

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Prof. Dr. Rolf Felix Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

**Das IgE-Repertoire
von Kindern und Jugendlichen
mit allergischem Asthma bronchiale**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Benjamin Strücker
aus Bad Oeynhausen

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg
am: 20.12.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Rolf F. Maier

1. Korreferent: PD Dr. Holger Garn

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / <i>Abstract</i>	6
2. Einleitung	9
2.1 Allergisches Asthma bronchiale.....	9
2.1.1 Definition und Hinführung zum Thema	9
2.1.2 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	10
2.2 Anatomie des IgE	14
2.2.1 Genereller Aufbau eines Immunglobulinmoleküls.....	14
2.2.2 Mikroanatomie der variablen Region	16
2.2.3 Strukturelle Besonderheiten des IgE	18
2.3 Reifung der IgE-Antwort.....	18
2.3.1 Klassische Antigen-abhängige Immunantwort vom B2-Typ	19
2.3.2 Superantigen-ähnliche Aktivierung.....	20
2.3.3 Polyklonale Immunreaktion vom B1-Typ.....	21
2.4 Fragestellung	23
3. Material und Methoden	26
3.1 Arbeitsschritte der Sequenzerhebung	26
3.2 Patientenkollektiv	27
3.3 RNA-Extraktion	29
3.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	30
3.5 IgE-PCR	31
3.6 Gel-Elektrophorese und Gel-Extraktion.....	34
3.7 Ligation, Transformation und Klonierung.....	35
3.8 Mini-Präparation.....	38
3.9 Insertkontrollverdau.....	38
3.10 Sequenzierung des PCR-Amplifikats	39
3.11 Sequenzanalyse.....	40
3.12 Statistische Auswertung	42
4. Ergebnisse.....	43
4.1 Muster der V _H -, D- und J _H -Familiennutzung	43
4.2 Länge und Zusammensetzung der CDR-H3.....	46
4.3 Somatische Mutationsrate	46
4.4 Antigenselektion.....	50
4.5 Klonale Verwandtschaft der Sequenzen.....	52
4.6 Aminosäurezusammensetzung der CDR-H3.....	55
5. Diskussion	57

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	57
5.2 Kritische Betrachtung der Studie.....	57
5.2.1 Limitierung der Studie.....	57
5.2.2 Stärken der Studie.....	58
5.3 Superantigen-ähnliche Interaktion.....	58
5.4 Polyklonale Aktivierung von B1-Zellen.....	61
5.5 Klassische Immunantwort vom B2-Typ mit Antigenselektion	62
5.6 Schlussfolgerung	64
6. Literatur	65
7. Anhang	70
7.1 Abbildungsverzeichnis	70
7.2 Tabellenverzeichnis	70
7.3 Abkürzungsverzeichnis	71
7.4 Eigene Veröffentlichung zum Thema.....	72
7.4.1 Originalarbeiten	72
7.4.2 Vorträge und Posterpräsentationen.....	72
7.5 Curriculum Vitae	73
7.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	74
7.7 Danksagung	75

1. Zusammenfassung / Abstract

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege und mit einer Prävalenz von ca. 10% in Deutschland die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter. Die Erkenntnislage bezüglich der Ursachen allergischer Erkrankungen und insbesondere ihrer Zunahme in westlichen Gesellschaften ist noch unbefriedigend. Obwohl die Pathogenese des allergischen Asthma multifaktoriell und komplex ist, darf das Immunglobulin E (IgE) als das zentrale Effektormolekül der allergischen Immunantwort vom Soforttyp angesehen werden. Gebunden auf der Oberfläche von Mastzellen, generieren die IgE-Antikörper eine entscheidende Schnittstelle zwischen Allergenen und dem Immunsystem. Auf welche Weise die IgE-Antwort und damit das IgE-Repertoire im Rahmen allergischer Erkrankungen geformt werden, ist noch unklar.

Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion zur Immunaktivierung bei der IgE-Antwort sind alternative Aspekte: Der von der gegenwärtigen Datenlage favorisierte Mechanismus ist eine Superantigen-ähnliche Interaktion der Allergene mit dem Antikörper. Darüber hinaus wird die Beteiligung von B1-Zellen mit niedrigaffiner polyklonaler Antikörperreifung diskutiert. Die Hypothese der vorliegenden Dissertation ist, dass die IgE-Antwort beim allergischen Asthma eine klassische Antigen-gesteuerte und oligoklonale Immunantwort vom B2-Typ darstellt.

Es existieren publizierte Daten zu allen drei potentiellen Reifungsmechanismen der allergischen Immunantwort; gemeinsam ist den korrespondierenden Studien jedoch eine relativ kleine Zahl von erhobenen IgE-Sequenzen (meist unter 100), welche oftmals von lediglich einem einzigen Patienten stammen. Daten zum IgE-Repertoire während Kindheit und Adoleszenz fehlen bis *dato* gänzlich, obwohl dies die Lebensphase mit der größten Dynamik allergischer Krankheiten ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher eine statistisch ausreichende Anzahl funktioneller IgE-Sequenzen von Kindern mit allergischem Asthma zu gewinnen, um somit eine solide Datengrundlage zur Analyse der immunogenetischen Charakteristik zu schaffen.

Hierzu wurde eine hochsensitive reverse Transkriptase-PCR entwickelt, welche es erlaubt, humane IgE-Transkripte auch aus relativ kleinen Blutvolumina (500 µl) zu

amplifizieren. Mittels dieser IgE-PCR wurde das IgE-Repertoire aus dem peripheren Blut von 13 Kindern im Alter von 3 - 16 Jahren mit allergischem Asthma amplifiziert. Die Amplifikate wurden isoliert, kloniert und sequenziert. Dabei wurden insgesamt 1.366 funktionelle IgE-Sequenzen gewonnen. Dies stellt die bis *dato* größte Datenbank humaner IgE-Transkripte dar. Als Referenz wurden 308 IgM-Sequenzen derselben Kinder gewonnen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einige der publizierten Vorarbeiten zum Thema nicht bestätigen. So fand sich bei der Analyse der V_H-Familiennutzung kein Hinweis auf eine Superantigen-ähnliche Aktivierung. Das Muster der im IgE-Repertoire genutzten V_H-Familien entsprach der Keimbahnverteilung dieser Gene, was sowohl bei IgE (56%), als auch bei IgM (55%) V_H3 zur am häufigsten verwendeten Familie machte. Verglichen mit IgM (43 ± 9,8 bp) zeigten die IgE-Sequenzen (48 ± 13 bp) eine um 5 bp längere CDR-H3 ($p < 0,001$). Die somatische Mutationsrate der IgE-Transkripte (72‰) war mehr als dreimal so hoch wie die der IgM-Transkripte (20‰) ($p < 0,001$); dabei wurde keine einzige unmutierte IgE-Sequenz gefunden. Somit erscheint eine relevante Beteiligung von B1-Zellen bei der Entstehung dieser Antikörper unwahrscheinlich. Während bei nur 9% der IgM-Sequenzen eine signifikante Anhäufung von *replacement*-Mutationen in der klassischen Antigenbindungsstelle gefunden wurde, zeigten 29% der IgE-Transkripte Zeichen einer signifikanten Antigenselektion ($p < 0,001$). Darüber hinaus waren die IgE-Transkripte klonal enger verwandt als die IgM-Transkripte: Die 281 unique IgM-Sequenzen gehörten zu 227 verschiedenen Zellklonen, während 473 unique IgE-Sequenzen nur 142 Klonen zugeordnet werden konnten. Auch dieser Befund spricht für eine zielgerichtete und oligoklonal geprägte Antwort des adaptiven Immunsystems.

Zusammenfassend spiegelt das IgE-Repertoire im Blut von Kindern mit allergischem Asthma eine klassische, oligoklonale Immunantwort vom B2-Typ wider. Perspektivisch liefert die vorliegende Arbeit die erforderlichen Methoden und die Referenzdaten für eine Charakterisierung der Immunmechanismen bei therapeutischen Ansätzen mit dem Ziel, die IgE-Antwort zu modifizieren, wie z. B. der anti-IgE-Therapie mit monoklonalen Antikörpern oder der allergenspezifischen Immuntherapie.

Abstract

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory system and the most frequent chronic disorder in childhood. Although the pathogenesis of allergic asthma remains unclear, Immunoglobulin E (IgE) can be considered as a central effector molecule of the immediate allergic reaction. Bound to the surface of mast cells IgE generates an interface between allergens and the immune system.

The nature of the IgE response is still under debate. The objective of our study was to clarify whether the IgE repertoire in the circulation of allergic children represents a classical Ag-driven and oligoclonal B cell response, a superantigen-like activation of a subset of B cells, or a polyclonal B-1 cell expansion.

By establishing a highly sensitive RT-PCR method we amplified, cloned, and sequenced IgE H chain transcripts from 13 children aged from 3 – 16 years suffering from allergic asthma. In total we gained 1.366 functional IgE sequences which currently represent the most extensive collection of human IgE transcripts. As a reference we gained 308 functional IgM transcripts of the same children.

Interestingly in contrast to several recent studies the analysis of the V_H-family usage was not indicative of a superantigen-like activation of B cells. The pattern of V_H-family usage corresponded to germline complexity of these genes, making V_H3 the most frequently used family in IgE (56%) and IgM (55%). Compared to IgM (43 ± 9,8 bp) IgE sequences (48 ± 13bp) showed a 5bp longer CDR-H3 ($p < 0,001$). The somatic mutation rate was significantly enhanced in IgE transcripts (21% versus 72%; $p < 0.001$), which renders a polyclonal B-1 response unlikely. Whilst only 9% of IgM sequences displayed a significantly enhanced Ag selection, 29% of IgE transcripts were indicative of a classical Ag-driven immune response with affinity maturation ($p < 0.001$).

