Fraktionen in einem Silbergel zu untersuchen. Abbildung 4.11 B zeigt das Proteinprofil der Einzelmoleküle IgE (blaue Kurve) und Protein L (braune Kurve) im Vergleich zu der Auftrennung des 1:1-Gemisches (rote Kurve). Der Peak von Protein L ist verschwunden und es hat sich stattdessen ein einheitlicher breiter Peak gebildet, was auf eine Bindung von IgE und Protein L hinweist. Zusätzlich hat sich der Peak stark nach links verschoben, was wiederum auf eine Bildung von größeren Komplexen hindeutet. Mit IgE und HEK-IPSE ist diese starke Verschiebung nach links nicht zu sehen. Auch mit IgG und Protein L ist diese starke Linksverschiebung und die Bildung eines einheitlichen Peaks nicht zu sehen gewesen. Es wurden aber hier vor dem Säulenlauf sichtbare Präzipitate und somit große Komplexe abzentrifugiert.

4.5.3 Untersuchung der Komplexbildung von monomerem IgE und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200 PC 3.2/30

Wie in Abbildung 4.9 B zu erkennen ist, zeigt IgE (blaue Kurve) eine Eigenaggregation. Um eine Bindung von HEK-IPSE mit schon vorher aggregiertem IgE auszuschließen, wurde für die Untersuchung der Komplexbildung in Lösung versucht reines monomeres IgE zu erhalten. Dafür wurden große Mengen von IgE mit der Superdex 200 10/300 GL aufgetrennt und die Fraktionen, die vermutlich nur monomeres IgE enthielten gesammelt (hier Fraktionen B7 und B8), eingeengt und zur Überprüfung über die Superdex 200 PC 3.2/30 gegeben (s. Abbildung 4.12 A). Es wurde hier mit der kleinen Säule gearbeitet, da nur geringe Mengen von dem monomeren IgE vorhanden waren. Es zeigte sich, dass das aggregierte IgE von dem nicht-aggregiertem IgE abgetrennt werden konnte und reines monomeres IgE zur Verfügung stand. Im Laufe der Zeit trat aber wieder ein kleiner Peak vor dem Hauptpeak auf (s. Abbildung 4.12 B), was bedeutet, dass wieder eine leichte Eigenaggregation von IgE stattgefunden hat.

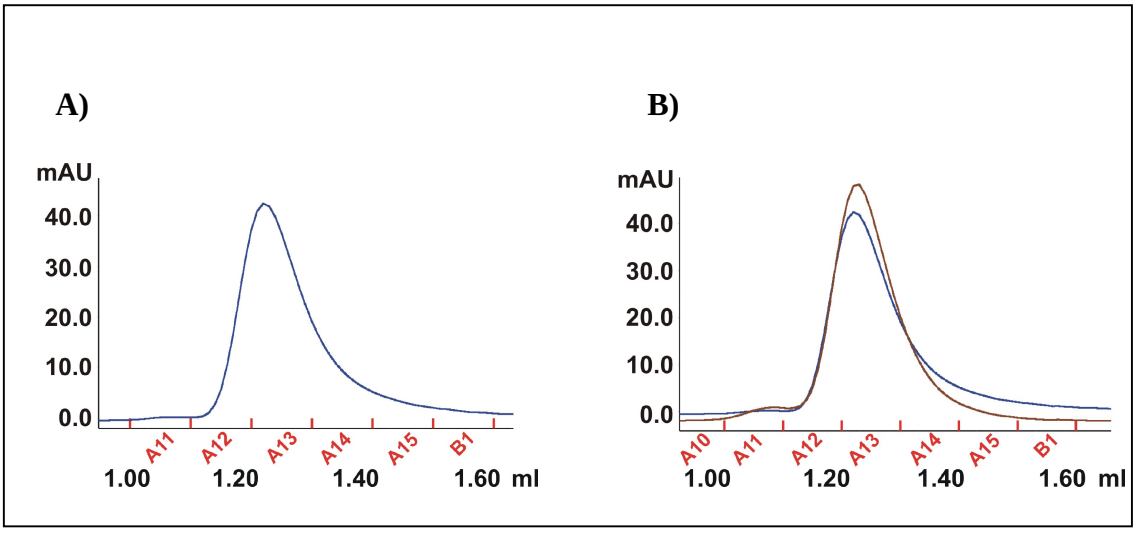


Abbildung 4.12: Proteinprofile von monomerem IgE. Nicht-aggregiertes (monomeres) IgE wurde von aggregiertem IgE abgetrennt **A)** Proteinprofil von monomerem IgE nach einem Tag. **B)** Vergleich der Proteinprofile von monomerem IgE nach einem Tag (blaue Kurve) und nach 5 Tagen (braune Kurve).

In diesem Versuch wurden erneut IgE und HEK-IPSE in einem 1:1- und 1:4-Verhältnis gemischt und mittels der Superdex 200 PC 3.2/30 untersucht (s. Abbildung 4.13). Da mit kleinen Mengen gearbeitet wurde, war es hier nicht möglich die Fraktionen in einem Silbergel zu untersuchen.

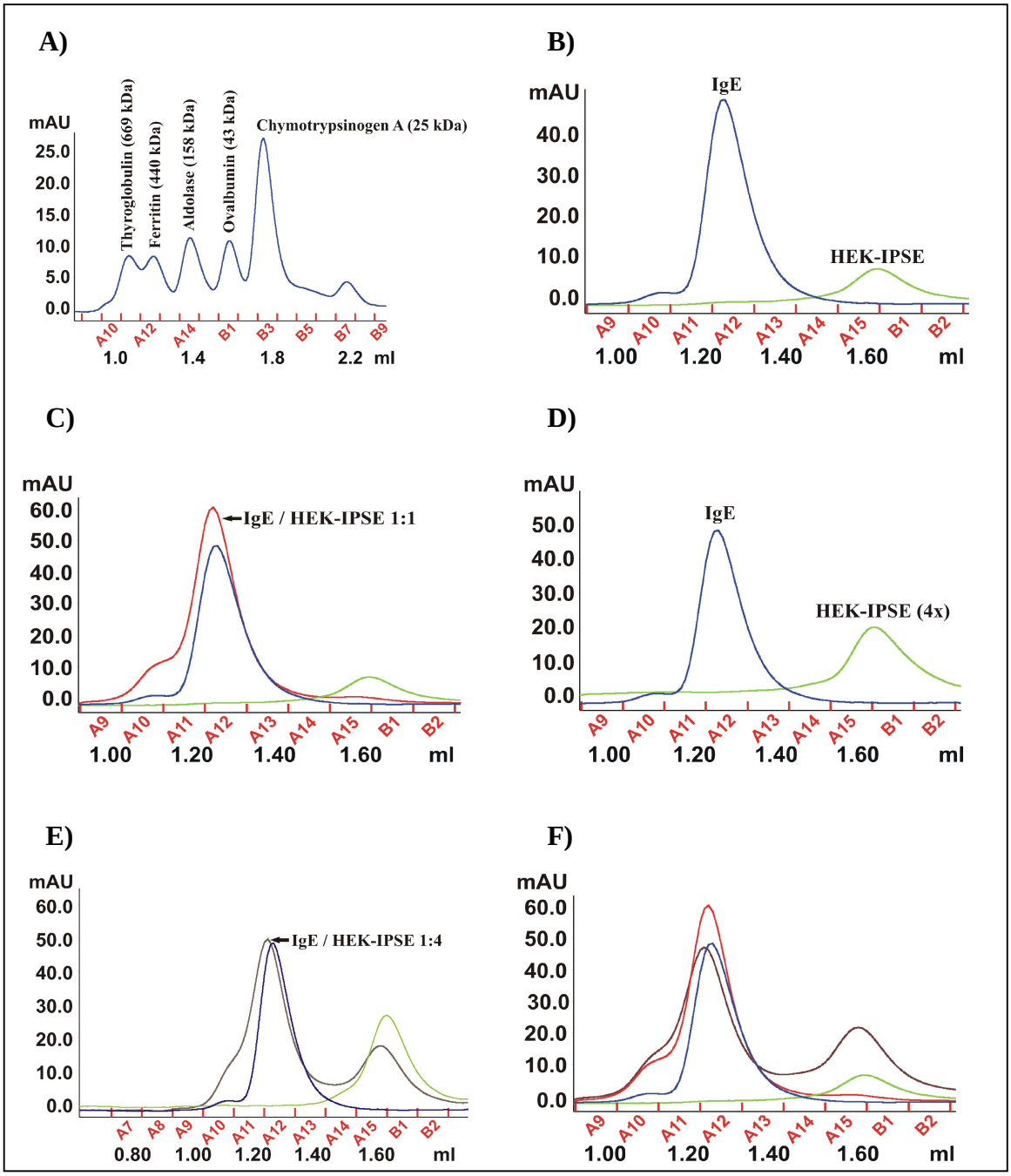


Abbildung 4.13: Untersuchung der Komplexbildung von monomerem IgE und HEK-IPSE in Lösung mittels Superdex 200. Monomeres IgE und HEK-IPSE wurden in Lösung 1:1 und 1:4 miteinander vermischt und nachträglich über eine Superdex 200-Säule aufgetrennt. **A)** Markerlauf. **B)** Proteinprofile von IgE (blaue Kurve) und HEK-IPSE (grüne Kurve) einzeln aufgetrennt im 1:1-Verhältnis. **C)** Proteinprofil von der Auftrennung des 1:1-Gemisches (rote Kurve) im Vergleich zu den Einzelmolekülen. **D)** Proteinprofil von IgE (blaue Kurve) und HEK-IPSE (grüne Kurve) einzeln aufgetrennt im 1:4-Verhältnis. **E)** Proteinprofil von der Auftrennung des 1:4-Gemisches (braune Kurve) im Vergleich im Vergleich zu den Einzelmolekülen. **F)** Vergleich der Auftrennung des 1:1-Gemisches (rote Kurve) zu der Auftrennung des 1:4-Gemisches (braune Kurve) und den Einzelmolekülen.

Abbildung 4.13 B zeigt die Einzelmoleküle von IgE (blaue Kurve) und HEK-IPSE (grüne Kurve) im 1:1-Verhältnis. Bild C zeigt die Auftrennung des 1:1-Gemisches (rote Kurve) im Vergleich zu den Einzelmolekülen. Es fällt auf, dass im Gegensatz zum vorherigen Versuch, der IgE-Hauptpeak nicht kleiner wird. Stattdessen steigt er sogar an, was aber auf Schwankungen beim Pipettieren zurückzuführen sein könnte, da hier mit kleinen Mengen gearbeitet wurde. Ansonsten ist auch wieder eine leichte Linksverschiebung zu erkennen und im Bereich des leicht aggregierten IgE's kommt es zu einem Anstieg des Peaks. Der Peak von HEK-IPSE nimmt wieder stark ab. Dies lässt, wie schon aus den vorherigen Versuchen bestätigt, auf eine Interaktion zwischen beiden Molekülen schließen. Bild D (Abbildung 4.13) zeigt noch einmal die Einzelmoleküle von IgE und HEK-IPSE, wobei HEK-IPSE hier in vierfacher Menge eingesetzt wurde. Bild E zeigt die Auftrennung des 1:4-Gemisches im Vergleich zu den Einzelmolekülen. Es ist auch hier wieder eine leichte Linksverschiebung des IgE-Hauptpeaks zu sehen, der ebenfalls von der Höhe nicht abnimmt. Weiterhin ist ein leichter Abfall des Peaks von HEK-IPSE zu erkennen, es scheint aber auch hier, dass noch viele ungebundene Moleküle vorhanden sind. Bild F in Abbildung 4.13 zeigt vergleichend die Auftrennung des 1:1-Gemisches (rote Kurve) und des 1:4-Gemisches. Beide Kurven unterscheiden sich nicht stark voneinander. Beim 1:4-Gemisch ist der Übergang des Hauptpeaks in die linke Schulter stärker verstrichen als beim 1:1-Gemisch. Der Übergang vom Aggregat- zum Hauptpeak ist hier nicht mehr so deutlich. Ferner ist auch hier noch deutlich ungebundenes HEK-IPSE zu erkennen.

Zusammenfassend sprachen die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie für eine sehr niedrige Affinität zwischen IPSE und IgG und eine etwas höhere Affinität zwischen IPSE und IgE. Die moderate Linksverschiebung des IgE-Peaks nach Interaktion mit IPSE spricht gegen die Bildung großer Aggregate und damit gegen eine Quervernetzung von IgE. Vielmehr dürfte es sich dabei um Anlagerung von einem oder mehreren Molekülen IPSE an ein IgE-Molekül handeln. Diese Annahme wird unterstützt durch die Zunahme der Linksverschiebung des IgE-Peaks im IPSE-Überschuss bzw. durch deren Abnahme im IgE-Überschuss. Während der Inkubationszeit konnten eine Präzipitatbildung und somit die Bildung von großen Komplexen nicht beobachtet werden. Bei der Untersuchung der Interaktion zwischen IgG und Protein L waren dagegen deutlich sichtbare Präzipitate zu beobachten.

4.6 Bindungsuntersuchung zwischen Immunglobulin und IPSE mittels Affinitätschromatographie

Da die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie auf eine schwache Affinität zwischen IPSE und Immunglobulin hinwiesen, sollte die Bindung zwischen IPSE und Immunglobuline mit Hilfe von affinitätschromatographischen Methoden weiter untersucht werden. Es wurde auch hier wieder hauptsächlich mit IgG gearbeitet.

4.6.1 Untersuchung der Bindung von IgG an HEK-IPSE mittels einer HEK-IPSE Säule

Hierfür wurde HEK-IPSE kovalent an eine NHS-aktivierte Sepharose-Säule gekoppelt und IgG im gleichen Verhältnis aufgetragen. Das gebundene IgG wurde anschließend mit niedrigem pH-Wert von der Säule eluiert (s. 3.9.2.1).

Abbildung 4.14 zeigt das Proteinprofil des nichtgebundenen (Effluent; Bild A) und des eluierten IgG (Bild B). Die Höhe der beiden Kurven zeigt deutlich, dass sehr wenig IgG an HEK-IPSE gebundenen hat. Die Kurve des nichtgebundenen IgG liegt bei ca. 3000 mAUs, was auf viel IgG im Durchlauf schließen lässt, während die Kurve des eluierten IgG knapp über 120 mAUs liegt und somit wenig IgG enthält. Auch die Bestimmung der Konzentration des nicht gebundenen IgGs zeigte einen Wert von 5,27 mg/ml (zusammen aus zwei Fraktionen (A3; A4) à 500 µl) und liegt dabei nur knapp unter der insgesamt eingesetzten Menge von 6 mg IgG. Abbildung 4.14 C zeigt die Untersuchungen der Fraktionen beider Kurven in einem silbergefärbten SDS-Gel. Wie schon aus der Kurve des Durchlaufes vermutet (Bild A), ist sehr viel IgG im Durchlauf enthalten. Die im Effluent enthaltene IgG-Konzentration ist sehr hoch, erkennbar an der hohen Bandenintensität (bei den niedermolekularen Banden handelt es sich vermutlich um IgG-Bruchstücke). In den Eluatfraktionen ist wesentlich weniger IgG enthalten, was die deutlich schwächeren IgG-Banden im Gel zeigen.