In summary IgE transcripts in the circulation of children with allergic asthma reflect a classical adaptive B-2 cell response. This study provides reference data for a better characterization of the IgE response under immunomodulating therapies, such as anti-IgE therapy or allergen-specific immunotherapy.

2. Einleitung

*„Aber nachdem den König der Held Diomedes erreicht,
Zum dreizehnten auch ihm das süße Leben entriss er;
Und schwer atmet' (ασθμαινοντα) er auf: ein schrecklicher Traum zu dem Haupte
Stand ihm die Nacht des Öneiden Sohn, durch den Rat der Athene.
Emsig löst' Odysseus indes die stampfenden Rosse,
Band sie mit Riemen vereint, und trieb sie hinweg aus dem Haufen...“
(Homer)*

2.1 Allergisches Asthma bronchiale

2.1.1 Definition und Hinführung zum Thema

Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion (Bousquet et al. 2000). Bei prädisponierten Personen kommt es dabei zu rekurrenden Episoden von Giemen, Kurzatmigkeit, Brustenge und Husten, vor allem nachts und am frühen Morgen. Diese Episoden gehen in der Regel mit einer ausgeprägten Verengung der Atemwege einher, welche häufig spontan oder nach Behandlung reversibel ist. Die Entzündung der Atemwege ist auch der Grund für eine bronchiale Hyperreagibilität auf eine Vielzahl von inhalativen Stimuli (Bacharier et al. 2008). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium kommt es außerdem zu einem Umbauprozess der Atemwege, dem sog. *airway remodeling*, einhergehend mit subepithelialen Fibrosierungen, erhöhter Anzahl glatter Muskelzellen und einer epithelialen Metaplasie (Broide 2008, Bosse and Rola-Pleszczynski 2007).

Mit einer Prävalenz in Deutschland von ca. 10% ist Asthma bronchiale die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter und somit von hoher medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung (Eder et al. 2006). Hinzu kommt, dass in den letzten Dekaden ein ständiger Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen in den westlichen Gesellschaften beobachtet werden konnte (Bach 2002).

Trotzdem ist die Erkenntnislage bezüglich der Ursachen allergischer Erkrankungen und insbesondere ihrer Zunahme noch unbefriedigend. Man geht heute von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren aus. Neben der genetischen Disposition und der Allergenexposition spielen allergie-fördernde (z. B. Passivrauchen, Luftverschmutzung, Atemwegsinfektionen) sowie modulierende Umstände (z. B. psychische, familiäre, soziale Faktoren) eine Rolle (Cookson 1999). Dies könnte erklären, warum Asthma einerseits mit dem westlichen Lebensstil und hohem Lebensstandard assoziiert ist, andererseits die Erkrankung bei Kindern aus sozial benachteiligten Schichten häufig schwerer verläuft (Laitinen et al. 2004, Moffatt et al. 2007, Hui et al. 2008).

2.1.2 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

2.1.2.1 Allergische Sensibilisierung

Die allergische Immunantwort ist eine pathologische (Über-)reaktion des Immunsystems auf eigentlich harmlose Antigene (= Allergene). Die Immunantwort des Typs I nach Gell und Coombs ist an einen vorangehenden Allergenkontakt gebunden, welcher zur systemischen Sensibilisierung gegen das Allergen geführt hat (Gell and Coombs 1963, Murphy 2007).

Beim allergischen Asthma bronchiale kommt es durch Einatmen von Aeroallergenen (z. B. Pollen- oder Milbenantigene) zur inhalativen Sensibilisierung. Trotz der großen Anzahl an ständig inhalierten Antigenen lösen nur wenige Antigene mit bestimmten Eigenschaften eine Sensibilisierung aus. Kleine, gut lösliche, stabile Proteine mit Proteaseaktivität scheinen dabei besonders allergieinduzierend zu sein (Kauffman et al. 2000). Nach Kontakt der Pollen mit der Atemwegsmukosa werden die Allergene aus den Pollen „ausgewaschen“ und im Mukosasekret gelöst. So passieren sie das Epithel und werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und prozessiert (Maddox and Schwartz 2002). In der Atemwegsschleimhaut entsprechen diese Zellen den Makrophagen und dendritischen Zellen (Holt 2000). Nachdem die APC das Allergen aufgenommen haben, wandern sie in lokale Lymphknoten und präsentieren die prozessierten Peptidfragmente über den *major histocompatibility complex II* den B- und T-Zellen (Busse and Lemanske 2001). Sind die Rezeptoren dieser Zellen spezifisch für das präsentierte Antigen, kommt es zur Interaktion mit nachfolgender Stimulation der entsprechenden Zellen. Entscheidend für die weitere Entwicklung der B- und T-Zellen

sind die T-Helferzellen (T_h-Zellen), welche das Zytokinmilieu prägen. Physiologischerweise herrscht eine Balance zwischen den von T_h1- und T_h2-Zellen produzierten Zytokinen. Während T_h1-Zellen vornehmlich Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) freisetzen, sezernieren die T_h2-Zellen vor allem IL-4, IL-5 und IL-13. Bei der allergischen Immunantwort ist dieses Gleichgewicht oftmals zu Gunsten der T_h2-Zellen verschoben. Die Effektorfunktionen dieser T-Zellen sind wesentlich für die Immunreaktionen verantwortlich, welche zur Ausbildung des allergischen Phänotyps führen. Findet die Immunantwort unter dem vermehrten Einfluss von T_h2-Zellen statt, durchlaufen antigenspezifische B-Zellen den Klassenwechsel zu IgE (und IgG₄) und differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (Corry and Kheradmand 1999, Murphy 2007), wodurch der IgE-Serumspiegel ansteigt.

Die Antikörper werden systemisch verteilt und binden mit ihrem F_C-Teil unter anderem an den hochaffinen IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) auf Mastzellen und Basophilen, welche die „erste Verteidigungslinie“ in Schleimhäuten darstellen (Gould and Sutton 2008). Das Immunsystem ist nun gegen Allergene sensibilisiert und der Weg für allergische Reaktionen geebnet.

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Fc ϵ RI-Rezeptoren auch auf APC, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, Blutplättchen und glatten Muskelzellen vorhanden sind. Deren Funktion auf diesen Zellen ist bisher unklar (Gould and Sutton 2008, Kinet 1999).

2.1.2.2 Die allergische Frühphasereaktion

Durch die Sensibilisierung befinden sich vermehrt mit allergenspezifischem IgE beladene Mastzellen an den strategisch wichtigen Abwehrpunkten, an denen es typischerweise zu Kontakt mit Fremdeiweißen kommt. Dies sind vor allem die Schleimhäute des Respirations- und des Gastrointestinaltrakts.

Hat ein sensibilisiertes Individuum erneuten Kontakt mit dem Allergen, so wird dieses von IgE-Antikörpern auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden. Eine Quervernetzung benachbarter IgE-Fc ϵ RI-Komplexe auf diesen Effektorzellen ist der auslösende Reiz für deren Degranulation (Rivera and Olivera

2008, Murphy 2007). Hierdurch werden potente Entzündungsmediatoren wie Histamin und Eicosanoide, aber auch Heparin und andere Enzyme freigesetzt, welche nun auf das Gewebe wirken und die allergische Sofortreaktion auslösen. Es kommt zur Kontraktion der glatten Muskulatur, zur Vasodilatation und zu einer erhöhten Produktion von zähem Schleim. Insgesamt bewirken diese Mechanismen eine Atemwegsobstruktion und repräsentieren das pathologische Korrelat des akuten Asthmaanfalls (Bousquet et al. 2000, Busse and Lemanske 2001).

Die allergische Soforttypreaktion wird nach Gell und Coombs als Typ-I Reaktion klassifiziert. Das IgE generiert bei dieser Reaktion die Schnittstelle zwischen Allergenen und Immunsystem und darf deshalb als das zentrale Effektormolekül der allergischen Antwort des Asthma angesehen werden (Gell and Coombs 1963, Gould and Sutton 2008).

2.1.2.3 Die allergische Spätphasereaktion

Die Degranulation der Mastzellen und die damit verbundene Freisetzung der Entzündungsmediatoren ist gleichzeitig der „Startschuss“ für die Spätreaktion, die ca. 3 – 8 Stunden später ihren Höhepunkt erreicht (Gould and Sutton 2008). Dabei kommt es durch Chemotaxis zur Einwanderung von Entzündungszellen (besonders Eosinophile, T-Zellen, Basophile, Neutrophile und Makrophagen) und deren Aktivierung im Lungenparenchym. Die erneute Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt zu Bronchospasmus, Schleimhautödem und vermehrter Sekretion von zähem Schleim mit konsekutiver Dyspnoe.

Das Hauptcharakteristikum der Spätreaktion ist jedoch die Immigration der eosinophilen Granulozyten (De Monchy et al. 1985). Eosinophile Granulozyten differenzieren unter dem Einfluss des T_H2 -Zytokins IL-5 aus (Sanderson 1992). Über eine Freisetzung toxischer Substanzen tragen sie maßgeblich zur lokalen Gewebsdestruktion bei allergischen Reaktionen bei. Außerdem verstärken sie die Entzündungsreaktion durch Synthese und Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren wie z. B. Prostaglandinen, Leukotrienen und anderen T_H2 -Zytokinen. So kommt es zur Akkumulation von T-Zellen und Eosinophilen in den Atemwegen. Pathogenetisch entspricht diese Phase der Spätreaktion einer Typ-IV-Reaktion nach Gell und Coombs (Gell and Coombs 1963, Murphy 2007, Colgan and Hankel 2010).