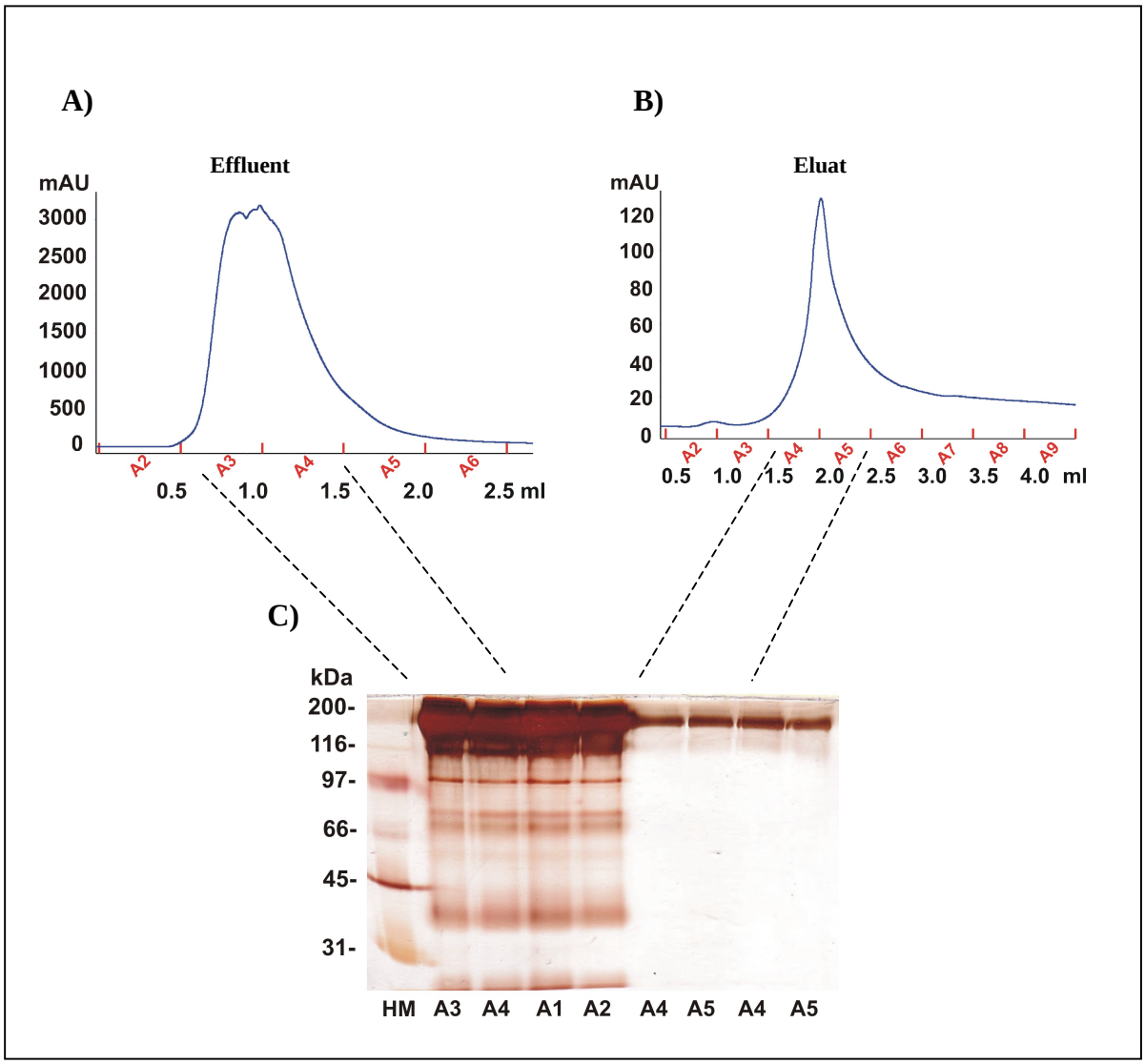


Abbildung 4.14: Untersuchung der Bindung von IgG an HEK-IPSE mittels einer HEK-IPSE-Säule. HEK-IPSE wurde an eine Sepharose-Säule gekoppelt. IgG wurde im gleichen Verhältnis zugegeben. Das gebundene IgG wurde mit niedrigem pH-Wert wieder eluiert. **A)** Proteinprofil von nicht gebundenem IgG (Effluent). **B)** Proteinprofil von eluiertem IgG. **C)** Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung des Effluents und Eluat von IgG. A: Fraktionen; HM: High Marker

4.6.2 Untersuchung der Bindung von IgG / IgE an IPSE mittels IMAC

Nachdem die Ergebnisse der HEK-IPSE Säule gezeigt haben, dass nur sehr wenig IgG an IPSE gebunden hat, wurde dieser Versuch mittels IMAC wiederholt. Für diesen Versuch wurde der His-Tag von den rekombinanten IPSE-Molekülen zur reversiblen Bindung an eine Ni-NTA-Agarose ausgenutzt. Hierbei sollte erreicht werden, dass mögliche Immunglobulin-Bindungsstellen frei liegen *E. coli*-IPSE hat seinen His-Tag am N-terminalen Ende, HEK-

IPSE dagegen C-terminal. Dieser Versuch wurde zuerst mit IgG und HEK-IPSE in einem 1:1- und 1:2-Verhältnis durchgeführt. Für das 1:2-Verhältnis wurden IgG und HEK-IPSE, vor der Bindung an die Ni-NTA-Agarose, in Lösung miteinander vermischt, sonst wurde IPSE zuerst an die Ni-NTA-Agarose gebunden (s. 3.9.2.2). Abbildung 4.9 zeigt die silbergefärbten SDS-Gele zur Untersuchung der Fraktionen aus beiden Versuchen (Bild A (1:1) und B (1:2)).

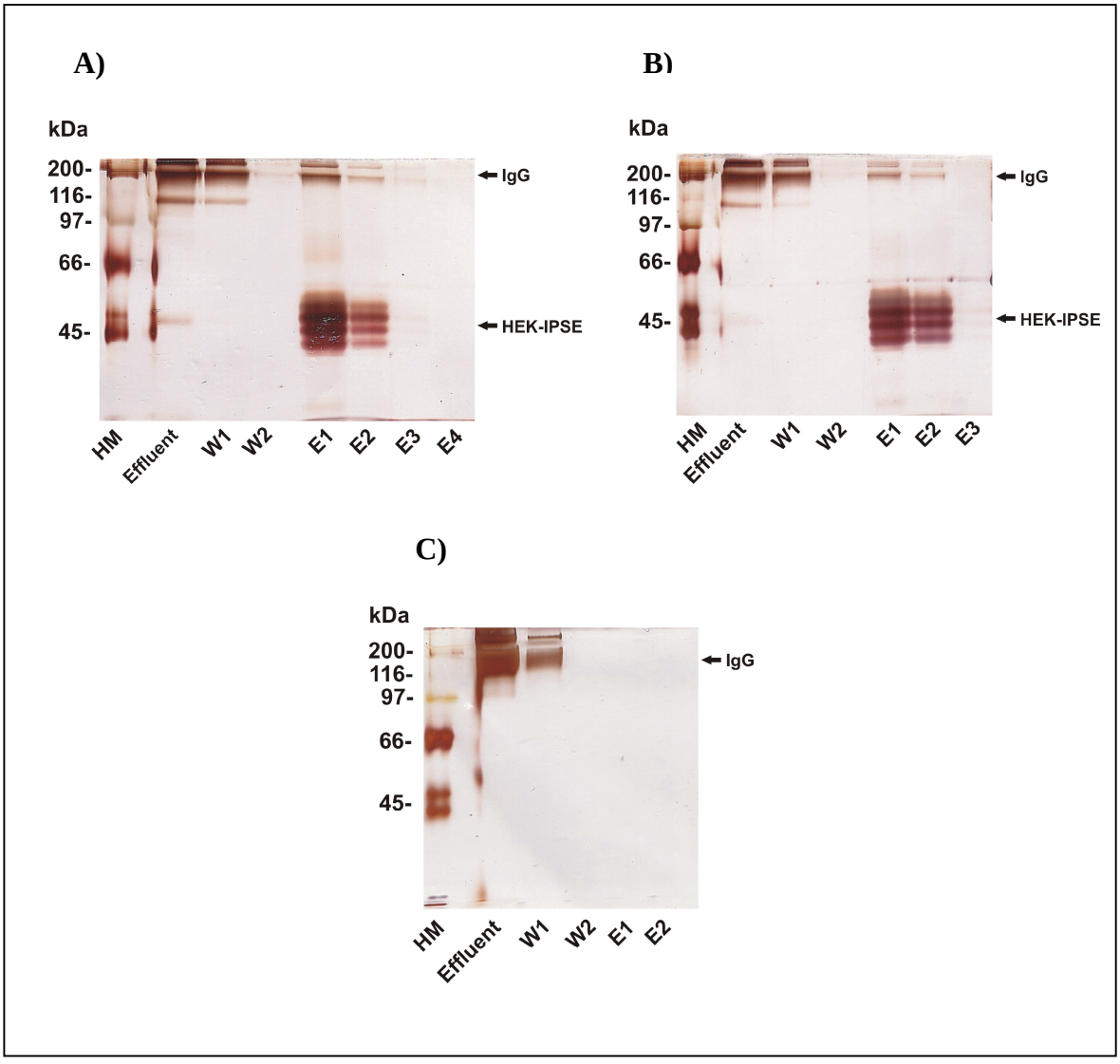


Abbildung 4.15: Untersuchung der Bindung von IgG an HEK-IPSE (1:1; 1:2) mittels IMAC. Silbergefärbte SDS-Gele zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen**. A)** HEK-IPSE wurde an Ni-NTA-Agarose gebunden und IgG in äquimolarer Menge zugegeben. **B)** HEK-IPSE und IgG wurden vor der Bindung an Ni-NTA-Agarose in einem 2:1-Verhältnis in Lösung vermischt. Das Ni-NTA-Gemisch wurde jeweils in eine Säule gegeben und gewaschen. .Die Elution erfolgte anschließend mit 250 mM Imidazol **C)** IgG-Kontrolle ohne HEK-IPSE.. HM: High Marker; W: Waschfraktionen; E: Eluatfraktionen

In beiden Gelen ist kein Unterschied in der IgG-Bindung zu erkennen. Das Effluent und die erste Waschfraktion (W1) zeigen deutlich eine stark angefärbte IgG-Bande bei ca 150 kDa, während die Eluatfraktionen nur wenig IgG aufweisen. Die Banden sind wesentlich schwächer als im Effluent und auch im Vergleich zu den Banden von HEK-IPSE (hier bei ca. 45 kDa), was mit dem IgG zusammen von der Säule eluiert wurde. Bild C zeigt den Kontrollversuch mit IgG, ohne das HEK-IPSE vorher an die Matrix gebunden wurde. In den Eluatfraktionen ist eindeutig kein IgG nachweisbar. Somit ist die sichtbare Bindung in den Eluatfraktionen mit HEK-IPSE keine unspezifische Bindung an die Ni-NTA-Agarose, sondern eine Bindung an das HEK-IPSE direkt.

Es ist bekannt, dass die IL-4-Freisetzung aus den Basophilen durch IPSE IgE-abhängig ist (Haisch et al., 2001; Schramm et al., 2003). Zusätzlich konnten frühere Dot-Blotting-Versuche (Blindow 2004) als auch die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie zeigen, dass IPSE an IgE mit höherer Affinität bindet als an IgG. Die oben abgebildeten Ergebnisse (s. Abbildung 4.15) zeigen, dass nur sehr wenig IgG an das HEK-IPSE bindet. Aus diesem Grund wurde hier auch die Bindungseigenschaft von IgE an HEK-IPSE im 1:1-Verhältnis im Vergleich zu IgG mittels IMAC untersucht. Abbildung 4.16 zeigt die Silbergele aus beiden Versuchen. Bild A zeigt die Bindung von IgE an HEK-IPSE und Bild B die Bindung von IgG an HEK-IPSE. Es ist deutlich in Bild A zu erkennen das hier ebenfalls viel IgE im Effluent und in der ersten Waschfraktion (W) enthalten ist. Es ist jeweils eine sehr dicke Bande, die bei ca. 180 kDa liegen sollte, zu erkennen. Nur wenig IgE ist dagegen in den Eluatfraktionen enthalten. D. h. es bindet ebenfalls nur wenig IgE an HEK-IPSE. Ein Vergleich zeigt, dass die IgE-Banden gegenüber den IgG-Banden in den Eluatfraktionen stärker hervortreten. Vergleicht man aber auch die Bandenstärke von HEK-IPSE in beiden Gelen, scheinen die Banden von HEK-IPSE in Bild A ebenfalls stärker angefärbt zu sein. Somit liegt diese stärkere Bandenfärbung vermutlich an der Silberfärbung selbst.