Eine weitere Reaktion dieser Phase ruft keine Symptome hervor, dient aber der Aufrechterhaltung der allergischen Sensibilisierung. Durch Allergenkontakt werden sensibilisierte (also mit IgE beladene) APC aktiviert, welche den vorhandenen T_h2-Zellen prozessierte Peptidfragmente präsentieren. Diese Allergen-aktivierten T_h2-Zellen sezernieren erneut IL-4, rekrutieren weitere T_h2-Zellen und regen Plasmazellen zur IgE-Produktion an, was die bei der akuten Reaktion verbrauchten Antikörper wiederherstellt (Gould and Sutton 2008).

2.1.2.4 Die chronische Entzündung und das *airway remodeling*

Die akute Entzündungsreaktion ist eine unspezifische Reaktion des Gewebes auf Verletzungen verschiedenster Art und endet bestenfalls mit der *restitutio ad integrum*. Im Unterschied dazu geht beim Asthma bronchiale die allergische Spätreaktion in eine chronische Entzündung über, die sich verselbstständigt und Allergen-unabhängig sein kann. Langfristig führt diese Entzündungsreaktion im Lungengewebe zu irreversiblen Umbauprozessen. Besonders durch die immigrierten eosinophilen Granulozyten und die aus ihnen freigesetzten zytotoxischen Substanzen kommt es zur Schädigung und Vernarbung des Epithelgewebes der Atemwege. Hierdurch wird die mukoziliäre Clearance stark herabgesetzt. Im weiteren Verlauf kommt es außerdem zu einer irreversiblen Wandverdickung der Atemwege, welche durch folgende Prozesse ausgelöst wird.

Zum einen führt eine Fibroblastenaktivierung zur subendothelialen Fibrosierung und zur Verdickung der Basalmembran, zum anderen kommt es zur Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur. Darüber hinaus sorgt eine Hyperplasie und Hypertrophie der Becherzellen zu einer gesteigerten Produktion besonders zähen Schleims in den Atemwegen. Hierdurch kommt es zu einem stark erhöhten Atemwegswiderstand, zu einer erniedrigten Dehnbarkeit des Lungengewebes, zu einer Abnahme der gasaustauschenden Oberfläche und zu einer erhöhten intraalveolären Oberflächenspannung, insgesamt also zu einem irreversiblen Funktionsverlust des Lungenparenchyms (Bousquet et al. 2000, Maddox and Schwartz 2002).

2.1.2.5 Die Atemwegshyperreagibilität

Ein weiteres Charakteristikum bei Asthmapatienten ist eine Überempfindlichkeit der Atemwege, die Atemwegshyperreagibilität (AHR). Dabei können asthmatische Beschwerden auch in Abwesenheit von Allergenen auftreten. Das heißt, die Atemwege werden überempfindlich auf unspezifische Reize, wie z. B. kalte Luft oder Umweltnoxen (Zigarettenrauch, Haarspray) (Sterk 1995). Auch pharmakologische Substanzen wie Methacholin oder Histamin provozieren dann in bereits sehr kleinen Dosen eine Obstruktion der Atemwege. Das Ausmaß der Atemwegsobstruktion ist bei diesen Patienten größer als bei Nicht-Asthmatikern (Berend et al. 2008). Zunutze macht man sich die AHR in der klinischen Diagnostik des Asthma bronchiale. Den betreffenden Patienten wird während einer Lungenfunktionsuntersuchung eine definierte Menge dieser pharmakologischen Substanzen inhalativ verabreicht. Als wichtiger Faktor zur Beurteilung der Krankheitsschwere gilt das Ausmaß der Atemwegsobstruktion (Burchell et al. 2009).

2.2 Anatomie des IgE

2.2.1 Genereller Aufbau eines Immunglobulinmoleküls

Immunglobuline sind Glykoproteine, die aus je zwei identischen schweren (ca. 50 kDa) und leichten (ca. 25 kDa) Ketten bestehen, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Man unterscheidet bei den schweren und leichten Ketten je eine variable Region mit einer endständigen Aminogruppe von einer konstanten Region mit endständiger Carboxylgruppe. Die Form dieser Moleküle gleicht einem Ypsilon (**Abb. 1**), wobei die Basis dieses „Y“ nur von den schweren Ketten gebildet wird und den konstanten Teil (F_C) des Moleküls bildet. In der menschlichen Keimbahn kodieren Gene für zwei verschiedene Arten von leichten Ketten (λ , κ) und für fünf unterschiedliche Isotypen von schweren Ketten (α , δ , ϵ , γ , μ). Die funktionelle Aktivität der Antikörper wird durch die schweren Ketten und die daraus resultierende Zuordnung zur jeweiligen Klasse der Immunglobuline (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) bestimmt. Zwischen den leichten Ketten konnten bisher keine funktionellen Unterschiede festgestellt werden (Poljak et al. 1976, Davies et al. 1975, Maizels 2005).

Sowohl leichte, als auch schwere Ketten bilden dreidimensionale globuläre Strukturen (= Domänen), die je ca. 110 Aminosäuren lang sind und ähnliche Nukleotidsequenzen enthalten. Die leichten Ketten bestehen aus der variablen ($V_L = \textit{variable light}$) und der konstanten Domäne ($C_L = \textit{constant light}$). Auch die schweren Ketten bilden je eine variable Domäne ($V_H = \textit{variable heavy}$). Abhängig von ihrer Klasse enthalten die schweren Ketten jedoch drei (IgA, IgD, IgG) bzw. vier (IgE, IgM) konstante Domänen ($C_{H1-3/4} = \textit{constant heavy}$) (Han et al. 1995) (Abb. 1). Immunglobuline kommen als Rezeptoren auf Lymphozyten und frei im Serum oder in Körpersekreten vor (Murphy 2007).

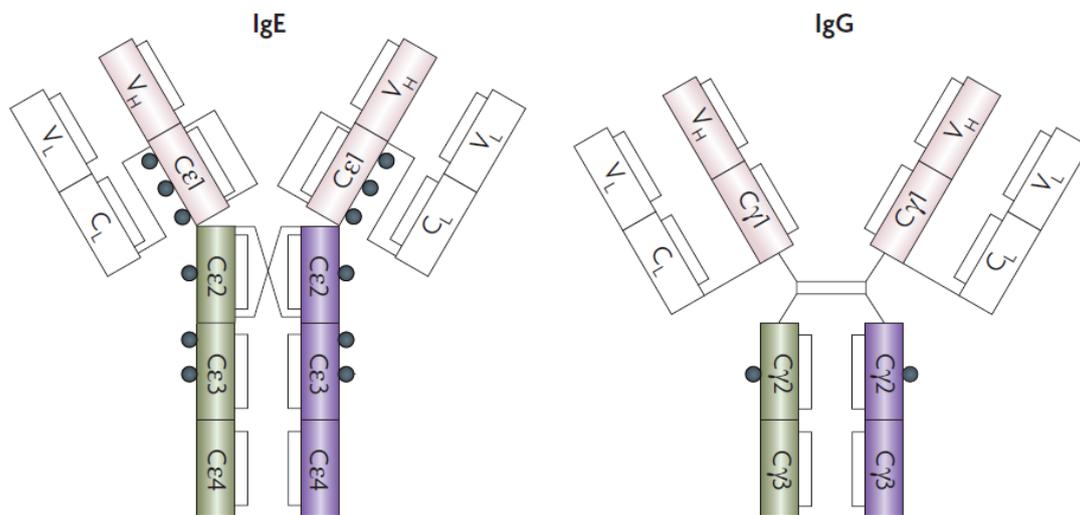


Abbildung 1: Strukturelle Unterschiede zwischen IgE und IgG

(modifiziert nach Gould and Sutton 2008)

V_L / C_L : variable / konstante Region der leichten Ketten; V_H : variable Region der schweren Ketten; $C_{\epsilon 1/2/3/4}$: konstante Domänen der schweren IgE-Ketten; $C_{\gamma 1/2/3}$: konstante Domänen der schweren IgG-Ketten; Striche entsprechen Disulfidbrücken; Punkte stellen Glykosilierungen dar.

Die konstanten Domänen $C_{\epsilon 3}$ und $C_{\epsilon 4}$ entsprechen $C_{\gamma 2}$ und $C_{\gamma 3}$. Anstelle der *hinge region* des IgG hat das IgE-Molekül die konstante Domäne $C_{\epsilon 2}$, die bei Bindung an den $Fc\epsilon RI$ -Rezeptor die Konformation ändert und so ein „Einrasten“ des Immunglobulins in seinen Rezeptor bewirkt.

2.2.2 Mikroanatomie der variablen Region

Immunglobuline generieren die Schnittstelle zwischen Antigenen und Immunsystem. Im Sinne der klassischen Immunantwort findet die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen an der sog. klassischen Antigenbindungsstelle statt. Sie wird gebildet durch 6 hypervariable Schleifen (CDR1-3 = *complementarity determining regions*), je 3 innerhalb der variablen Region der schweren (V_H) und leichten Ketten (V_L) (Padlan 1994). Diese hypervariablen Schleifen generieren durch die hohe Variabilität ihrer Aminosäuresequenzen die Grundlage für die große Diversität der Antikörper. Diese große Diversität bildet das morphologische Substrat für die Selektion derjenigen Antikörper, welche die höchste Affinität zum betreffenden Antigen besitzen (Tonegawa 1983). Eingerahmt werden die hypervariablen Schleifen von relativ unveränderlichen Regionen (FR1-4 = *framework regions*), die für die strukturelle Intaktheit des Moleküls verantwortlich sind und in der Regel nicht an der Antigenbindung beteiligt sind.