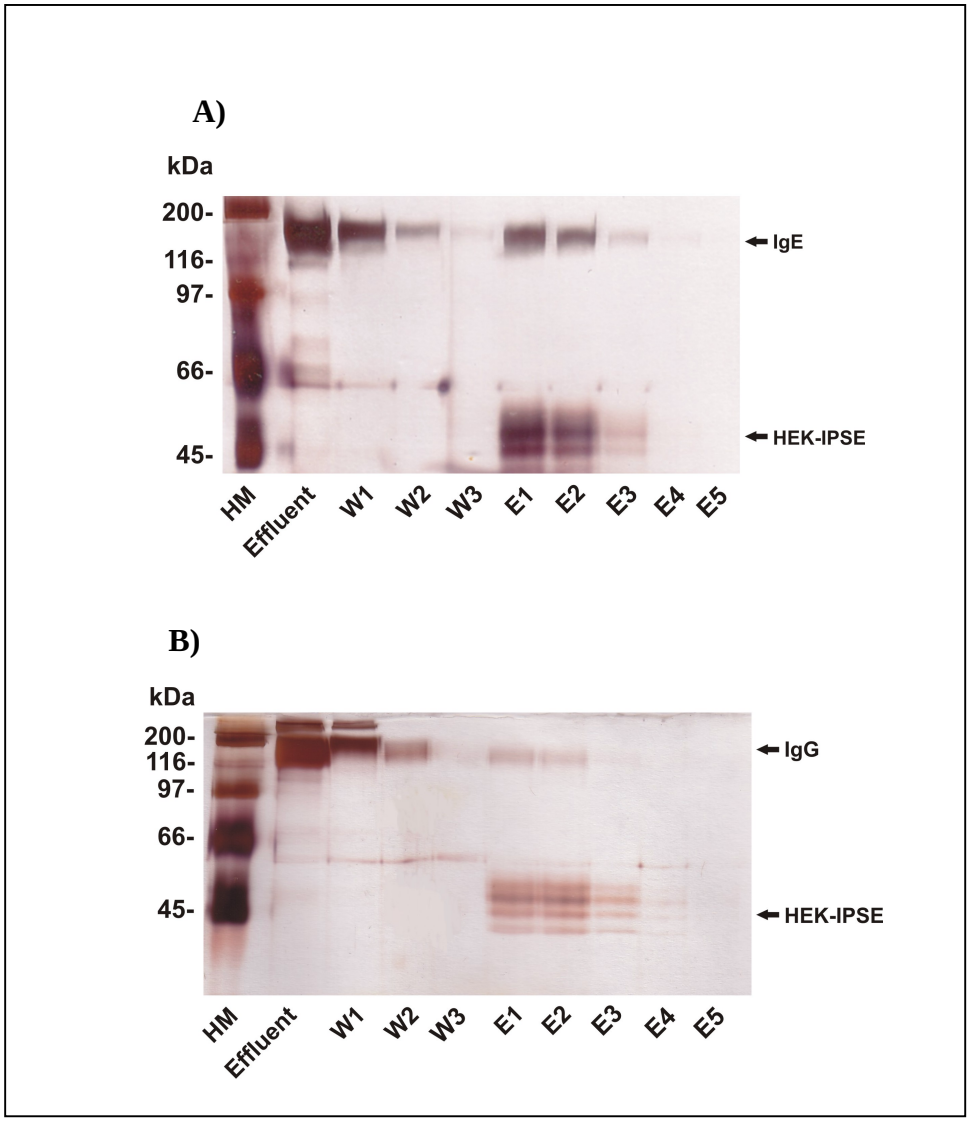


Abbildung 4.16: Untersuchung der Bindung von IgE / IgG an HEK-IPSE (1:1) mittels IMAC (SDS-PAGE, Silberfärbung**).** HEK-IPSE wurde an Ni-NTA-Agarose gebunden und IgE oder IgG jeweils in äquimolarem Verhältnis zum immobilisierten HEK-IPSE zugegeben Das Gemisch wurde in eine Säule gegeben und gewaschen. Die anschließende Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol. **A)** HEK-IPSE / IgE im 1:1-Verhältnis. **B)** HEK-IPSE / IgG im 1:1-Verhältnis. HM: High Marker; W: Waschfraktionen; E: Eluatfraktionen.

Wie oben erwähnt, besitzt HEK-IPSE einen C-terminalen His-Tag. Um auszuschließen, dass die schwache Bindung von IgG an HEK-IPSE nach dessen Bindung an Ni-NTA-Agarose auf einer sterischen Behinderung beruht, wurde der Versuch mit *E.coli*-IPSE, das an Stelle des C-terminalen einen N-terminalen His-Tag besitzt und somit vermutlich in einer anderen Orientierung an die Ni-NTA-Agarose bindet, wiederholt. Hierbei wurden IgG und *E.coli*-IPSE im Verhältnis 1:1 untersucht (s. Abbildung 4.17).

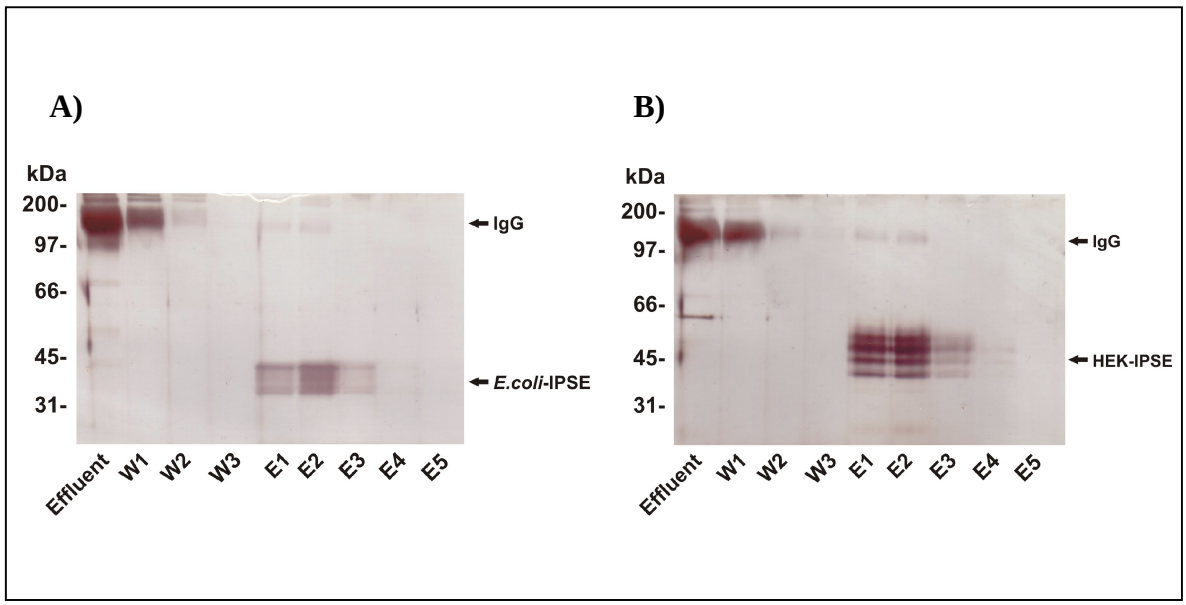


Abbildung 4.17: Untersuchung der Bindung von IgG an E. coli-IPSE und HEK-IPSE (1:1) mittels IMAC (SDS-PAGE, Silberfärbung). *E.coli*-IPSE oder HEK-IPSE wurden an Ni-NTA-Agarose gebunden und IgG im gleichen Verhältnis zugegeben. Das Gemisch wurde in eine Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol **A)** E. coli-IPSE / IgG im 1:1-Verhältnis. **B)** HEK-IPSE / IgG im1:1-Verhältnis. W: Waschfraktionen; E: Eluatfraktionen

Bild A zeigt die Bindung von IgG an *E.coli*-IPSE und Bild B die IgG-Bindung an HEK-IPSE. Es ist kein Unterschied zwischen beiden Molekülen hinsichtlich der Bindung von IgG zu erkennen. Es ist jeweils viel IgG im Effluent enthalten und wenig in den Eluatfraktionen. Die Banden sind wesentlich schwächer als in den anderen oben gezeigten Gelen. Das liegt an der eingesetzten Menge von IPSE. Aufgrund der geringen Konzentration von *E.coli*-IPSE (0,13 mg/ml) wurde weniger IPSE und somit weniger IgG in diesem Versuch eingesetzt.

4.6.3 Untersuchung der Bindung von HEK-IPSE an IgG mittels einer Protein G-Säule

Nachdem in den vorherigen Versuchen die Bindung von löslichem Immunglobulin (IgG, IgE) an Festphasen-gekoppeltes IPSE untersucht worden war (s. 4.6.1 und 4.6.2), sollte nun die Bindung von löslichem IPSE an Festphasen-gekoppeltes Immunglobulin untersucht werden. Es wurde hierfür wieder mit IgG gearbeitet. IgG wurde reversibel an eine Protein G-Säule gebunden und HEK-IPSE im gleichen Verhältnis zugegeben. Das gebundene HEK-IPSE

wurde dann zusammen mit dem IgG durch einen Puffer mit niedrigem pH-Wert wieder eluiert (s. 3.9.2.3). Abbildung 4.18 zeigt die Proteinprofile (Bild A, B) eines Kontrolllaufes mit IgG zur Überprüfung, ob IgG vollständig an das Protein G bindet und ob es auch wieder eluiert werden kann. Es wurde hierfür die gleiche Menge IgG (1 mg) eingesetzt, wie in den Versuchen mit IPSE verwendet wurde. Bild A zeigt das Effluent während der Bindung von IgG. Es ist hier nur noch ein kleiner Peak bei ca. 12 mAUs sichtbar im Gegensatz zu dem Elutionspeak der bei ca. 275 mAUs liegt (Bild B). Bild C in Abb. 4.12 zeigt das Silbergel zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen. Es ist hier deutlich zu erkennen, dass das Effluent kein nachweisbares IgG (VS) enthält (s. Fraktion A4). Dagegen sind in den Eluatfraktionen deutliche IgG-Banden zu erkennen. D. h. IgG wurde gebunden und konnte auch wieder eluiert werden.

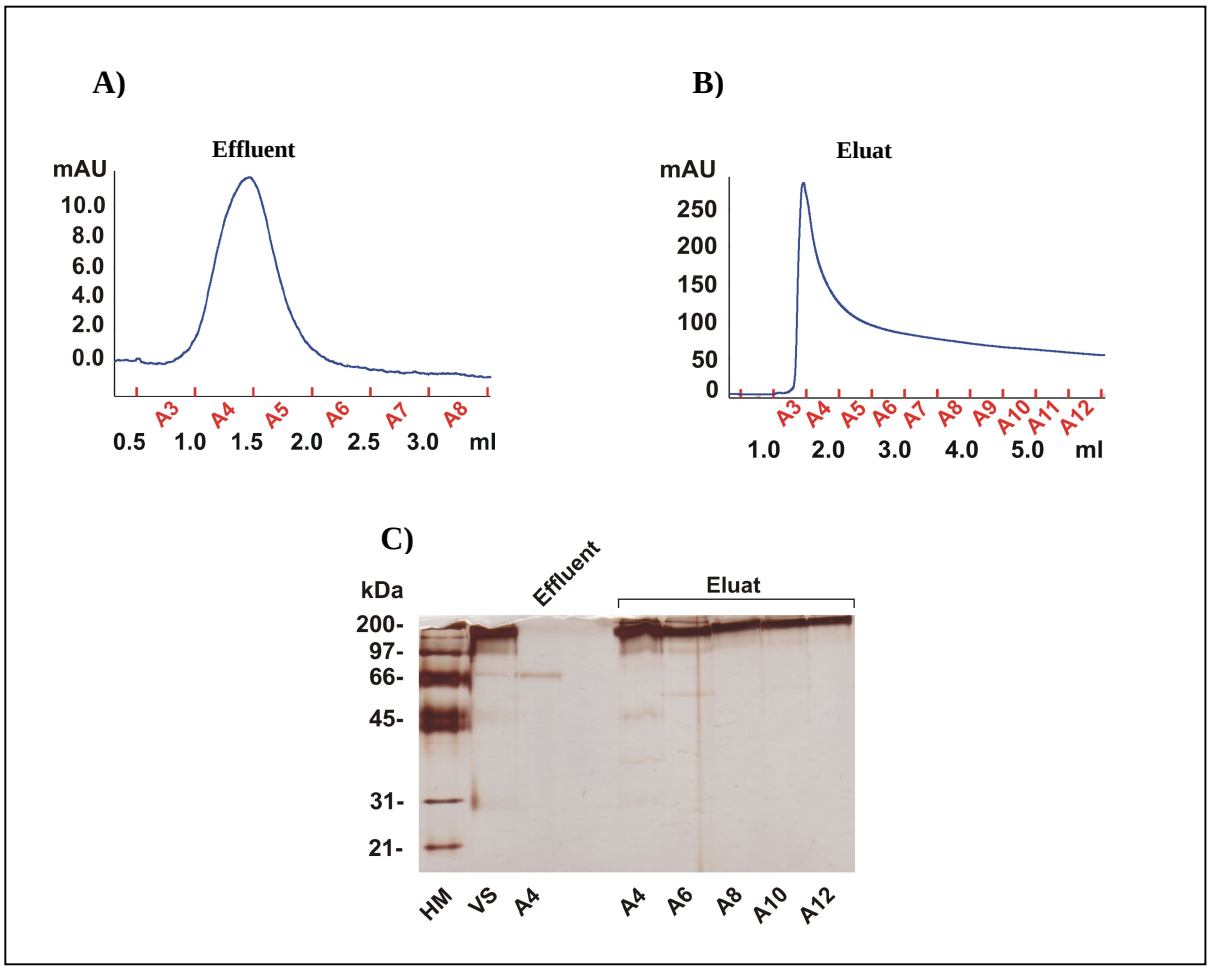


Abbildung 4.18: Protein-G-Säule; Kontrollauf mit IgG. IgG wurde an die Protein-G-Säule gebunden und mit einem niedrigen pH-Wert wieder eluiert. **A)** Proteinprofil von nichtgebundenem IgG (Effluent). **B)** Proteinprofil von eluiertem IgG. **C).** Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung des Durchlaufes und Elution von IgG: VS: Vor Säule (eingesetztes IgG); A: Fraktionen; HM: High Marker.

Des Weiteren wurde noch zusätzlich ein Kontrolllauf mit HEK-IPSE ohne vorherige Bindung von IgG durchgeführt, um unspezifische Bindungen an die Säule auszuschließen. Abbildung 4.19 zeigt das Proteinprofil des Effluents und der Elution von HEK-IPSE (Bild A) und das Silbergel zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen (Bild B). Das Effluent zeigt deutlich einen Peak bei ungefähr 90 mAUs, während bei der Elution kein Peak zu erkennen ist. Das deutet darauf hin, dass kein HEK-IPSE unspezifisch gebunden hat, was wieder eluiert werden könnte. Auch das Silbergel zeigt, dass HEK-IPSE nur in den Fraktionen des Effluents enthalten ist bei ca. 45 kDa. Die Intensität der Bande spiegelt auch ungefähr die Menge des eingesetzten HEK-IPSE wieder (VS). Die Eluatfraktionen enthalten kein HEK-IPSE. Somit konnte eine unspezifische Bindung von HEK-IPSE an die Säule ausgeschlossen werden.