Das Zentrum der klassischen Antigenbindungsstelle ist die dritte hypervariable Schleife der schweren Ketten (CDR-H3) (Tonegawa 1983) (**Abb. 2**). Gebildet wird die CDR-H3 durch somatische Rekombination der drei Gensegmente V_H (=Variable), D (=Diversity) und J_H (=Joining), wodurch die sog. kombinatorische Vielfalt entsteht. Weiter erhöht wird die Diversität durch zufälliges Einfügen von *nontemplate* (N-) Nukleotiden durch das Enzym *terminale Desoxynucleotidyltransferase* (TdT) (Alt et al. 1992). Außerdem können palindromische (P-) Nukleotide an den Enden der rekombinierten Gensegmente angefügt werden (Tonegawa 1983). Die CDR-H1 und CDR-H2 werden ausschließlich innerhalb des V_H -Segments kodiert. Dies verdeutlicht, warum die CDR-H3 die größte Variabilität aller CDR aufweist und hauptsächlich verantwortlich für die große Vielfalt des Antikörper-Repertoires ist (Xu and Davis 2000, Collis et al. 2003, Padlan 1994) (**Abb. 2**).

Die Vielfalt der CDR-H3 könnte theoretisch also unendlich groß sein. Es gibt jedoch Mechanismen, die das Ausmaß des Immunglobulin-Repertoires begrenzen. Zum einen werden Zellen, die Immunglobuline exprimieren, welche mit hoher Affinität an Selbstantigene binden, der Apoptose zugeführt oder es kommt zum „*recycling*“ ihrer Rezeptoren (Nemazee 2006). Zum anderen kommt es zu einer bevorzugten Nutzung der Base Guanin durch die TdT (Basu et al. 1983) und zu einer negativen Selektion von besonders langen CDR-H3 (Meffre et al. 2001).

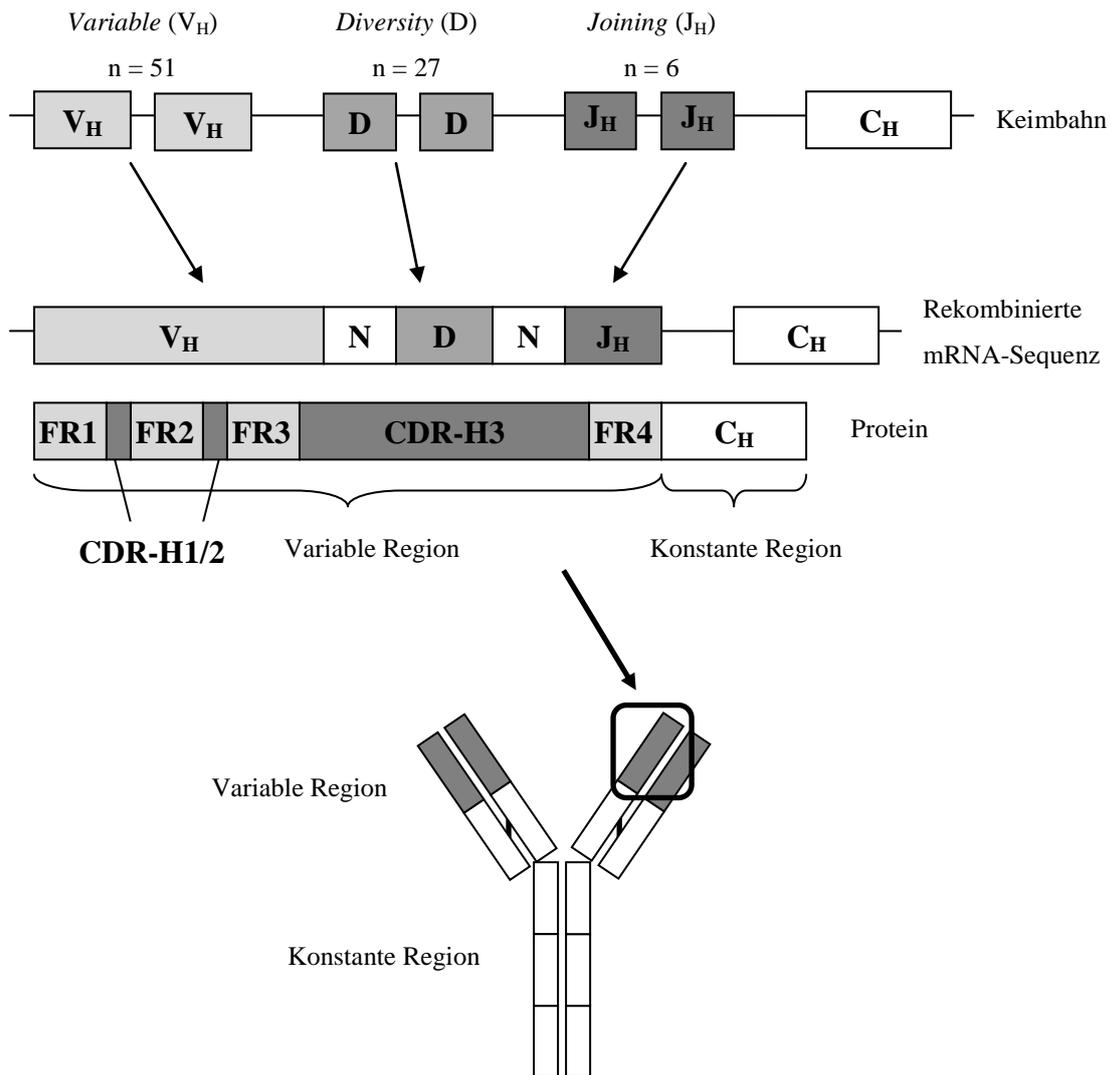


Abb. 2: Zusammensetzung der klassischen Antigenbindungsstelle

Die somatische Rekombination der drei verschiedenen Gensegmente V_H (*Variable*), D (*Diversity*) und J_H (*Joining*) bildet die Grundlage für die hohe Variabilität der 3. hypervariablen Schleife der schweren Ketten (**CDR-H3**). Weiter erhöht wird diese durch zufälliges Einfügen sog. *nontemplate* (N -) Nucleotide. Die **CDR-H1** und **CDR-H2** werden ausschließlich innerhalb des V_H -Gensegments kodiert. Dies verdeutlicht, warum die CDR-H3 die größte Variabilität aller CDR aufweist und hauptsächlich verantwortlich für die große Vielfalt des Antikörperrepertoires ist. Umrahmt werden die hypervariablen Schleifen von den sog. *framework regions* (**FR**), die für die strukturelle Intaktheit des Moleküls verantwortlich sind und normalerweise nicht an der Antigenbindung beteiligt sind. Die Zuordnung zu einer Immunglobulinklasse und somit auch die funktionelle Aktivität der Antikörper werden durch die konstanten Regionen der schweren Kette (C_H) bestimmt.

2.2.3 Strukturelle Besonderheiten des IgE

Auf den ersten Blick erscheint IgE wie ein typisches Immunglobulin mit je 2 identischen leichten und schweren Ketten. Interessanterweise konnten aktuelle Kristallisations- und sog. FRET- (*Fluorescence resonance energy transfer*) Untersuchungen jedoch zeigen, dass sich die Tertiärstruktur des Moleküls von der anderer Isotypen unterscheidet. So ist die Struktur des IgE-Moleküls eher mit einem Taschenmesser als mit einem starren „Y“ vergleichbar. Auffällig ist, dass die schweren IgE-Ketten eine konstante Domäne mehr als z.B. IgG besitzen, wobei die konstanten Domänen 3 und 4 des IgE (C ϵ 3 und C ϵ 4) den konstanten Domänen 2 und 3 des IgG (C γ 2 und C γ 3) entsprechen. Dort, wo beim IgG die sog. *hinge region* die erste und zweite konstante Domäne (C γ 1 und C γ 2) flexibel verbindet, bildet beim IgE die zweite konstante Domäne (C ϵ 2) eine feste Verbindung (Wan et al. 2002) (**Abb. 1**). Diese ermöglicht eine Konformationsänderung bei Bindung des IgE-Moleküls an seinen Rezeptor (Fc ϵ RI). Die zweite Domäne biegt sich dann so stark zurück, dass sie in Kontakt zur dritten und sogar vierten Domäne tritt. Durch dieses „Einrasten“ kann die einzigartig hohe Affinität zwischen IgE und Fc ϵ RI-Rezeptor erklärt werden, die zu den stärksten bekannten Protein-Ligand-Interaktionen in der Biologie zählt und die Bindungskräfte anderer Immunglobulin-Isotypen weit übersteigt (Gould and Sutton 2008).