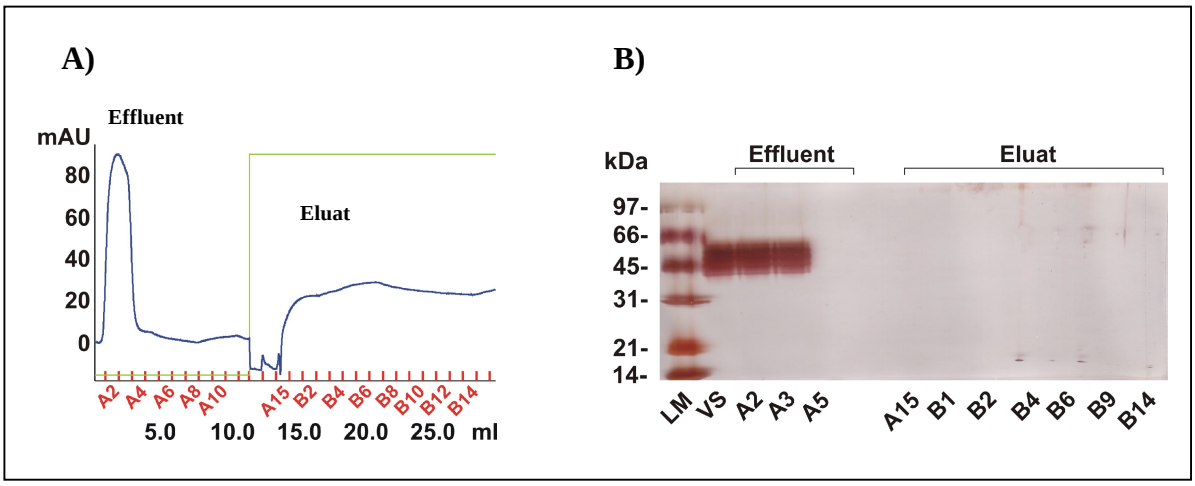


Abbildung 4.19: Protein-G-Säule; Kontrolllauf mit HEK-IPSE ohne IgG. HEK-IPSE wurde über die Protein-G-Säule gegeben (ohne vorausgegangene IgG-Bindung an Protein G) mit nachfolgender Elution durch einen niedrigen pH-Wert. **A)** Proteinprofil des Effluent und der Elution. **B)** Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen von Durchlauf und Elution: VS: Vor Säule (eingesetztes HEK-IPSE); A,B: Fraktionen; LM: Low Marker.

Abbildung 4.20 zeigt das Proteinprofil von HEK-IPSE während der Bindung an IgG (Effluent) und die Elution beider Moleküle (Bild A). Es ist ein hoher Peak um ca. 200 mAUs im Effluent zu erkennen, was auf viel ungebundenes HEK-IPSE schließen lässt. Der Elutionspeak liegt bei ca. 350 mAUs, wobei hier neben HEK-IPSE auch das wieder gelöste IgG mit einbezogen ist. In dem Silbergel, zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen, sind ebenfalls deutlich starke Banden von HEK-IPSE bei ca. 45 kDa in den Fraktionen des Effluents zu erkennen, insbesondere in Fraktion A2. Die Stärke der Banden korreliert mit der

eingesetzten Menge von HEK-IPSE (VS). In den Eluatfraktionen sind nur in der ersten Fraktion A14 die Banden von HEK-IPSE zu erkennen. Im Gegensatz zu den Banden des Effluents sind hier die Banden sehr schwach, was auf wenig HEK-IPSE in der Eluatfraktion hindeutet. Das heißt, es hat nur wenig HEK-IPSE an das IgG an der Säule gebunden. Zusätzlich zu den schwachen Banden von HEK-IPSE sind in den Eluatfraktionen auch deutlich die Banden von IgG zu erkennen.

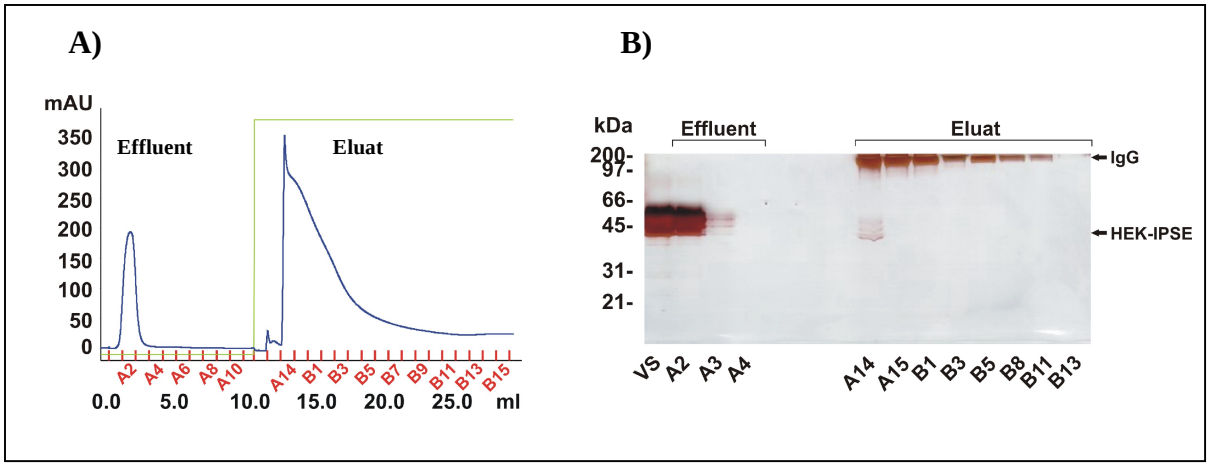


Abbildung 4.20: Untersuchung der Bindung von HEK-IPSE an IgG mittels einer Protein-G-Säule. IgG wurde an eine Protein-G-Säule gebunden und HEK-IPSE nachträglich auf die Säule gegeben. Beide Moleküle wurden mit einem niedrigen pH-Wert eluiert. **A)** Proteinprofil des Effluents von HEK-IPSE und Elution von IgG und HEK-IPSE. **B)** Silbergefärbtes SDS-Gel zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen von Durchlauf und Elution: VS: Vor Säule (eingesetztes HEK-IPSE); A,B: Fraktionen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur wenig IgG oder IgE an IPSE bindet, wenn dieses vorher an eine feste Phase gebunden ist. Es macht hierbei keinen Unterschied, ob IPSE kovalent an eine NHS-aktivierte Säule oder mittels seines His-Tags reversibel an eine Ni-NTA-Agarose gebunden ist. Auch wenn umgekehrt IgG an eine Protein-G-Säule gebunden ist und dann HEK-IPSE zugegeben wird, resultiert nur eine schwache Bindung zwischen diesen beiden Molekülen.

4.7 Untersuchung der Eigenaggregation von HEK-IPSE mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Wie schon durch die chemische Quervernetzung gezeigt (s. 4.4.2) besitzt HEK-IPSE eine Eigenaggregation und liegt in Lösung mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht als reines Dimer vor. Wird HEK-IPSE allerdings chromatographisch oder elektrophoretisch aufgetrennt, kann eine Komplexbildung nicht sichtbar gemacht werden (s. auch 4.5), da die mutmaßlichen Aggregate wohl in Folge mechanischer oder elektrischer Scherkräfte zerlegt werden dürften. Um den Einfluss von Scherkräften auszuschalten, wurde HEK-IPSE mittels DLS auf das Vorliegen von Aggregaten untersucht. Hierbei wurde die HEK-IPSE Probe sowohl nicht-zentrifugiert als auch zentrifugiert eingesetzt und jeweils der hydrodynamische Radius bestimmt (s. 3.10). Es wurden je Probe 10 Messungen á 10 sek durchgeführt. Abbildung 4.21 zeigt die aus der gemittelten Korrelationsfunktion (hier nicht dargestellt) errechnete Verteilung der hydrodynamischen Radien von HEK-IPSE.

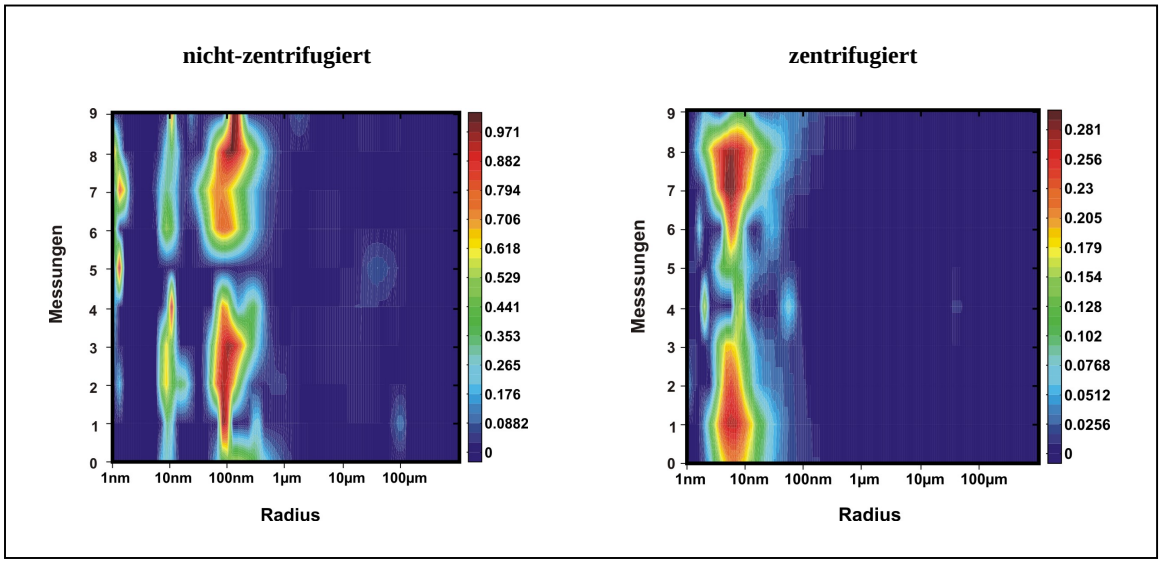


Abbildung 4.21: Verteilung der hydrodynamischen Radien von HEK-IPSE in der DLS. HEK-IPSE in PBS-Puffer wurde nicht-zentrifugiert und zentrifugiert untersucht. Es wurden jeweils 10 Messungen á 10 sek durchgeführt.

Die nicht-zentrifugierte HEK-IPSE Probe zeigt hierbei deutlich die Ausbildung von Aggregaten. Es sind Peaks im Bereich von etwa 10 – 100 nm zu erkennen, wobei die Hauptpeaks mit breiter Streuung im Bereich von 100 nm liegen. Weiterhin zeigen sich aber

auch Peaks im Bereich von etwa 1 nm, oder etwas darüber, was auf nicht-aggregiertes HEK-IPSE-Dimer hinweisen könnte. Im Allgemeinen zeigt dieses Ergebnis, dass die HEK-IPSE Probe sehr uneinheitlich ist und Aggregate unterschiedlicher Größe enthält.
Die zentrifugierte HEK-IPSE Probe zeigt ein etwas einheitlicheres Bild. Aggregate im Bereich von 100 nm wurden in dieser Probe nicht mehr gemessen. Der Hauptpeak liegt hier bei etwa 5 – 10 nm mit einer breiten Verteilung, was immer noch auf eine Aggregation von HEK-IPSE hinweist. Die Höhe der Peaks hat in dieser Probe allerdings um ca. 1/3 abgenommen. Dies lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine Abnahme der Proteinkonzentration nach Entfernung der Aggregate durch die Zentrifugation erklären. Hiermit ist ebenfalls das Wegfallen der Peaks bei 100nm zu erklären. Moleküle mit kleineren Radien von etwa 1 nm sind in dieser Probe nicht zu erkennen. Im Allgemeinen wirkt diese Probe einheitlicher als die nicht-zentrifugierte Probe, da sich hier nicht die Ausbildung von mehreren Aggregationsstadien zeigt. Trotzdem ist immer noch die Eigenaggregation von HEK-IPSE zu erkennen.

4.7.1 Untersuchung der IL-4-Freisetzung aus humanen Basophilen durch zentrifugiertes bzw. nicht-zentrifugiertes HEK-IPSE

Die Untersuchung von nicht-zentrifugiertem HEK-IPSE mittels Dynamischer Lichstreuung zeigte, dass HEK-IPSE in Lösung nicht nur als Dimer, sondern hauptsächlich in Form von Aggregaten unterschiedlicher Größe vorliegt. Durch Zentrifugation wurden die großen Aggregate entfernt und die Probe wurde einheitlicher. Trotzdem zeigte sich immer noch eine Eigenaggregation (s. 4.7). Um eventuelle Unterschiede zwischen zentrifugiertem und nicht-zentrifugiertem HEK-IPSE hinsichtlich der Fähigkeit zur Basophilenaktivierung zu ermitteln, sollten diese Proben in einem Basophilenstimulationstest mit anschließendem IL-4-ELISA (s. 3.12 und 3.13) untersucht werden. Abbildung 4.22 zeigt den Verlauf der IL-4-Freisetzung von HEK-IPSE, sowohl nicht-zentrifugiert als auch zentrifugiert eingesetzt. Beide Proben zeigen den charakteristischen glockenförmigen Verlauf, den alle IPSE-Präparationen aufweisen (Wodrich, 2006). Das Maximum der IL-4-Freisetzung ist bei der zentrifugierten Probe schon bei 0,8 ng IPSE/ml erreicht, während bei der nicht-zentrifugierten Probe das Maximum bei 4 ng IPSE/ml liegt und somit eine leicht geringere Aktivität aufweist. Da die Kurven aber ansonsten sehr parallel laufen, kann es sich bei der zentrifugierten Probe auch um einen so genannten Ausreißer halten, der experimentell bedingt sein könnte. Im Allgemeinen zeigen

beide Proben eine sehr ähnliche Aktivität auf den Basophilen, womit kein sicherer Unterschied in der Aktivität zwischen zentrifugiertem und nicht-zentrifugiertem IPSE zu erkennen ist.

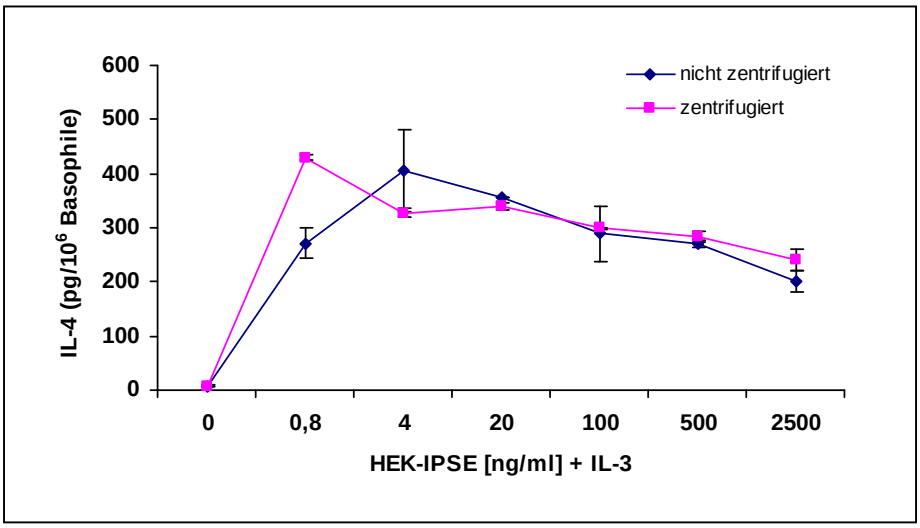


Abbildung 4.22: IL-4-Freisetzung aus gereinigten humanen Basophilen durch HEK-IPSE. Basophile wurden mit HEK-IPSE stimuliert und die IL-4-Freisetzung im ELISA gemessen. HEK-IPSE wurde nicht-zentrifugiert und zentrifugiert mit jeweils den gleichen Konzentrationen eingesetzt. Positivkontrolle: anti-IgE (174 IL-4 (pg /10^6 Basophile))

5 Diskussion

Infektionen mit parasitären Würmern führen zuverlässig zu einer Th2-Antwort mit gesteigerter IgE-Synthese und sind daher als Modell für die Aufklärung des Th2-auslösenden Mechanismus bei einer Allergie gut geeignet. Aus den Eiern des Trematoden *Schistosoma mansoni* wurde ein Triggerfaktor (IPSE) isoliert, der die IL-4-Freisetzung aus humanen Basophilen von nicht-infizierten Spendern bewirkt und daher ein potenzieller Immunmodulator in Richtung Th2-Antwort ist. Frühere Untersuchungen zeigten, dass IPSE ein Immunglobulin-bindender Faktor ist (Blindow, 2004), der Basophile IgE-vermittelt aktiviert (Haisch et al., 2001). Die IgE-vermittelte Aktivierung von Basophilen erfolgt anerkanntermaßen durch Quervernetzung von FcεRI-rezeptorgebundenem IgE (Metzger, 1992). Eine Quervernetzung kann dabei entweder antigenspezifisch durch Allergene, oder antigenunspezifisch durch Lektine (Haas et al., 1999) oder B-Zellsuperantigene (Patella et al., 1999; Florio et al., 2000; Genovese et al., 2003) erfolgen (s. auch 1.5). Für IPSE ist ein antigenspezifischer Wirkungsmechanismus sehr unwahrscheinlich, da IPSE, wie bereits erwähnt, auch Basophile nicht-infizierter Spender aktiviert und zudem auch an humanes monoklonales IgE eines gesunden Spenders (Firma Diatec) bindet. Ein Lektin-artiger Wirkungsmechanismus wurde von Blindow (2004) ausgeschlossen, da IPSE auch an deglykosylierte Immunglobuline bindet. Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei IPSE um ein B-Zellsuperantigen handelt. Diese sind von anderen pathogenen Organismen bekannt, z.B. Protein L aus *Peptostreptococcus magnus*, Protein A aus *Staphylococcus aureus* oder das Hüllprotein gp120 des Human Immunodeficiency Virus. Erstaunlicherweise ergaben jedoch alle bisher durchgeführten Experimente, wie Sandwich-Blots, Doppelimmunodiffusions-Experimente und Biacore-Analysen (Schramm, unveröffentlicht; Blindow, 2004; Wodrich 2006), dass IPSE im Gegensatz zu den anderen oben genannten B-Zellsuperantigenen nicht in der Lage ist, Immunglobuline querzuvernetzen. Daher stellte sich die Frage: Erfolgt die Basophilenaktivierung durch IPSE über einen neuen Wirkungsmechanismus ohne IgE-Quervernetzung allein über eine Konformationsänderung ausgelöst durch die Bindung an IgE?

Ein solcher Wirkungsmechanismus ist durchaus denkbar, da in einer Reihe von Publikationen bei der Bindung von IgE an FcεRI Konformationsänderungen der Interaktionspartner beschrieben worden sind (Sutton and Gould, 1993; Wan et al., 2002; Garman et al., 2001). Charles et al. (2004) beschrieben kürzlich ein FcεRI-assoziiertes 28 kDa Protein (p28), welches nach Bindung von IgE an den Rezeptor dissoziiert und nach Dissoziation von IgE

wieder reassoziiert. Über diesen Mechanismus scheint der Zelle der IgE-Besetzungsgrad des Rezeptors übermittelt zu werden. Darüberhinaus wurde in mehreren Publikationen gezeigt, dass die Bindung von monomerem IgE an FcεRI zu einer partiellen Aktivierung von FcεRI-positiven Zellen führt und in einer Hochregulation der FcεRI-Expression (MacGlashan et al., 1998; Borkowski et al., 2001) sowie einer verzögerten Apoptose von Mastzellen und Basophilen resultiert (Kalesnikoff et al., 2001; Asai et al., 2001; Kawakami and Galli, 2002). Des Weiteren zeigten Kalesnikoff et al. (2001) eine über längere Zeit detektierbare Tyrosinphosphorylierung der β-Kette von FcεRI, wenn auch weniger intensiv als mit aggregiertem IgE. Zusätzlich fanden die Autoren, dass monomeres IgE zwar nicht fähig ist, Mastzellen zur Degranulation und Freisetzung von LTC_4 zu triggern, aber zu einem Anstieg der mRNA-Synthese von Zytokinen, wie IL-6, TNF-α, IL-4 und IL-13, führt. Diese Beispiele der FcεRI-getriggerten Signaltransduktion, hervorgerufen durch Konformationsänderungen bei der Bindung von monomeren IgE an den Rezeptor, machen es durchaus denkbar, dass die zusätzliche Bindung eines Liganden wie IPSE an FcεRI-gebundenes IgE auch ohne Quervernetzung zu einer weiteren Konformationsänderung und damit zu einer vollständigen Aktivierung der Basophilen führt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Art der Interaktion von IPSE und Immunglobulinen weiter zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurden rekombinante IPSE-Moleküle (*E. coli*-IPSE und HEK-IPSE) eingesetzt.

5.1 E. *coli*-IPSE bindet im Dot Blot mit unterschiedlicher Intensität an das IgG-Gesamtmolekül und dessen Fab- und Fc-Fragmente

Immunglobulin-bindende Moleküle, wie die bereits erwähnten B-Zellsuperantigene aus Bakterien, können sowohl Fab- als auch Fc-Fragmente von Immunglobulinen binden und damit eine Aktivierung von Zellen auslösen. So zeigten Genovese et al. (2000), dass die Oberflächenproteine Protein A, aus *Staphylococcus aureus*, und Protein L, aus *Peptostreptococcus magnus*, durch Interaktion mit IgE, humane Herz-Mastzellen zur Mediatorenfreisetzung aktivieren. Protein A bindet an die Fab-Region von einigen IgM, IgA, IgG und IgE-Molekülen und an die IgG-Fc Region mit separaten Bindungsstellen (Deisenhofer, 1981; Inganäs, 1981; Romagnani et al., 1982). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, zeigten frühere Biacore-Daten (Blindow, 2004), dass IPSE als Immunglobulin-bindender Faktor, wie ein B-Zellsuperantigen, ebenfalls sowohl an Fab- als auch an Fc-Fragmente von IgG und IgE bindet. Dabei wurde gefunden, dass IgG-Fc schneller als IgG-Fab an immobilisiertes *E. coli*-IPSE bindet, aber auch schneller wieder dissoziiert, was auf eine niedrigere Bindungsaffinität hinweist, während für die Bindung von IgG-Fab an *E. coli*-IPSE eine langsamere Dissoziationsrate gemessen wurde. Bei den Biacore-Versuchen wurde *E. coli*-IPSE immobilisiert und lösliches IgG bzw. IgG-Fragmente als Liganden eingesetzt. Um der natürlichen Situation (IgG Zell-ständig, IPSE in Lösung) näher zukommen, wurden diese Bindungsstudien mit immobilisierten IgG, Fab- und Fc-Fragmenten und löslichem *E.coli*-IPSE im Dot Blot wiederholt. Auch in dieser Anordnung konnten die Biacore-Daten bestätigt werden. IPSE bindet mit unterschiedlicher Intensität an das IgG-Gesamtmolekül, Fab- und Fc-Fragmente, wobei die Fc-Fragmente deutlich schwächer gebunden werden als die Fab-Fragmente. Die stärkste Bindung zeigte sich an das Gesamtmolekül von IgG. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass für eine „optimale“ Bindung von IPSE das Gesamtmolekül IgG erforderlich ist, was die aus Biacore-Daten abgeleitete Hypothese von Blindow (2004) (s. 1.8) unterstützt und besagt, dass ein Molekül IPSE gleichzeitig an den Fab- und an den Fc-Teil des IgG-Moleküls bindet.

5.2 *E. coli*-IPSE ist nicht in der Lage zwei Moleküle IgG-Fab im Sandwich-Blot zu binden

Frühere Sandwich-Blot-Versuche zur Untersuchung der Quervernetzung von Immunglobulinen durch IPSE konnten keine Quervernetzung nachweisen (Schramm, unveröffentlicht). Hierfür wurde unmarkiertes IgE auf eine Nitrozellulosemembran gedottet und im ersten Schritt mit IPSE und anschließend mit biotinyliertem IgE inkubiert. Dabei war eine Bindung des biotinylierten IgE an IPSE nicht nachweisbar. Nachdem mit diesem Versuch gezeigt wurde, dass IPSE nicht in der Lage ist das IgE-Gesamtmolekül querzuvernetzen, wurde dieser Versuch mit IgG-Fab-Fragmenten anstelle kompletten IgE‘s wiederholt.

Die direkte Bindung von *E. coli*-IPSE an das immobilisierte IgG-Fab konnte hier wieder bestätigt werden, aber eine weitere Bindung von biotinyliertem IgG-Fab an das gebundene *E. coli*-IPSE fand nicht statt. Mit den Positivkontrollen (anti-Ig (κ) und Protein L) konnte dagegen deutlich eine Quervernetzung dargestellt werden. Somit zeigt auch dieser Versuch, dass IPSE ein anderes Bindungsverhalten besitzt als ein konventionelles B Zellsuperantigen und auch Immunglobulin-Fragmente nicht quervernetzen kann.

5.3 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von IPSE und Immunglobulin

Falls IPSE Immunglobuline quervernetzt, sollte ein Molekül IPSE zwei oder mehrere Moleküle Immunglobulin binden (Immunglobulin / IPSE = 2:1). Erfolgt die Interaktion ohne Quervernetzung, sollte dagegen jedes Immunglobulin-Molekül ein oder mehrere IPSE-Moleküle binden (Immunglobulin / IPSE = 1:1, 1:2, 1:4,…).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass verschiedene Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Bindungsstöchiometrie führen können, wie das Beispiel von Chapman et al. (1999) zeigt. Stöchiometriebestimmungen der Bindung des Fc-Rezeptor von HSV-1 (gE-gI Heterodimers) an IgG mittels Größenausschlusschromatographie zeigten eine 1:1-Stöchiometrie, obwohl der Rezeptor zwei potentielle Bindungsstellen für IgG besitzt. Spätere weitere Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifugation (Sprague et al., 2004) ergaben dagegen eine 2:1-Stöchiometrie, mit der Bindung von zwei gE-gI-Heterodimeren an ein IgG-Fc, wie auch für IPSE anhand früherer Biacore-Daten (Blindow, 2004; s. auch 1.8) vermutet. Dieses Beispiel zeigt, dass eine exakte Bestimmung der Stöchiometrie schwierig ist und durch mehrere Experimente bestätigt werden sollte.

5.3.1 Sandwich-Blot-Versuche zur Untersuchung der Stöchiometrie – Binden zwei Moleküle IPSE an ein Immunglobulin-Molekül?

Nachdem Sandwich-Blot-Versuche gezeigt haben, dass ein IPSE-Molekül weder zwei komplette Immunglobulin-Moleküle (Schramm, unveröffentlicht) noch zwei Fab-Fragmente binden kann (s. 5.2), sollte mit diesem Verfahren nun der umgekehrte Fall, die Bindung von zwei Molekülen IPSE an ein IgG-Molekül, untersucht werden. Wie bereits erwähnt (s. 1.8), ließen frühere Biacore-Ergebnisse vermuten, dass ein IgG zwei IPSE in Form einer positiv-kooperativen Bindung bindet (Blindow, 2004).

Für die Untersuchung wurde rekombinantes *E. coli*- oder HEK-IPSE auf eine Nitrozellulosemembran gedottet und in einem ersten Inkubationsschritt mit IgG inkubiert. Der zweite Inkubationsschritt erfolgte dann mit biotinyliertem rekombinanten IPSE. Für die Negativkontrolle wurde im ersten Inkubationsschritt lediglich Puffer eingesetzt. Leider zeigte sich bei den Dots ohne IgG (Negativkontrolle) eine ähnliche Signalstärke wie bei den Dots mit IgG, das heißt IPSE zeigte eine so starke Bindung an sich selbst, dass diese vom eigentlichen Bindungssignal nicht unterschieden werden konnte. Dies galt für beide rekombinante IPSE-Präparationen (*E. coli*- und HEK-IPSE). Ob diese Eigenbindung ein Artefakt der rekombinanten Herstellung ist oder ob natürliches IPSE ein ähnliches Verhalten zeigt, ist bislang nicht bekannt, da natürliches IPSE in den benötigten Mengen leider nicht zur Verfügung steht.

5.3.2 Untersuchung der Stöchiometrie sowie Komplexbildung von IPSE und IgG mittels chemischer Quervernetzung

Nachdem der Sandwich-Blot zu keiner Klärung geführt hatte, sollte die Bindung von IgG und *E. coli*-IPSE in Lösung durchgeführt werden und die Stöchiometrie nach anschließender Fixierung der Komplexe durch chemische Quervernetzung ermittelt werden. Mit dieser Methode werden funktionelle Gruppen von Aminosäuren entweder intramolekular innerhalb eines Proteins oder intermolekular zwischen interagierenden Proteinen mittels chemischer Reagenzien kovalent miteinander verknüpft (Schulz und Sinz, 2004; Hermanson, 1996; Wong, 1991). Um *E. coli*-IPSE und IgG chemisch kovalent zu vernetzen, wurde in dieser Arbeit EDC und Sulfo-NHS eingesetzt und nach der Methode von Schulz et al. (2004) vorgegangen (s. 3.8). Hierbei wurde die Bindung von IgG / *E. coli*-IPSE im 1:1-, 1:2- und 1:3-Verhältnis untersucht. Die kovalente Verknüpfung verhindert, dass Komplexe z.B. durch

mechanische oder elektrische Scherkräfte getrennt werden. Das heißt, mögliche Komplexe von IgG und IPSE sollten z. B. bei einem gelelektrophoretischen Lauf erhalten bleiben und als Banden im hohen Molekularbereich sichtbar sein.
Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sprechen sowohl das Fehlen von Banden im höheren Molekularbereich als auch die gleich bleibende Stärke der IgG-Banden gegen eine Quervernetzung beider Moleküle. Die Abschwächung der *E. coli*-IPSE-Banden deutet auf eine Bindung an IgG hin, doch sind in jedem eingesetztem Verhältnis (1:1, 1:2, 1:3) die Dimer-Banden von *E. coli*-IPSE noch deutlich zu erkennen. Ein großer Teil des IPSE liegt also noch ungebunden vor, was darauf hinweist, dass zumindest keine starke Interaktion zwischen IPSE und IgG in Lösung stattgefunden hat.

5.3.3 Untersuchung der Stöchiometrie sowie Komplexbildung von IPSE und IgG bzw. IgE mittels der Größenausschlusschromatographie

Nachdem, im Gegensatz zu den Dot-Blots, durch chemische Quervernetzung keine deutliche Bindung von IPSE an IgG in Lösung nachgewiesen werden konnte, wurde die Komplexbildung zwischen IgG bzw. IgE und IPSE mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie weiter untersucht, wobei Immunglobulin und IPSE vor dem Säulenlauf in verschiedenen Verhältnissen (1:1, 1:4 und 2:1) inkubiert wurden.