2.3 Reifung der IgE-Antwort

Die Entstehung und Entwicklung der IgE-vermittelten allergischen Immunantwort war bereits Gegenstand verschiedener Studien. Im Zentrum des wissenschaftlichen Diskurses stehen dabei drei grundsätzlich verschiedene Erklärungsansätze, wobei für jeden in bereits veröffentlichten Arbeiten Hinweise gefunden wurden (**Abb. 3**). Der erste dieser Ansätze deutet die IgE-Antwort bei allergischen Erkrankungen als Ergebnis einer zielgerichteten aber fehlgeleiteten Immunantwort, also als klassische Antigen-abhängige Reaktion vom B2-Typ (Davies and O'Hehir 2004, Lim et al. 2007). Die von der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion favorisierte zweite Theorie postuliert eine Superantigen-ähnliche Wirkung mancher Allergene. Eine allergische Sensibilisierung wäre demnach keine zielgerichtete Reaktion des Immunsystems, sondern eher Konsequenz der hohen „immunogenetischen Potenz“ der „Superallergene“ (Snow et al. 1997, Snow et al. 1999, Marone et al. 2006). Als dritter Aspekt wird eine Beteiligung

der B-Zellen vom Typ B1 diskutiert. Diese Zellen sind charakterisiert durch Produktion von sog. „natürlichen Antikörpern“ und stellen einen Teil des nicht-adaptiven Immunsystems dar. Diesem Ansatz folgend wäre die allergische Immunantwort eine niedrigaffine Reaktion der angeborenen Abwehr (Edwards et al. 2002).

2.3.1 Klassische Antigen-abhängige Immunantwort vom B2-Typ

Nach Antigenkontakt naiver B-Zellen kommt es in den Keimzentren peripherer Lymphorgane zur weiteren Diversifikation, sowie Erhöhung der Spezifität der B-Zell-Rezeptoren. Durch das Enzym AID (*activation induced cytidine deaminase*) werden Punktmutationen in den variablen Regionen der zuvor rekombinierten Immunglobulinketten eingefügt (Shinkura et al. 2004). Dabei wird unterschieden zwischen *silent* Mutationen, bei denen es nicht zum Austausch einer Aminosäure kommt, und *replacement* Mutationen, bei denen die Mutation zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt. Nach dem Einfügen einer Mutation wird das Ergebnis im Rahmen der klonalen Selektion „getestet“ (Berek et al. 1985). Zellen, die ihre Affinität gegenüber dem Antigen durch die Mutation erhöhen konnten, werden positiv selektiert, expandieren klonal und differenzieren zu Gedächtnis- oder zu Immunglobulinproduzierenden Plasmazellen (Berek et al. 1985). Zellen, deren Antigenaffinität sich verschlechtert hat, oder Zellen mit unproduktiven *rearrangements* werden der Apoptose zugeführt (Rajewsky 1996).

Im Gegensatz zu den Mechanismen der kombinatorischen und junktionalen Vielfalt, welche Antigenbindungsstellen mit großen strukturellen Unterschieden hervorbringen, beinhaltet die somatische Hypermutation in Verbindung mit der klonalen Selektion die Möglichkeit, eine Serie von nur leicht veränderten B-Zell-Rezeptoren hervorzubringen, die das ursprüngliche Antigen spezifischer und affiner binden (Ziegner et al. 1994). Fände nach diesem Prozess der Klassenwechsel zu IgE statt, würde die Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper beginnen, welche durch Charakteristika klassischer Sekundärantikörper geprägt wären.

Lim und Kollegen fanden in ihrer Studie an 14 Patienten mit atopischer Dermatitis ein IgE-Repertoire, welches dem der IgM und IgG sehr ähnlich war, und werteten dies als Hinweis auf eine Antigen-gesteuerte Entwicklung der IgE-Antwort (Lim et al. 2007). Bereits im Jahr 2004 analysierten Davies und O’Hehir periphere IgE-Sequenzen von

drei Patienten mit allergischer Rhinitis und fanden hoch-mutierte Sequenzen und eine breite Verteilung der genutzten V_H -Familien. Ihre Schlussfolgerung lautete, dass das IgE-Repertoire im Rahmen einer Antigen-gesteuerten und oligoklonalen Immunantwort entsteht (Davies and O'Hehir 2004).

Die IgE-Antwort beim allergischen Asthma würde somit einer zielgerichteten aber fehlgeleiteten klassischen Immunantwort vom B2-Typ entsprechen (**Abb. 3**).

2.3.2 Superantigen-ähnliche Aktivierung

Ein alternativer Erklärungsansatz zur Formung des allergischen Antikörper-Repertoires basiert auf der Annahme, dass Allergene auch als Superantigene mit den IgE-Antikörpern interagieren könnten. Normalerweise können nur ca. 0,001% der naiven B-Zellen mit einem bestimmten Antigen interagieren, während Superantigene an etwa 5% der Rezeptoren von naiven B-Zellen binden und diese Zellen zur Proliferation anregen können (Silverman 1998). Die große Potenz zur Immuninteraktion der Superantigene liegt darin begründet, dass sie nicht an eine spezifische klassische Antigenbindungsstelle binden, sondern an die relativ unveränderlichen *framework regions* der variablen Domänen (Graille et al. 2000).

Das Keimbahn-Repertoire besteht aus 51 bisher identifizierten funktionellen V_H -Genen, die in 7 Gruppen ($V_{H1} - V_{H7}$) eingeteilt werden (Matsuda et al. 1998, Cook et al. 1994). Die größte dieser Familien ist V_{H3} , während V_{H5} und V_{H6} die kleinsten Vertreter mit nur ein bzw. zwei Genen darstellen (Giudicelli et al. 2006). Die Gene der V_H -Familien kodieren die ersten beiden hypervariablen Schleifen (CDR-H1 und -H2), sowie die ersten drei konstanten Regionen (FR1, 2, 3) der variablen Domänen der schweren Ketten. Die *framework regions* 1-3 werden also nur durch das V_H -Gen kodiert und sind nahezu identisch auf allen Genen einer V_H -Familie (Davies and Chacko 1993). Deshalb kann ein Superantigen nicht nur sehr wenige spezifische, sondern fast alle B-Zellen einer V_H -Familie aktivieren und zur Proliferation anregen. (Graille et al. 2000).

Wenn Allergene als Superantigene fungierten, würde man also im Repertoire der analysierten IgE-Antikörper eine starke Verschiebung in Richtung bestimmter V_H -Familien erwarten, da durch Superantigene die „spezifischen“ V_H -Familien positiv selektiert würden. Bei Antikörpern der primären Immunantwort (IgM) hingegen

entspricht das Häufigkeitsmuster der genutzten V_H -Familien der Verteilung der kodierenden Gene auf der Keimbahn.

In Ihren Studien an einem Patienten mit allergischem Asthma fanden Snow *et al.* eine signifikante Überrepräsentation der eigentlich kleinen V_H5 -Familie und schlossen daraus, dass dies ein Charakteristikum von IgE produzierende B-Zellen sein muss und Allergene als Superantigene mit den Antikörpern interagieren (Snow *et al.* 1997). Janezic *et al.* beobachteten in Ihrer Studie an zwei Patienten mit Erdnuss-Allergie eine Überrepräsentation der V_H1 -Familie und schlussfolgerten, dass Antigene der Hausstaumilben aus der Studie von Snow *et al.* eher V_H5 selektierten und Erdnussantigene eher V_H1 , was die Theorie der Superantigene weiter bekräftigte (Janezic *et al.* 1998). Im Jahre 2005 fanden Coker *et al.* in Ihrer Studie an B-Lymphozyten aus der nasalen Mukosa eines an allergischer Rhinitis erkrankten Patienten ebenfalls eine überzufällig häufige Nutzung der Gene der V_H5 -Familie und schlossen sich der Superantigen Theorie an (Coker *et al.* 2005). Marone *et al.* führten dann 2006 konsequenterweise den Terminus „Superallergen“ ein und prägten den *status quo* der wissenschaftlichen Debatte (Marone *et al.* 2006) (**Abb. 3**).

2.3.3 Polyklonale Immunreaktion vom B1-Typ

Seitdem B1-Zellen 1984 erstmals von Hayakawa *et al.* beschrieben wurden, gibt es eine wissenschaftliche Diskussion über die Herkunft und die physiologische Rolle dieser Zellen (Hayakawa *et al.* 1984). B1-Zellen unterscheiden sich von den B2-Zellen sowohl durch die Expression ihrer Oberflächenmarker (z.B. $CD5^+$, $CD43^+$) als auch ihre Vorläuferzellen und ihre Funktion (Berland and Wortis 2002, Tung and Herzenberg 2007). Im Vergleich zu konventionellen B2-Zellen sind B1-Zellen langlebiger und durch ein B-Zell-Rezeptor-Repertoire geringerer Diversität und Affinität geprägt (Kantor *et al.* 1997). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass B1-Zellen nicht an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind und dass sie in den sekundären lymphatischen Organen nur eine kleine Subpopulation ausmachen (Herzenberg 2000). Produziert werden die B1-Zellen bereits in der Fetal- und Neonatal-Periode (Hardy 2006) und während der Kindheit stellen sie eine zahlenmäßig bedeutende B-Zell-Subpopulation im peripheren Blut dar (Bhat *et al.* 1992). Funktionell charakterisieren kann man diese Zellen durch eine polyklonale Aktivierung und die Produktion von polyreaktiven IgM (Berland and Wortis 2002). Da die Entwicklung und Produktion

dieser Antikörper unabhängig von Antigenkontakt ist, hat man sie „natürliche Antikörper“ getauft (Carroll and Prodeus 1998). Die Aminosäuresequenzen dieser natürlichen Antikörper entsprechen zu einem sehr großen Teil der Sequenzen der kodierenden Keimbahngene, da die B1-Zellen meist nicht durch Antigenkontakt zur somatischen Hypermutation und Affinitätsreifung angeregt werden (Casali and Schettino 1996). Die von B1-Zellen sezernierten polyreaktiven IgM neigen zur Autoreaktivität und werden mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Duan and Morel 2006).