5.3.3.1 Bindungsuntersuchung von IgG und HEK-IPSE im Verhältnis 1:1

Überraschenderweise zeigte die Größenausschlusschromatographie im Gegensatz zum Western-Blot (Wodrich, 2006), keine Bindung zwischen HEK-IPSE und IgG. Beide Moleküle kamen komplett getrennt von der Säule. Ebenso zeigten Untersuchungen der Fraktionen des IgG-Peaks in der SDS-PAGE, dass kein HEK-IPSE zusammen mit IgG in diesen Fraktionen enthalten ist. Nachdem aber bekannt ist, dass IPSE und IgG eine Bindung eingehen können, weist dieser Versuch darauf hin, dass diese Bindung in Lösung sehr schwach ist und durch die mechanischen Scherkräfte während des Säulenlaufes wieder gelöst wird. Des Weiteren entsteht während der Chromatographie auch eine signifikante Verdünnung, so dass die Konzentration der Probe immer weiter herabgesetzt wird, wodurch schwache Bindungen wieder dissoziieren können.
Auffällig war, dass während der Inkubation von IgG und HEK-IPSE in Lösung keine sichtbare Präzipitatbildung auftrat, wie sie die Kontrolle mit IgG und Protein L deutlich

zeigte. Protein L besteht aus fünf homologen Ig-bindende Domänen (B1-B5), die mit hoher Affinität an die Leichtkette vom Typ κ aller humanen Immunglobulinklassen binden (Kastern, et al., 1992) und diese quervernetzen. Die maximale Bindung wurde bei pH 7 – 10 gemessen (Akerstrom and Bjorck, 1989), so dass der von uns eingesetzte Puffer mit pH 7,4 im optimalen Bereich lag, was durch die Präzipitatbildung sichtbar gemacht wurde. Das fehlende Auftreten von Komplexen in der Gelchromatographie und die fehlende Bildung von sichtbaren Präzipitaten weisen auf eine schwache Bindungsaffinität zwischen IgG und HEK-IPSE hin.

5.3.3.2 Bindungsuntersuchung von IgE und HEK-IPSE im 1:1-, 1:4- und 2:1-Verhältnis

Die Untersuchung der Komplexbildung von HEK-IPSE mit IgE ergab ein anderes Ergebnis als mit IgG. Hier ist deutlich eine Interaktion zwischen den beiden Molekülen eingetreten. In Anwesenheit von IPSE war im Chromatogramm eine Linksverschiebung des monomeren IgE-Peaks zu beobachten. Diese war im IgE-Überschuss (2:1) sehr gering und nahm mit zunehmender HEK-IPSE-Konzentration (1:1 und 1:4) weiter zu, was darauf hindeutet, dass mehr als ein Molekül IPSE an ein Molekül IgE binden kann. Des Weiteren zeigte das Chromatogramm sowohl beim 2:1- als auch beim 1:1-Verhältnis ein deutliches Abnehmen des HEK-IPSE-Peaks, während beim Verhältnis 1 Teil IPSE + 4 Teile IgE noch ungebundenes HEK-IPSE als Peak sichtbar war. Bei diesem Verhältnis herrscht also offensichtlich ein IPSE-Überschuss, woraus folgt, dass keine vier Moleküle IPSE pro IgE binden können. Auch die Untersuchung der einzelnen Fraktionen in der SDS-PAGE zeigte, dass HEK-IPSE mit IgE interagiert hat. Die Fraktionen des IgE-Peaks wiesen neben IgE auch HEK-IPSE auf. Weiterhin wurde in der SDS-PAGE sichtbar, dass in jedem eingesetzten Verhältnis, also auch bei 2:1 und 1:1, noch ungebundenes HEK-IPSE vorliegt, was auch hier auf eine relativ schwache Bindung zwischen IPSE und IgE hinweist.

Das Proteinprofil der Komplexe aus IgE und Protein L, als Kontrolle, gibt Aufschluss über eine mögliche Linksverschiebung nach der Ausbildung eines großen Komplexes, der durch eine Quervernetzung entsteht. Die leichte Linksverschiebung des IgE-Peaks nach Komplexierung mit IPSE ist jedoch zu gering, um mit einer Quervernetzung von IgE kompatibel zu sein. Außerdem gab es ebenfalls hier, wie schon bei IgG beschrieben, keine Ausbildung von sichtbaren Präzipitaten, wie sie mit Protein L und IgG zu sehen waren (s. 5.3.3.1; s. auch als Beispiel Abbildung 5.1).

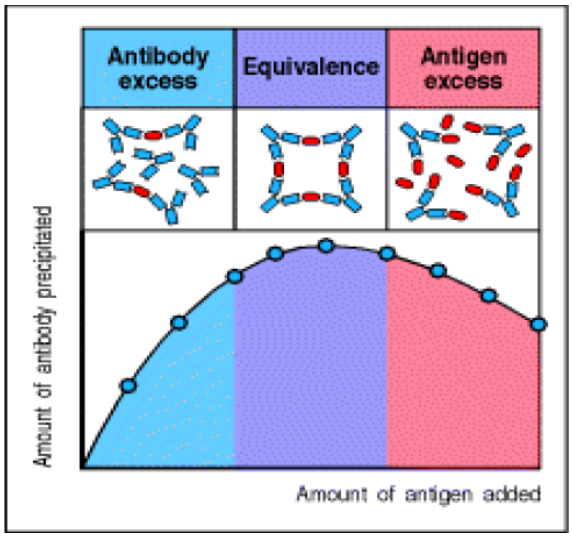


Abbildung 5.1: Präzipitations-Kurve aus Antigen und Antikörper nach Heidelberger [aus 6]. Zu einer fixen Menge Antikörper werden steigende Mengen Antigen zugesetzt und die Menge des resultierenden Präzipitats bestimmt. Als Beispiel dafür gewählt, dass die Größe des Präzipitats abhängig ist vom Verhältnis der Bindungspartner zueinander. Die in der Abbildung dargestellte Präzipitatbildung aus Antikörper und Antigen im Äquivalenzbereich kann bei IgE und IPSE in keinem der untersuchten Mischungsverhältnisse nachgewiesen werden. Daher kann eine Quervernetzung von IgE durch IPSE, wie hier am Beispiel von Antikörper durch Antigen gezeigt, ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte weder mittels chemischer Quervernetzung noch mittels Größenausschlusschromatographie die Ausbildung von großen Komplexen nachgewiesen werden, die auf eine Quervernetzung von Immunglobulin durch IPSE schließen lassen. Somit zeigen diese Experimente zwar eine Bindung von IPSE an Immunglobulin aber keine Quervernetzung und bestätigen daher die Befunde aus Sandwich-Blot-Experimenten (s. 5.2; Schramm, unveröffentlicht), Doppelimmunodiffusions-Experimenten (Blindow, 2004; Wodrich, 2006) und Biacore-Analysen (Blindow, 2004). Darüber hinaus wurde gefunden, dass die Bindung von IPSE an IgG bzw IgE in Lösung relativ schwach ist, mit IgG sogar so schwach, dass sie mit Hilfe der Gelchromatographie nicht nachgewiesen werden kann.
Die exakte Stöchiometrie der Bindung zwischen IPSE und Immunglobulin konnte mit diesen Experimenten noch nicht bestimmt werden. Allerdings weisen die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie darauf hin, dass eine Bindung von mehr als einem aber weniger als vier IPSE-Moleküle pro IgE möglich ist. Dieser Befund passt mit früheren Biacore-Befunden von Blindow (2004) überein, die auf eine Bindung von zwei Molekülen IPSE an ein Molekül Immunglobulin hinweisen (s. auch Einleitung 1.8).

5.4 Bindungsstudien von IPSE und Immunglobulin mit Hilfe affinitätschromatographischer Methoden

Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Bindungsstöchiometrie sowie Komplexbildung von IPSE und IgG bzw. IgE zeigten, dass die Bindung schwach ist, wenn beide Partner in Lösung vorliegen, wobei die Bindungsaffinität zu IgE höher ist als zu IgG. Da IPSE Basophile durch Bindung an Rezeptor-ständiges, d.h. gebundenes IgE aktiviert wurde untersucht, ob die Bindungsstärke zwischen IPSE und Immunglobulin variiert, wenn einer der beiden Bindungspartner immobilisiert ist. Dazu wurde die Bindung zwischen IPSE und Immunglobulin mittels affinitätschromatographischer Methoden weiter untersucht. Hierbei wurden IgG oder IPSE an eine feste Phase gekoppelt und die Bindung des jeweils anderen Moleküls in Lösung untersucht.

5.4.1 Interaktion zwischen löslichem HEK-IPSE und immobilisiertem IgG

Um die Bindung von HEK-IPSE an immobilisiertes IgG zu untersuchen, wurde IgG an Protein G gebunden, welches über NHS-Gruppen an Agarose gekoppelt vorlag (Amersham Biosciences). Protein G ist ein Fc-Rezeptor vom Typ III aus Bakterien der Gattung *Streptococcus*, welches entweder auf der Oberfläche der Bakterienzellwand oder in sekretierter Form vorliegt. Protein G bindet an alle humanen IgG-Subklassen und zwar sowohl an die Fab-Region als auch an die Fc-Region. Erntell et al. (1988) zeigten, dass Protein G zwei unabhängige und separate Bindungsstellen für IgG-Fc und Fab besitzt. Die Immunglobulin-bindung durch Protein G wird in der Forschung hauptsächlich zur Reinigung von IgG genutzt.

Es zeigte sich, dass nur ein sehr kleiner Teil des HEK-IPSE an das immobilisierte IgG bindet. Der größte Teil von HEK-IPSE befand sich im Effluent und lag daher ungebunden vor. Durch einen Kontrolllauf wurde ausgeschlossen, dass HEK-IPSE unspezifisch an Protein-G-Sepharose bindet, die vorher nicht mit IgG beschickt worden war. Somit bindet HEK-IPSE an immobilisiertes IgG, aber auch hier ist die Bindung nur sehr schwach. Das heißt, dass durch die Immobilisierung von IgG an Protein G, die Bindungsstärke zwischen IPSE und IgG nicht erhöht wurde.

5.4.2 Interaktion zwischen löslichem IgG/IgE und immobilisiertem IPSE.

Analoge Ergebnisse fanden sich auch im umgekehrten Falle, d.h. wenn IPSE immobilisiert wurde und IgG in Lösung vorlag. Es wurden hier zwei Methoden angewendet. Bei der ersten Methode wurde HEK-IPSE über NHS-Gruppen kovalent an Sepharose gebunden. Dabei war eine eventuelle Maskierung der IgG-Bindungsstellen auf dem IPSE-Molekül nicht auszuschließen. Bei der zweiten Methode wurde rekombinantes IPSE über den vorhandenen His-Tag an Ni-NTA-Agarose gebunden. Durch die Bindung über den His-Tag, sollte vermieden werden, dass Bindungsstellen für das Immunglobulin verdeckt vorliegen. Doch auch hierbei zeigte sich keine erhöhte Bindungsaffinität, gleichgültig ob IPSE zuerst an Ni-NTA-Agarose gebunden wurde und dann IgG oder IgE äquimolar in gelöster Form zugegeben wurden oder ob IPSE und IgG vor der Bindung an Ni-NTA in einem 2:1-Verhältnis in Lösung vorinkubiert wurden. Ergänzend wurden die Versuche sowohl mit HEK-IPSE (C-terminaler His-Tag) als auch mit E. coli-IPSE (N-terminaler His-Tag) durchgeführt, um eine sterische Behinderung der Immunglobulinbindung für den Fall auszuschließen, dass sich die Bindungsstellen im Bereich des N-oder C-terminus von IPSE befinden. Aber auch dies resultierte nicht in höherer Bindungsaffinität.

Zusammengefasst zeigen auch diese Bindungsversuche von IPSE an Immunglobulin mittels affinitätschromatischer Methoden eine schwache Bindung zwischen beiden Molekülen, unabhängig davon welcher der beiden Bindungspartner immobilisiert und welcher in Lösung war.

5.5 Rekombinante IPSE-Moleküle

Natürliches IPSE liegt im SmEA in nur sehr geringen Konzentrationen vor. Für die Untersuchungen des Wirkungsmechanismus von IPSE werden aber häufig höhere Proteinkonzentrationen bzw. mehr Material benötigt. Aus diesem Grund wurde IPSE rekombinant sowohl in *E. coli*- als auch in humanen 293 HEK-Zellen hergestellt. Da *E. coli*-IPSE in einem bakteriellen Expressionssystem exprimiert wird, liegt es unglykosyliert vor und kann aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nur bis zu einer Konzentration von 0,15 mg/ml konzentriert werden. Eukaryotische Expressionssysteme, wie HEK-Zellen, sind dagegen in der Lage posttranslationale Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen durchzuführen (Fernandez and Hoeffler, 1999). HEK-IPSE liegt in der SDS-PAGE als Dimer in vier unterschiedlichen Glykosylierungsformen vor (Wodrich, 2006). Glykosyliertes HEK-IPSE ist gut löslich im Gegensatz zum nicht-glykosyliertem *E. coli*-IPSE und kann bis zu 20 mg/ml konzentriert werden. Natürliches IPSE ist ebenfalls glykosyliert. Seine Glykostruktur wurde von Wuhrer et al. (2006) massenspektroskopisch aufgeklärt. Für die Wirkung von IPSE auf Basophile spielt die Glykosylierung keine Rolle, da auch nicht-glykosyliertes *E. coli*-IPSE funktionell aktiv ist. Wodrich (2006) zeigte in ihrer Arbeit, dass sich rekombinantes und natürliches IPSE hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Basophilenaktivierung weitgehend gleichen und die rekombinanten IPSE-Moleküle voll funktionstüchtig und daher mit großer Wahrscheinlichkeit korrekt gefaltet vorliegen und.