Eibensteiner und Kollegen deuteten die breite Nutzung aller V_H -Genfamilien in Ihrer Studie an 10 Atopikern als Hinweis auf eine polyklonale Aktivierung von multiplen B-Zellen (Eibensteiner et al. 2000). Eine potenzielle Rolle der B1-Zellen bei der allergischen Immunantwort wurde dann erstmals von Edwards *et al.* postuliert (Edwards et al. 2002). Diese Vermutung gründet auf der Beobachtung, dass in der Analyse des peripheren IgE-Repertoires von Patienten mit atopischer Dermatitis viele IgE-Sequenzen durch eine sehr geringe somatische Mutationsrate in der variablen Region sowie sehr kurze CDR-H3 Regionen aufgrund verringerter N-Nukleotid-Addition auffielen und dies typische Charakteristika der von B1-Zellen sezernierten Immunglobuline sind (Tornberg and Holmberg 1995, Brezinschek et al. 1997, von Boehmer and Melchers 2010). Bestärkt wurde diese Analyse durch eine Arbeit von Dahlke und Kollegen, die ebenfalls eine sehr geringe somatische Mutationsrate und kurze CDR-H3 Regionen fanden (Dahlke et al. 2006) (**Abb. 3**).

2.4 Fragestellung

Wie in Kapitel 2.3 erläutert gibt es drei alternative Erklärungsansätze zur Prägung der allergischen Immunreaktion (**Abb. 3**).

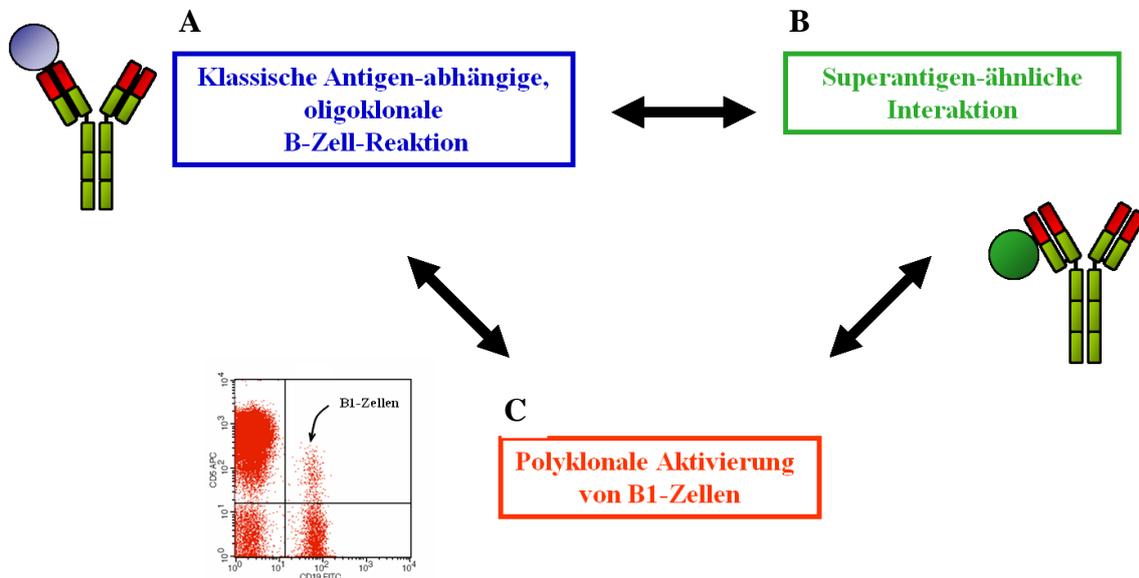


Abbildung 3: Alternative Erklärungsansätze zur Prägung der allergischen Immunreaktion

A) Die allergische Immunantwort ist eine zielgerichtete aber fehlgeleitete Reaktion, also eine klassische Antigen-abhängige Immunantwort. B) Es kommt zu einer Superantigen-ähnlichen Interaktion zwischen Allergen und Antikörper. C) Auch eine Art unspezifischer „Immundefekt“ im Sinne eines polyklonalen Klassenwechsels unter Beteiligung von B1-Zellen erscheint möglich.

Es gibt Hinweise darauf, dass die allergische Immunantwort eine klassische, oligoklonale B-Zell-Reaktion darstellt. In diesem Fall würde das Allergen mit der klassischen Antigenbindungsstelle interagieren und so eine zielgerichtete aber fehlgeleitete Immunantwort induzieren (Davies and O'Hehir 2004, Lim et al. 2007).

Der Großteil der bisher zum Thema veröffentlichten Studien favorisiert jedoch eine Bindung des Allergens an die unveränderlichen Bereiche der variablen Domänen (*framework regions*). Diese konsequenterweise „Superallergen“ genannten Antigene könnten mit dem größten Teil der Gene einer V_H-Familie interagieren, wodurch die immunogenetische Potenz dieser Allergene um ein vielfaches erhöht wäre (Marone et al. 2006, Zemlin et al. 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Induktion der allergischen Immunantwort ist eine polyklonale Aktivierung unter Beteiligung von B1-Zellen. Diese genuinen Lymphozyten bilden eine T-Zell-unabhängige Abwehr und produzieren polyreaktive Antikörper. In diesem Fall würde die allergische Sensibilisierung eine niedrigaffine Immunantwort mit polyklonalen Antikörpern widerspiegeln (Collis et al. 2003).

Es existieren publizierte Daten zu jedem der drei Aspekte der Immunreifung bei der allergischen Immunantwort; gemeinsam ist den korrespondierenden Studien jedoch eine relativ kleine Zahl von IgE-Sequenzen (meist unter 100), welche oftmals von lediglich einem einzigen Patienten stammen. Daten zum IgE-Repertoire während Kindheit und Adoleszenz fehlen bis *dato* gänzlich, obwohl dies die Lebensphase mit der größten Dynamik allergischer Krankheiten ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher eine statistisch ausreichende Anzahl funktioneller IgE-Sequenzen von Kindern mit allergischem Asthma zu gewinnen, um somit eine solide Datengrundlage zur Analyse der immunogenetischen Charakteristik zu schaffen. Als Referenz dient das IgM-Antikörper-Repertoire derselben Patienten.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Dissertation ist, dass die allergische Sensibilisierung bei Kindern mit allergischem Asthma eine klassische, Antigen-abhängige B2-Zell-Reaktion darstellt.

Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, soll konkret folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

1. Gibt es bei IgE-Transkripten eine Systematik in der Nutzung der V_H-, D-, und J_H- Gensegmente?

Wenn Allergene als „Superallergene“ an die Antikörper bänden, wäre eine positive Selektion der für sie „spezifischen *framework region*“ und damit eine Bevorzugung bestimmter V_H-Genfamilien zu erwarten.

2. Wie ist die CDR-H3 der IgE zusammengesetzt?

Bei einer Beteiligung von B1-Zellen an der allergischen Immunantwort würde man besonders kurze CDR-H3 durch geringe Addition von N-Nukleotiden erwarten.

3. Wie hoch ist die somatische Mutationsrate der IgE-Sequenzen?

Die somatische Mutationsrate der Immunglobuline gibt Hinweise auf den Selektionsdruck, dem die Antikörper-produzierende Zelle ausgesetzt war. So erwartet man im Repertoire sog. „natürlicher Antikörper“ (B1-Zellen) eine wesentlich geringere somatische Mutationsrate als im Immunglobulin-Repertoire der adaptiven Immunantwort durch B2-Zellen.

4. Kann man eine statistisch signifikante Anhäufung von *replacement* Mutationen in den CDRs nachweisen?

Eine Anhäufung von *replacement* Mutationen in den hypervariablen Schleifen spricht für eine Antigenselektion der Sequenzen.

5. Sind die IgE-Sequenzen klonal verwandt?

Eine enge klonale Verwandtschaft der Sequenzen wäre ein Argument dafür, dass die allergische Komponente des Asthma als eine klonale B-Zell-Erkrankung entstehen könnte.

6. Aus welchen Aminosäuren werden die IgE gebildet?

Die Zusammensetzung der Aminosäuresequenzen der IgE gibt ebenfalls Hinweise auf den Ursprung und die bei der Produktion beteiligten Zellpopulationen.

3. Material und Methoden

3.1 Arbeitsschritte der Sequenzerhebung

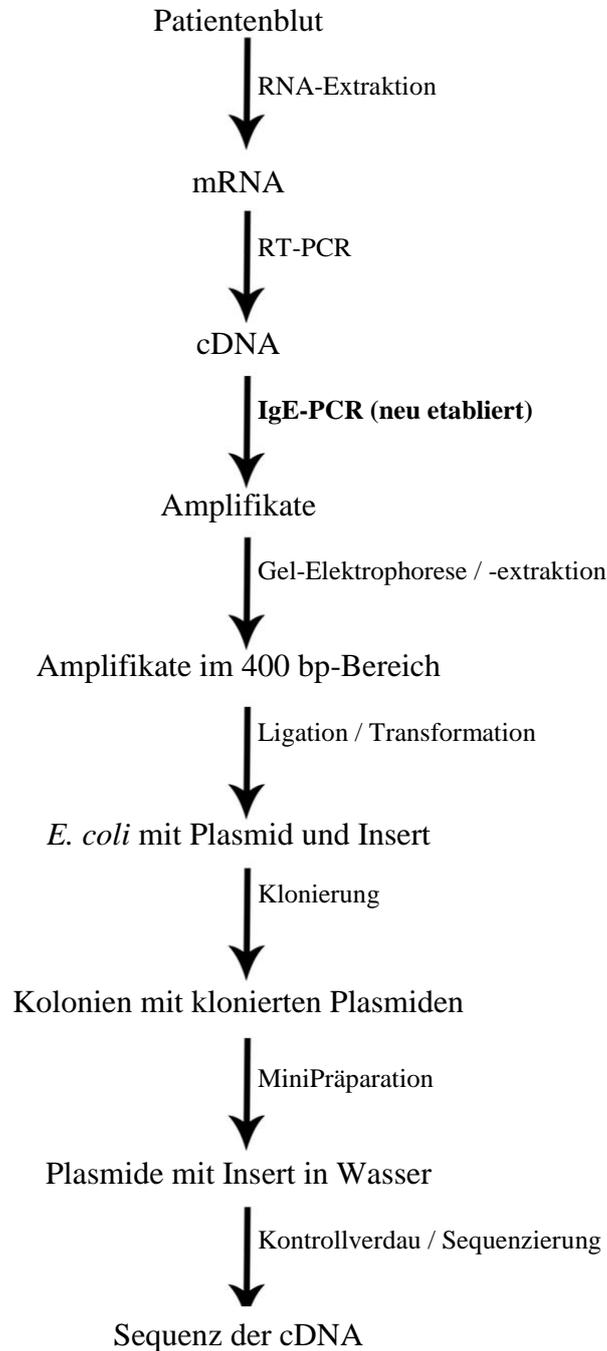


Abbildung 4: Arbeitsschritte der IgE-Sequenzerhebung

Die Abbildung illustriert in welchen Schritten die Sequenzen der IgE Antikörper aus Patientenblut gewonnen wurden. Durch die neu etablierte hochsensitive IgE-PCR gelang dies mit sehr geringen Blutvolumina.

3.2 Patientenkollektiv

Die Patienten wurden zwischen Dezember 2006 und Dezember 2007 in der kinderallergologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg betreut. Dabei wurden 13 Kinder im Alter von 3 - 16 Jahren in die Studie eingeschlossen (**Tab. 1**). Bei jedem der Kinder wurde die Diagnose eines allergischen Bronchialasthma nach den Kriterien des PRACTALL *consensus report* (Bacharier et al. 2008) bzw. der GINA 2008 (*Global Initiative for Asthma: Global strategy for asthma management and prevention*; <http://www.ginasthma.com>) gestellt. Nach Aufklärung der Kinder und ihrer Eltern wurde eine schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie eingeholt. Im Rahmen einer klinisch indizierten Blutentnahme wurden zusätzlich 2 ml EDTA⁺-Blut entnommen. Es fand keine Blutentnahme zu reinen Studienzwecken statt. Eine zustimmende Bewertung der Studie durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg (Antragsnummer 24/07) lag vor.

Nr.	Alter (a)	G	Gesamt- IgE (kU/l)	Diagnose	Haut-Pricktest [≥ 0.6 Histamin Ø]
1	12	M	1.054	AA, AD	HDM, GP, RP, Bi, Kan
2	13	M	941	AA	GP, RP, KH, Kan
3	5	W	311	AA	HDM, GP, RP, Bu, HH
4	14	W	375	AA, ARC	Bi, Er, Hz, Bu
5	8	M	94	AA	HDM, GP, RP, HH
6	5	M	184	AA	GP, RP, BF, Bi, Er, Hz, KH, Kan, CH, Aa, Af
7	3	M	393	AA	GP, RP
8	5	W	932	AA, AD, NA	HDM, KM, HN
9	13	M	2.257	AA, ARC	HDM, GP, RP, BF, Bi, Er, Hz, KH, HH
10	7	M	671	AA, AD	HDM, GP, RP, Bi, Bu, KH, Pf
11	4	M	3.000	AA, AD, ARC, NA	GP, RP, BF, Bi, Bu, HH, HE
12	6	M	6.931	AA, AD, ARC	HDM, GP, KH
13	16	M	2.945	AA, AD, ARC	GP, RP, SW, KH, HH, Pf, Kan, CH

Tabelle 1: Charakterisierung des Patientenkollektivs

Alter: Alter bei Probenentnahme; **G:** Geschlecht; **M:** männlich; **W:** weiblich; **AA:** Allergisches Asthma; **AD:** Atopische Dermatitis; **ARC:** Allergische Rhinokonjunktivitis; **NA:** Nahrungsmittelallergie; **HDM:** Hausstaubmilbe; **GP:** Graspollen; **RP:** Roggenpollen; **Bi:** Birke; **Kan:** Kaninchen; **KH:** Katzenhaar; **Bu:** Buche; **HH:** Hundehaar; **Er:** Erle; **Hz:** Hasel; **KM:** Kuhmilch; **HN:** Haselnuss; **BF:** Beifuss; **Pf:** Pferd; **HE:** Hühnerei; **SW:** Spitzwegerich; **CH:** Cladosporium herbarum; **Aa:** Alternaria alternaria; **Af:** Aspergillus fumigatus

3.3 RNA-Extraktion

Material:

RNA-Extraktionskit QIAamp RNA Blood Mini-Kit	Qiagen; Hilden, D
QIAshredder	Qiagen; Hilden, D
RLT-Puffer	Qiagen; Hilden, D
Wasch-Puffer	Qiagen; Hilden, D
RNase-freies Wasser	Invitrogen; Darmstadt, D
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorf; Hamburg, D

Geräte:

Zentrifuge (5417R)	Eppendorf; Hamburg, D
--------------------	-----------------------

Durchführung:

Mit Hilfe des RNA-Extraktionskit wurde die RNA aus dem Blut gewonnen. Zusammenfassend wurden hierzu die Erythrozyten durch zweimalige Inkubation mit Lysepuffer auf Eis lysiert, und die Lösung anschließend bei 400 g zentrifugiert. Die im entstandenen Pellet verbliebenen Leukozyten wurden durch Resuspension in RLT-Puffer ebenfalls lysiert und anschließend in den QIAshredder überführt und bei 10.400 g zentrifugiert. Dann wurde das Filtrat mit 70%igem Ethanol auf eine Extraktionssäule gegeben und bei 8.000 g zentrifugiert.

Durch dreimaliges Waschen mit Wasch-Puffer wurde die in der Säule verbliebene RNA gereinigt, um im letzten Schritt mit RNase-freiem Wasser aus der *QIAamp Spin Column* in ein autoklaviertes Eppendorf-Reaktionsgefäß wieder herausgelöst zu werden.

3.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Material:

Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl)	invitrogen; Karlsruhe, D
dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	invitrogen; Karlsruhe, D
Rnase-freies Wasser	invitrogen; Karlsruhe, D
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	invitrogen; Karlsruhe, D
Super Script III Reverse Transkriptase (RT)	invitrogen; Karlsruhe, D
5x First strand buffer	invitrogen; Karlsruhe, D
0,1 M Dithiothreitol (DTT)	invitrogen; Karlsruhe, D

Geräte:

Thermocycler (labcyler 011-101)	Sensoquest; Göttingen, D
---------------------------------	--------------------------

Durchführung:

Bei der reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) werden DNA-Stränge (cDNA) hergestellt, die den vorhandenen RNA-Strängen komplementär sind.

Um eine optimale Primeranlagerung (*Annealing*) zu gewährleisten, wurden RNase freies Wasser, der Oligo(dT)-Primer, der dNTP-Mix, sowie die vorhandene RNA in ein autoklaviertes PCR-Cup gegeben und bei 65°C für 5 min. inkubiert. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch *RNaseOut*, die Reverse Transkriptase, *First strand buffer*, sowie DTT zugegeben und die PCR-Cups in den auf 50°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Nun wurden folgende Zyklen durchlaufen:

- 1.) Elongation bei 50°C für 60 min (*Hot Start-PCR*)
- 2.) Elongation bei 70°C für 15 min
- 3.) 4°C bis zur weiteren Verwendung der cDNA

Die hergestellten Amplifikate wurden dann als *templates* in darauf folgenden PCR genutzt.

3.5 IgE-PCR

Materialien:

Platinum Taq DNA Polymerase	invitrogen; Karlsruhe, D
MgCl ₂ -Lsg. [50 mM]	invitrogen; Karlsruhe, D
10x PCR Puffer	invitrogen; Karlsruhe, D
dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	invitrogen; Karlsruhe, D
Rnase-freies Wasser	invitrogen; Karlsruhe, D
cDNA	(hergestellt nach 3.3)

Primer:

Sense Primer:

FR1.MIX als Gemisch aus folgenden 6 Primern:

FR1.1 forward: 5'-CCT CAG TGA AGG T(CT)T CCT GCA AGG C-3'

FR1.2 forward: 5'-GTC CTG CGC TGG TGA AA(CT) CCA CAC A-3'

FR1.3 forward: 5'-GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG-3'

FR1.4 forward: 5'-GAC CCT GTC CCT CAC CTG C(AG)C TGT C-3'

FR1.5 forward: 5'-AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG A(AG)G A-3'

FR1.6 forward: 5'-ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G-3'

Antisense Primer (Cε1 outer):

5'-CAG CAA GCT GAT GGT GGC ATA GTG-3'

Antisense Primer (Cε1 inner):

5'-ATG TTT TTG CAG CAG CGG GTC AAG-3'

GAPDH-Sense Primer (hGAPDH2):

5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3'

GAPDH-Antisense Primer (hGAPDH1):

5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'

Geräte:

Thermocycler (labcyler 011-101)	Sensoquest; Göttingen, D
---------------------------------	--------------------------

Durchführung:

Um IgE mit hoher Sensitivität zu amplifizieren, waren zwei aufeinander folgende PCRs nötig. Eine hohe Spezifität der entstehenden Amplifikate wurde durch eine *semi-nested-PCR* gewährleistet. Als *sense Primer* diente in beiden Reaktionen ein Gemisch aus sechs Primern (FR1.MIX), die für jede der sechs Genfamilien des V-Segments (IGHV1 – IGHV6) spezifisch sind. Diese wurden mit zwei *antisense Primern* kombiniert, die in der konstanten Region (CH ϵ 1) binden. Der *antisense Primer* der Reamplifikation (C ϵ 1 inner) lagerte sich vor dem *antisense Primer* der Primäramplifikation (C ϵ 1 outer) an (**Abb. 5**).