5.5.1 *E. coli*-IPSE und HEK-IPSE neigen zur Selbstaggregation

Die Sandwich-Blot-Versuche (s. 5.3.1) zeigten deutlich, dass sowohl *E. coli*-IPSE als auch HEK-IPSE die Tendenz zur Eigenaggregation besitzen. Offensichtlich wird durch die Glykosylierung die Tendenz zur Autoaggregation nicht aufgehoben. Weiterhin konnte auch bei der chemischen Quervernetzung zur Analyse der Bindungsstöchiometrie von *E. coli*-IPSE und IgG eine Selbstaggregation von *E. coli*-IPSE beobachtet werden. Hierbei wurde zur Kontrolle *E. coli*-IPSE alleine, ohne IgG, mit den chemischen Reagenzien (EDC und Sulfo-NHS) versetzt. Dabei waren in der SDS-PAGE neben der Dimer-Bande von *E. coli*-IPSE auch Banden im höheren Molekularbereich bei ca. 60 kDa und 70 kDa sowie bei ca. 150 kDa sichtbar. Die Banden in der Höhe von 60-70 kDa könnten die Bildung von Tetrameren darstellen. Sie besitzen ungefähr das doppelte Molekulargewicht des Dimers, welches für *E.*

coli-IPSE bei 32 kDa liegt. Die 150 kDa Bande ist nur bei der höchsten Konzentration (30 µM) des eingesetzten *E. coli*-IPSE sichtbar und könnte oktameres IPSE darstellen. Da HEK-IPSE ebenfalls die Eigenschaft besitzt unspezifisch an sich selber zu binden, wurde die Selbstaggregation von HEK-IPSE ebenfalls mittels chemischer Quervernetzung untersucht, wobei hier neben der Dimer-Bande ebenfalls eine zusätzliche Bande bei knapp über 66 kDa auftrat. Diese Bande könnte tetrameres HEK-IPSE darstellen, da sie mit 66 kDa ca. das doppelte Molekulargewicht des Dimers aufweist, welches für HEK-IPSE bei 34 – 39 kDa liegt. In der analytischen Ultrazentrifugation, die ebenfalls zur Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von IPSE und Immunglobulin im Labor von B. Sutton (King's College London) durchgeführt wurde, zeigte sich, dass HEK-IPSE möglicherweise als Tetramer vorliegt (persönliche Mitteilung, R. Beavil), was mit den Ergebnissen der chemischen Quervernetzung übereinstimmt.

Dies veranlasste uns, die Selbstaggregation von HEK-IPSE zusätzlich in Lösung mittels dynamischer Lichtstreuung weiter zu untersuchen. Es zeigte sich, dass HEK-IPSE in Lösung hauptsächlich komplexiert vorliegt und in der Lage ist, große Komplexe mit einem Radius bis zu 100 nm zu bilden, die abzentrifugiert werden können. Die zentrifugierte HEK-IPSE Probe sowie die nicht-zentrifugierte Probe, die noch große Komplexe aufweist, wurden hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Fähigkeit, die Freisetzung von IL-4 aus Basophilen zu induzieren, untersucht, wobei beide Proben eine sehr ähnliche funktionelle Aktivität auf den Basophilen aufweisen. Dieser Befund deutet zunächst darauf hin, dass die großen Komplexe von HEK-IPSE für eine Aktivierung der Basophilen nicht notwendig sind. Es ist hierbei aber nicht auszuschließen, dass nach Abzentrifugation der großen Komplexe sich nach einiger Zeit erneut IPSE-Komplexe gebildet haben.

Die Beobachtung, dass komplexiertes HEK- bzw. *E. coli*-IPSE nur nach Einführung kovalenter Bindungen oder mittels dynamischer Lichtstreuung dargestellt werden konnte, während in der Größenausschlusschromatographie und in der SDS-PAGE jeweils nur das Dimer nachweisbar war, weist deutlich daraufhin, dass es sich hier um schwache reversible Bindungen handelt, die schon durch geringe mechanische und elektrische Scherkräfte wieder gelöst werden können.

Nichtsdestotrotz liegen die rekombinanten IPSE-Moleküle in Lösung komplexiert vor, so dass sich die Frage stellt, ob natürliches IPSE ebenfalls in komplexierter Form vorliegt oder ob dieses Phänomen nur auf die rekombinanten Moleküle begrenzt ist. Aufgrund der geringen Mengen des uns zur Verfügung stehenden natürlichen IPSE war eine Prüfung dieser Frage leider nicht möglich.

5.6 IPSE – ein unkonventionelles B-Zellsuperantigen?

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser und vorangegangener Arbeiten sagen, dass IPSE wie ein „klassisches“ B-Zellsuperantigen basophile Granulozyten IgE-vermittelt über die Bindung an Fab- und Fc-Fragmente aktiviert. Im Gegensatz dazu ist es aber nicht in der Lage, lösliche oder immobilisierte Immunglobuline querzuvernetzen.

Ein Grund dafür könnte sein, dass die Bindungsaffinität von IPSE an lösliches oder an Matrix-immobilisiertes Immunglobulin zu gering ist, um eine Quervernetzung oder die Ausbildung größerer Präzipitate hervorzurufen. Dafür sprechen die Ergebnisse, dass zwar eine Bindung von IPSE an Immunglobulin in Western- und Dot Blots nachgewiesen werden kann, demgegenüber aber keine Reaktivität in Sandwich-Blots, Doppelimmunodiffusions-Gelen oder affinitätschromatographisch zu beobachten ist. Ein Befund, der für niedrig-affine, nicht-präzipitierende Antikörper typisch ist. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie sprechen ebenfalls in diese Richtung, wobei die Affinität zu IgG sogar noch geringer ist als zu IgE. Es stellt sich daher die Frage: Wie kann ein Molekül mit so geringer Bindungsaffinität Basophile aktivieren? Eine denkbare Erklärung läge in der besonderen Konformation, die IgE nach Bindung an den FcεRI-Rezeptor einnimmt.

Untersuchungen der Kristallstruktur der konstanten Region von IgE (IgE-Fc) (Wan et al., 2002) zeigten, dass die Struktur in der Cε2-Cε3 „linker“-Region asymmetrisch stark gekrümmt vorliegt (s. Abbildung 5.2 b1). Die Bindung von IgE an diesen Rezeptor erfolgt durch Interaktion der Cε3-Domäne des IgE-Moleküls mit der α-Kette des FcεRI. Die N-terminale Region des IgE-Moleküls bindet an die zweite Domäne der α-Kette des Rezeptors wobei eine Konformationsänderung eintritt und die Cε2-Domäne sich von der Cε3-Dömäne entfernt und das IgE etwas aufklappt (Sutton and Gould, 1993; Wan et al., 2002) (s. Abbildung 5.2 b). Diese Konformationsänderung von IgE ist verantwortlich für eine langsame Dissoziationsrate des IgE-FcεRI-Komplexes und für die Fähigkeit einer beständigen Zellaktivierung (Mastzellen und Basophile) und Aufrechterhaltung der Allergiesymptome (McDonnell et al., 2001; Wan et al., 2002).

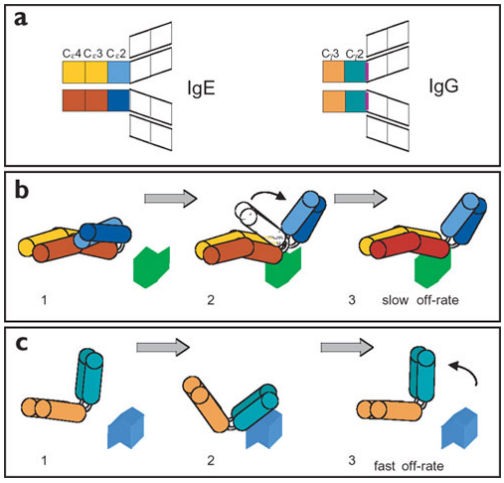


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der strukturellen Unterschiede zwischen IgE und IgG und die Interaktion mit ihrem spezifischen Rezeptor (übernommen aus Novak und Bieber 2002). a) Struktureller Vergleich der Fab- und Fc-Regionen von IgE und IgG: Die Fc-Region von IgE enthält eine zusätzliche Cε2-Domäne, die den Platz der *hinge Region* von IgG an der Cγ2-Domäne (gekennzeichnet in lila) einnimmt. b) Monomeres IgE, welches in der konstanten Region (Cε2-Cε3) stark gekrümmt vorliegt (1) bindet an FcεRI (in grün), wobei eine Konformationsänderung des IgE's erfolgt (Cε2 entfernt sich von Cε3 und IgE klappt etwas auf) (2), die verantwortlich für eine langsame Dissoziationsrate ist (3). c) Bindung von monomeren IgG (1) an den hoch-affinen Rezeptor FcγRI (blau) (2), ohne Konformationsänderung und mit schneller Dissoziationsrate (3).

Es wäre also vorstellbar, dass IPSE mit ausreichend hoher Affinität nur mit FcεRI-gebundenem IgE auf der Zelloberfläche interagiert, was letztendlich zur Aktivierung der Zelle führt. Ein solcher Mechanismus wäre auch biologisch sinnvoll, da IPSE bei einer starken Bindung an alle löslichen Immunglobuline einschließlich IgG, das im Körper in großen Mengen vorhanden ist, nach Sekretion aus den Schistosomen-Eiern schnell weggefangen und damit neutralisiert würde.

Ob die Interaktion von IPSE mit FcεRI-gebundenem IgE auf der Oberfläche der Basophilen möglicherweise dann doch zu einer Quervernetzung führt, müssen zukünftige Experimente z.B. mittels konfokaler Lasermikroskopie zeigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die auch mit Befunden aus Biacore-Analysen von Blindow (2004) übereinstimmen, sprechen jedoch gegen eine Quervernetzung. Die exakte Bindungsstöchiometrie von IPSE und IgE konnte zwar nicht bestimmt werden, doch lassen die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie darauf schließen, dass zwei bis drei Moleküle IPSE durch ein IgE-Molekül gebunden werden und nicht umgekehrt, mehrere IgE-Moleküle durch ein einzelnes IPSE-Molekül wie es bei einer

IgE-Quervernetzung der Fall wäre. Da sich der Mechanismus der Interaktion von IPSE mit IgE eindeutig von dem der „klassischen“ B-Zellsuperantigene unterscheidet, auch wenn es Basophile IgE-vermittelt aktiviert, könnte man IPSE als ein „unkonventionelles“ B-Zellsuperantigen bezeichnen.

6 Literatur

6.1 Literaturquellen

Aberg N, Hesselmar B, Aberg B and Eriksson B (1995). Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy.* 25: 815-819

Akerstrom B and Bjorck L (1998). Protein L: an immunoglobulin light chain-binding bacterial protein. Characterization of binding and physicochemical properties. *J Biol Chem.* 264(33): 19740-19746

Asai K, Kitaura J, Kawakami Y, Yamagata N, Tsai M, Carbone DP, Liu FT, Galli SJ and Kawakami T (2001). Regulation of mast cells survival by IgE. *Immunity.* 14: 791-800

Ashton PD, Harrop R, Shah B and Wilson RA (2001). The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology.* 122(Pt 3): 329-338

Banchereau J and Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 245-252

Blindow S (2004). Untersuchung des Mechanismus der IL-4-Freisetzung aus humanen Basophilen durch einen Immunglobulin-bindenden Faktor aus *Schistosoma mansoni*-Eiern (IPSE). Dissertation, Universität zu Lübeck

Borkowski TA, Jouvin MH, Lin SY and Kinet JP (2001). Minimal requirements for IgE-mediated regulation of surface FcεRI. *J Immunol.* 167: 1290-1296

Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA and Pearce EJ (1997). IL-4 protects against TNF-α-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol.* 159: 777-785

Brunner T, Heusser CH and Dahinden CA (1993). Human peripheral blood basophils primed by Interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med.* 177: 605-611

Chabasse D, Bertrand G, Leroux JP, Gauthey N and Hocquet P (1985). Developmental bilharziasis caused by *Schistosoma mansoni* discovered 37 years after infestation. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 78(5): 643-647

Chapman TL, You I, Joseph IM, Bjorkman PJ, Morrison SL and Raghavan M (1999). Characterization of the interaction between the herpes simplex virus type I Fc receptor and immunoglobulin G. *J Biol Chem.* 274: 6911-6919

Charles N, Monteiro R and Benhamou M (2004). p28, a novel IgE receptor-associated protein, is a sensor of receptor occupation by its ligand in mast cells. *J Biol Chem.* 279(13): 12312-12318

Chatelain R, Varkila K and Coffman RL (1992). IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. *J Immunol.* 148: 1182-1187

Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW and Wynn TA (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type-2 dominated inflammatory response. *J Clin Inves.* 104: 777-785

Coombs RRA and Gell PGH (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. *In:* "Clinical aspects of immunology". 2. Auflage. Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A. (eds.). Blackwell. Oxford, UK

Damian RT (1997). Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology.* 115 Suppl: S169-175

Deisenhofer J (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry.* 20(9): 2361-2370

Devouassoux G, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD and Prussein C (1999). Frequency and characterization of antigen-specific IL-4- and IL-13- producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 104(4 Pt 1): 811-9

Dunne DW, Jones FM and Doenhoff MJ (1991). The purification, characterization, serological activity and hepatoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha-1 und omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology.* 103 Pt2: 225-236

Ehrlich P (1879). Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leucozyten. *Arch Anat. Physiol.* 166-169

Erntell M, Myhre EB, Sjobring U and Bjorck L (1988). Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragments of human IgG. *Mol Immunol.* 25(2): 121-126

Falcone FH, Dahinden CA, Gibbs BF, Noll T, Amon U, Hebestreit H, Abrahamsen O, Klaucke J, Schlaak M and Haas H (1996). Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *schistosoma mansoni* egg antigen. *Eur J Immunol.* 26(5): 1147-1155

Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ and MCKenzie AN (2000). Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol.* 164: 2585-2591

Fernandez JM and Hoeffler JP (eds.) (1999). Gene expression systems. Using nature for the art of expression. Aceademic Press, San Diego

Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF jr. and Sher A (1991). Regulation and biological function oh helminth-induced cytokine responses. *In:* Ash C, Gallagher RB (eds.) Immunoparasitology today (Elsevier Trends Journals). Elsevier.Cambridge. pp 62-66

Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE and Glasebrook AL (1989). A new murine CD^{4+} cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol.* 143: 518-525

Florio G, Petraroli A, Patella V, Triggiani M and Marone G (2000). The immunoglobulin superantigen-binding site of HIV-1 gp 120 activates human basophils. *AIDS.* 14: 931-938

Forgereau M and Edelman GM (1964). Resemblance of the gross arrangement of polypeptide chains in reconstituted and native γ-globulins. *Biochemistry.* 3: 1120-1126

Garman SC, Sechi S, Kinet JP and Jardetzky TS (2001). The analysis of the human high affinity IgE receptor FcεRIα from multiple crystal forms. *J Mol Biol.* 311(5): 1049-1062

Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, et al. (1993). Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature.* 365: 340-343

Genovese A, Bouvet JP, Florio G, Lammparter-Schummert B, Björck L and Marone G (2000). Bacterial immunoglobulin superantigen proteins A and L activate human heart mast cells by interacting with immunoglobulin E. *Infect Immun.* 68(10): 5517-5524

Genovese A, Guglielmo B, Björck L, Petraroli A, de Paulis A, Piazza M and Marone G (2003). Immunoglobulin superantigen Protein L induces IL-4 and IL-13 Secretion from human $Fc\varepsilon RI^{+}$ cells through interaction with the κ light chains of IgE. *J Immunol.* 170: 1854-1861

Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, Albrecht C, Vollrath IB, Noll T, Wolff HH and Amon U (1996). Purified human peripheral blood basophiles release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol.* 26: 2493-2498

Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F and Sher A (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 146: 1322-1327

Haas H, Falcone FH, Schramm G, Haisch K, Gibbs BF, Klaucke J, Pöppelmann M, Becker WM, Gabius HJ and Schlaak M (1999). Dietary lectins can induce *in vitro* release of IL-4 and IL-13 from human basophils. *Eur J Immunol.* 29: 918-927

Haisch K, Gibbs BF, Körber H, Ernst M, Grage-Griebenow E, Schlaak M and Haas H (1999). Purification of morphologically and functionally intact human basophils to near homogeneity. *J Immunol Methods.* 226: 129-137

Haisch K, Schramm G, Falcone FH, Alexander C, Schlaak M and Haas H (2001). A glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs binds non-antigen-specific immunoglobulin E and releases interleukin-4 from human basophils. *Parasite Immunology.* 23: 427-434

Hermanson GT (1996). Bioconjugate Techinques. Academic Press Inc. SanDiego

Heukeshoven J and Dernick R (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulphate gels. *Electrophoresis.* 9(1): 28-32

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A and Murphy KM (1993). Development of T_H1 $CD4^+$ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.* 260: 547-549

Hunkapiller T and Hood L (1986). The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature.* 323: 15-16

Inganäs M (1981). Comparison of mechanism of interaction between protein A from *Staphylococcus aureus* and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical Fcγ and the alternative $F(ab')_{2\varepsilon}$ protein A interactions. *Scand. J. Immunol.* 13: 343-352

Janeway CA, Travers P, Walport M and Shlomchik M (2001). Immunobiology. The immune system in health and diseases. 5th edition. Garland Publishing, Taylor & Francis Group. New York

Kagey-Sobotka A, Dembo M, Goldstein B, Metzger H and Lichtenstein LM (1981). Qualitative characteristics of histamine release from human basophils by covalently cross-linked IgE. *J Immunol.* 127(6): 2285-2291

Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen JE, Zhang J, Siraganian RP and Krystal G (2001). Monomeric IgE stimulates signalling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity.* 14: 801-811

Kastern W, Sjörbring U and Björck L (1992). Structure of peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain. *J Biol. Chem.* 267: 12820-12825

Kawakami T and Galli SJ (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology.* 2: 773-786

Kelso A (1995). Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today.* 16(8): 374-379

Kepley CL, Cambier JC, Morel PA, Lujan D, Ortega E, Wilson BS and Olivier JM (2000). Negative regulation of FcγRII costimulation in human blood basophils. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 337-348

Kinet JP (1999). The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17: 931-72

KleinJan A, McEuen AR, Dijkstra MD, Buckley MG, Walls AF and Fokkens WJ (2000). Basophil and eosinophil accumulation and mast cell degranulation in the nasal mucosa of patients with hay fever after local allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 677-86

Koolman J und Röhm KH (2003). Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage. Thieme Verlag

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-685

Lawrence RA, Allen JE, Osborne J and Maizels RM (1994). Adult und microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice. *J Immunol.* 153: 1261-1224

Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ et al. (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and non atopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol.* 105: 99-107

MacGlashan jr. D, McKenzie-White J, Chichester K, Bochner BS, Davies FM, Schroeder JT and Lichtenstein LM (1998). In vitro regulation of FcεRIα expression on human basophils by IgE antibody. *Blood.* 91(5): 1633-1643

Maizels RM and Holland MJ (1998). Parasite immunology: Pathways for expelling intestinal helminth. *Curr Biol.* 8(20): R711-714

Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF and Anderson RM (1993). Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature.* 365(6449): 797-805

Manetti R, Barak V, Piccini MP, Sampognaro P, Maggi E, Dinarello CA and Romagnani S (1994). Interleukin-1 favours the in vitro development of type 2 T helper (Th2) human T-cell clones. *Res Immunol.* 145: 93-100

McDonnell JM, Calvert R, Beavil RL, Beavil AJ, Sutton BJ, Gould HJ and Cowburn D (2001). The structure of the IgE Cε2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity rezeptor FcεRI. *Nature Struct. Biol.* 8: 437-441

Metzger H (1992). Transmembrane signalling: the joy of aggregation. *J Immunol.* 149(5): 1477-1487

Mills KH (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 4(11): 841-855

Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, Urban JF jr., Dovorak AM, Finkelman FD, LeGros G and Paul WE (2004). Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after Infection with Th2-inducing Parasite. *J Exp Med.* 200(4): 507-517

Mitre E, Taylor RT, Kubofcik J and Nutman TB (2004). Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections. *J Immunol.* 172(4): 2439-2445

Mosman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136(7): 2348-2357

Ninan TK and Russel G (1992). Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ.* 304: 873-875

Nouri-Aria KT, Irani AM, Jacobsen MR, O'brien F, Varga EM, Till SJ, Durham SR und Schwartz LB (2001). Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 108: 205-11

Olins DE and Edelman GM (1964). Reconstitution of 7S molecules from L and H polypeptide chains of antibodies and γ-globulins. *J Exp Med.* 119: 789

Patella V, Giuliano A, Florio G, Bouvet JP and Marone G (1999). Endogenous superallergen Protein Fv interacts with the V_H3 region of IgE to induce cytokine secretion from human basophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 118: 197-199

Paul WE and Seder RA (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 76: 241-251

Pearce EJ and Sher A (1987). Mechanism of immune evasion in schistosmiasis. *Contrib Microbiol Immunol.* 8: 219-232

Pearce EJ and MacDonald (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* 2(7): 499-511

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA and Sher A (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th1 cytokine responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni. J Exp Med.* 173: 159-166

Pernis A, Gupta S, Gollop KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C and Rothman P (1995). Lack of interferon gamma receptor β chain and the prevention of interferon gamma signalling in TH1 cells. *Science.* 269: 245-247

Porter RR (1972). Structural studies of immunoglobulins. *Nobel Lekture.* 58-67

Prakash S and Wyler DJ (1992). Fibroblast stimulation in schistosomiasis. XII. Identification of CD4+ lymphocytes within schistosomal egg granulomas as a source of apparently novel fibroblast growth factor (FsF-1). *J Immunol.* 148(11): 3583-3587

Pritchard DI (1993). Immunity to helminth: is too much IgE parasite- rather than host-protective? *Parasite Immunol.* 15: 5-9

Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie ANJ, Menon S, Zurawski G, De Waal Malefyt R and De Vries, JE (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90: 3730-3734

Ravetch J and Bolland S (2001). IgG Fc-receptors. *Annu Rev Immunol.* 19: 275-90

Ring J, Kramer U, Schäfer T and Behrendt H (2001). Why are allergies increasing? *Curr. Opin. Immunol.* 13: 701-708

Roholt OA, Onoue K and Pressman D (1964). Specific combination of H and L chains of rabbit γ-globulins. *Proc Nat Acad Sci.* 51: 173

Romagnani S (1990). Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol.* Today 11: 316-321

Romagnani S (1991). Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today.* 12(8): 256-257

Romagnani S, Grazia Giudizi M, del Prete G, Maggi E, Biagiotti F, Almerigogna F and Ricci M (1982). Demonstration on protein A of two distinct immunoglobulin-binding sites and their role in the mitogenic activity of *Staphylococcus aureus* Cowan I on human B cells. *J. Immunol.* 129(2): 596-602

Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS and Locksley RM (1990). Cure of murine Leishmaniasis with anti-interleukin-4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon γ-independent mechanism. *J Exp Med.* 171: 115-127

Sadler CH, Rutitzky, Stadecker MJ and Wilson RA (2003). IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni. Eur J Immunol.* 33: 880-888

Schramm G, Falcone FH, Gronow A, Haisch K, Mamat U, Doenhoff MJ, Oliveira G, Galle J, Dahinden CA and Haas H (2003). Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *J Biol Chem.* 278(20): 18384-18392

Schramm G, Gronow A, Knobloch J, Wippersteg V, Grevelding CG, Galle J, Fuller H, Stanley RG, Chiodini PL, Haas H and Doenhoff MJ (2006). IPSE/alpha-1: A major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol.* 147: 9-19

Sprague ER, Martin WL and Bjorkman PJ (2004). pH-dependence and stoichiometry of binding to the Fc region of IgG by the herpes simplex virus Fc receptor gE-gI. *J Biol Chem.* 279: 14184-14193

Schulz DM, Ihling C, Clore M and Sinz A (2004). Mapping the topology and determination of a low-resolution three-dimensional structure of the Calmodulin-Mellitin complex by chemical cross-linking and high-resolution FTICRMS: Direct demonstration of multiple binding modes. *Biochemistry.* 43: 4703-4715

Schulz DM und Sinz A (2004). Chemisches Cross-linking und Massenspektrometrie zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Proteinen. BIOSpektrum. 10: 45-48

Sears MR (1997). Epidemiology of childhood asthma. *Lancet.* 350: 1015-1020

Sher A and Coffman RI (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol.* 10: 385-409

Sher A, Wynn TA and Sacks DL (2003). The immune response to parasites. *In:* Paul WE (ed.) Fundamental Immunology. Williams & Wilkins. Philadelphia. Lippincott

Smith P, Fallon RE, Mangan NE, Walsh CM, Saraiva M, Sayers JR, McKenzie ANJ, Alcami A and Fallon PG (2005). *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med.* 202(10): 1319-1325

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1): 76-85

Stryer L (1996). Biochemie. 4. Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag

Sutton BJ and Gould HJ (1993). The human IgE network. *Nature* 366: 421-428

van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD and Engels D (2003). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* 86(2-3): 125-139

Wan T, Beavil RL, Fabiane SM, Beavil AJ, Sohi MK, Keown M, Young RJ, Henry AJ, Owens RJ, Gould HJ and Sutton BJ (2002). The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Immunol Nature.* 3(7): 681-686

Williams ME, Montenegro S, Domingues AL, Wynn TA, Teixeira K, Mahanty S, Countinho A and Sher A (1994). Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to moitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. *J Infect Dis.* 170: 946-954

Williams DL, Asahi H, Oke TT, Lopes da Rosa J and Stadecker MJ (2005). Murine immune response to a novel schistosome egg antigen, SmEP25. *Int J Parasitol.* 35(8): 875-882

Wodrich M (2006). Rekombinante Expression des IL-4 induzierenden Schistosomen-Ei-Proteins IPSE zur Untersuchung eines neuartigen Mechanismus der Basophilenaktivierung. Dissertation, Universität zu Lübeck.

Wong SS (1991). Chemistry of protein conjugation and crosslinking. CRC Press Inc. Boca Raton

Wuhrer M, Balog CIA, Catalina MI, Jones FM, Schramm G, Haas H, Doenhoff MJ, Dunne DW, Deelder AM and Hokke CH (2006). IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *FEBS Journal.* 273: 2276-2292

6.2 Internetseiten

[1] fleshandbones – Antikörper
http://www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/291.pdf
(Stand 1. Juli 07)

[2] Wikipedia – Eier von *S. mansoni*
http://de.wikipedia.org/wiki/P%C3%A4rchenegel
(Stand 1. Juli 07)

[3] Schweizerisches Tropeninstitut – adultes Pärchen von *S. mansoni*
http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/seiten/schistosoma/steckbrief_schisto.html
(Stand 1. Juli 07)

[4] Expasy – ProtParam
http://www.expasy.org/tools/protparam.html
(Stand 1. Juli 07)

[5] Pierce Biotechnology – chemische Quervernetzung
http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=02030312
(Stand 1. Juli 07)

[6] Immunpräzipitation
http://www.crossnote.de/seminare/immun.pdf
(Stand 1. Juli 07)

7 Eigene Vorträge

1. Vortrag und Abstract auf der „29. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen“, Forschungszentrum Borstel; 17. November 2006:

   A. Mewes, G. Schramm, S. Blindow, T Weimar, A. Gronow, M. Wodrich, B. Lindner, B.F. Gibbs, M.J. Doenhoff and H. Haas: IPSE/alpha-1, a secretory protein from *S. mansoni* eggs, activates basophils to release IL-4 by binding to but not cross-linking of IgE.

2. Vortrag und Abstract auf der Tagung „19. Mainzer Allergie-Workshop“, Mainz; 16.-17. März 2007:

   A. Mewes, G. Schramm, S. Blindow, T Weimar, A. Gronow, M. Wodrich, B. Lindner, B.F. Gibbs, M.J. Doenhoff and H. Haas: IPSE/alpha-1, a secretory protein from *S. mansoni* eggs, activates basophils to release IL-4 by binding to but not cross-linking of IgE.

8 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Helmut Haas für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für die Diskussionsbereitschaft und umfassende Unterstützung, sowie das Ermöglichen der Teilnahme an Kongressen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Gabriele Schramm für die erstklassige Betreuung und Hilfsbereitschaft, die Korrektur dieser Arbeit und für ihre freundliche Atmosphäre, die sie verbreitet.

Herrn Achim Gronow danke ich für die Einführung in die Basophilenaufreinigung und für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei vielen kleinen Dingen im Laboralltag.

Bei Herrn PD Dr. Jürgen van der Bosch bedanke ich mich für die vielen Ratschläge und für die Disskusionsbereitschaft.

Ich danke Herrn PD Dr. Buko Lindner für den Einsatz als Mentor und für seine großzügige Hilfsbereitschaft.

Bei den Mitarbeitern der LG Molekulare und klinische Allergologie, insbesondere bei Daniela Warnecke und Marisa Böttger, bedanke ich mich für die vielen kleinen Hilfestellungen.

Herrn Dr. J.R. Mesters aus dem Institut für Biochemie an der Universität zu Lübeck danke ich für die Durchführung der DLS-Messungen.

Bei Frau Renate Bergmann bedanke ich mich für die Organisation der freiwilligen Blutspender.

Ich danke allen Blutspendern für ihre unkomplizierte Spontaneität und natürlich für ihr Blut.

Bei allen übrigen Mitarbeitern der LG Zelluläre Allergologie, allen Doktoranden, Auszubildenden, Bachelorstudenten, Diplomanden und Gastwissenschaftlern möchte ich mich für die fröhliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Karo und Ulrike, Euch danke ich, dass ihr mir schon während des Studiums immer zur Seite gestanden habt. Besonders danke ich Euch für die moralische Unterstützung und die vielen aufmunternden Gespräche.

Ganz großer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Marcel, der immer für mich da ist und mir in allen Lebenslagen zur Seite steht.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname	Mewes
Vorname	Astrid
Wohnort	Milchgrund 84 21075 Hamburg
Geburtsdatum / -ort	22.03.1979 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig

Bildungsweg

Promotion

2004-2007	Promotion am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe „Zelluläre Allergologie“ unter der Leitung von PD Dr. H. Haas.

Studium

1998-2004	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Abschluss: Diplombiologin

Schule

1989-1998	Besuch des Gymnasiums Finkenwerder, Hamburg Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
1984-1989	Vor- und Grundschule Westerschule, Hamburg

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit in Inhalt und Form selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Ich habe mich noch keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, September 2007

.....
Astrid Mewes