Auf einem weitestgehend DNA/RNA-freien Arbeitsplatz wurde nach folgendem Schema (**Tab. 2**) ein Mastermix für die Primäramplifikation hergestellt:

Tabelle 2: Pipettierschema der *semi-nested* IgE-PCR

	μl / Ansatz
Primer FR1.MIX [30 $\mu\text{mol/l}$]	1
Primer C ϵ 1 outer [10 $\mu\text{mol/l}$]	1
10x PCR Puffer	5
MgCl ₂ [50 mmol/l]	1,5
dNTPs [10 mmol/l]	1
Platinum Taq-Polymerase	0,4
Aqua dest.	ad 48
Gesamtvolumen	48

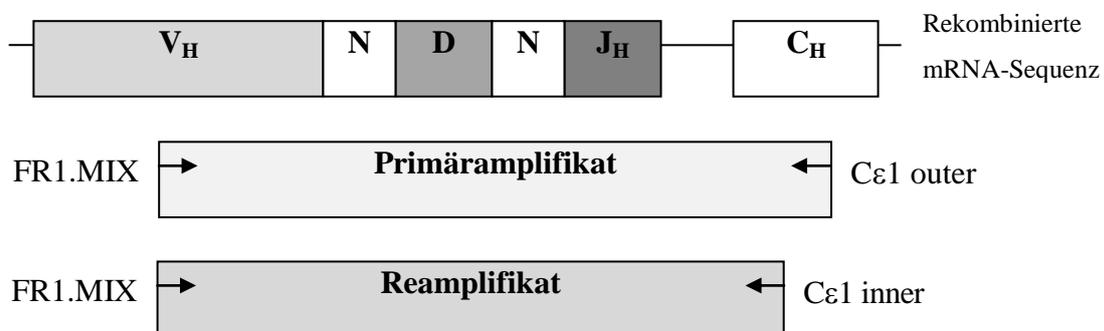
Nach Aufteilen des Mastermix auf sterile PCR-Cups wurden jedem Cup 2 µl der cDNA zugefügt. Der Leerwertkontrolle wurde anstatt der cDNA 2 µl steriles Wasser hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurden zwei PCR-Cups angesetzt, die den gleichen Mastermix, jedoch die Primer für die Amplifizierung von GAPDH (hGAPDH1 und hGAPDH2) enthielten. Einem der GAPDH-Cups wurden ebenfalls 2 µl cDNA zugefügt, dem anderen 2 µl steriles Wasser.

Die so vorbereiteten PCR-Cups wurden in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Folgende PCR-Schritte wurden durchlaufen:

- 1.) initiale Denaturierung bei 94°C für 5 min (*Hot Start-PCR*)
 - 2.) Denaturierung bei 94°C für 30 sec
 - 3.) Primer-Anlagerung bei 62°C für 50 sec
 - 4.) Elongation bei 72°C für 90 sec
 - 5.) Terminale Elongation bei 72°C für 10 min
 - 6.) 4°C bis zur Reamplifikation
- } 35x

Nach erfolgter Primäramplifikation wurde erneut ein Mastermix nach **Tab. 2** hergestellt, wobei der Primer Cε1 outer durch den Primer Cε1 inner ersetzt wurde (= *semi-nested-PCR*). Die PCR-Cups wurden mit je 2 µl Primäramplifikat bzw. sterilem Wasser aufgefüllt und in den vorgeheizten Thermocycler gestellt. Das Thermocyclerprotokoll der Reamplifikation entsprach dem der Primäramplifikation.

Abbildung 5: Primerbindungsstellen der *semi-nested* IgE-PCR



3.6 Gel-Elektrophorese und Gel-Extraktion

Material:

Agarose	Biozym; Hessisch Oldendorf, D
<i>100 Base-Pair Ladder</i>	Amersham; Braunschweig, D
<i>6x Orange Loading Dye Solution</i>	Fermentas; St. Leon-Rot, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen; Hilden, D
TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)	laboreigene Herstellung
1x TBE Puffer:	10,75 g Tris Base
	5,50 g Borsäure
	0,74 g EDTA Na ₂ x 2 H ₂ O
	ad 1000 ml Aqua dest.
TRIS-Base	Fisher Scientific; Nidderau, D
Borsäure	Fisher Scientific; Nidderau, D
EDTA-Na ₂	Sigma Aldrich; München, D
0,001% Ethidiumbromid	Roth; Karlsruhe, D

Geräte:

Gelkammer	Owl; Portsmouth, USA
Spannungsquelle (E143)	consort; Turnhout, B
Fotoeinheit (06 133390)	Vilber Lourmat; Eberhardzell, D
Zentrifuge (5417R)	Eppendorf; Hamburg, D

Durchführung:

Mittels Gel-Elektrophorese wurden die PCR-Produkte ihrer Länge nach aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht (**Abb. 10** im Ergebnisteil). Dazu wurde ein 2%iges Agarose-Gel (mit TBE-Puffer) verwendet, das mit 0,001% Ethidiumbromid gefärbt war. Es wurden je 16 µl Probe mit 4 µl *Loading Dye Solution* sowie eine 100 bp DNA-Leiter, als Größenstandard aufgetragen. Amplifikate in einem Längenbereich um 400 bp wurden unter UV-Licht ausgeschnitten. Aus den ausgeschnittenen Gelstücken wurde dann, gemäß Herstellervorschrift, mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*, die DNA extrahiert.

3.7 Ligation, Transformation und Klonierung

Material:

TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter	Invitrogen; Karlsruhe, D
LB Agar	Sigma; Steinheim, D
LB Base	Sigma; Steinheim, D
Ampicillin	Sigma; Steinheim, D
X-Gal	Promega; Mannheim, D
Salt solution	aus TOPO TA Cloning Kit
SOC-Medium	aus TOPO TA Cloning Kit

Geräte:

Thermomixer	HLC; Bovenden, D
Brutschrank (B15)	Heraeus; Hanau, D

Durchführung:

Durch die Klonierung der DNA-Fragmente in kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen wurde das Gemisch der Amplifikate im 400 bp-Bereich in einzelne DNA-Fragmente aufgetrennt. Hierzu wurde die amplifizierte DNA in Plasmide mit Ampicillinresistenz und Lac-Z (Gen für die β -Galaktosidase) eingebaut (Ligation) (**Abb. 6**). Die Plasmide wurden in *E. coli* Zellen transformiert, die auf Agarplatten kultiviert wurden. Für die Ligation wurden das PCR-Produkt, TOPO-salt solution, Wasser und der TOPO-Vektor (Plasmid) 5 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) inkubiert. Der in geöffneter Form vorliegende TOPO-Vektor enthielt an beiden Enden einen Thymidin-Überhang, an den der Adenosin-Überhang des PCR-Produkts binden konnte. So bildete sich ein zirkulärer Vektor mit jeweils einem PCR-Produkt (**Abb. 6**).

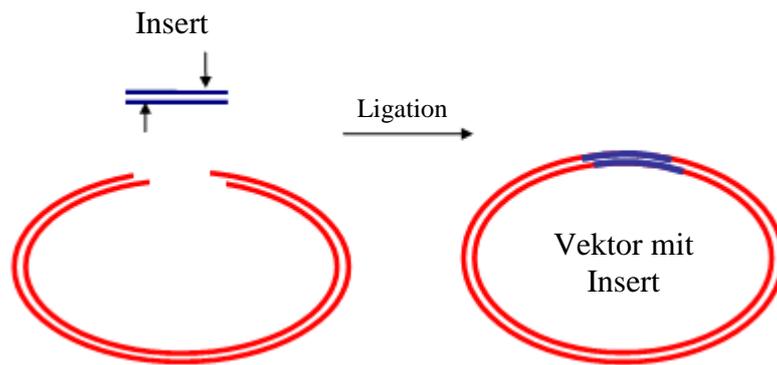


Abbildung 6: Ligation des PCR-Produkts in den TOPO-Vektor
(modifiziert nach Andymuc 2005)

Der Adenosin-Überhang des Amplifikats bindet an den Thymidin-Überhang des vorgeschneideten TOPO-Vektors. Es bildet sich ein zirkulärer Vektor mit jeweils einem PCR-Produkt. Das Insert enthält das Ampicillin-Resistenz-Gen und unterbricht die Basenfolge des LAC-Z-Gens des Vektors.

Zur anschließenden Transformation (**Abb. 7**) wurde der Ligationansatz 30 Minuten mit den *E. coli* Bakterien auf Eis inkubiert und für 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurde SOC-Medium (Nährmedium mit Caseinhydrolysat, Hefeextrakt, Glucose und Elektrolyten) dazugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Die so transformierten *E. coli* Zellen wurden auf Agarplatten, die Ampicillin (100 mg/ml) und X-Gal (35 µl) enthielten, ausgestrichen und 20 Stunden bei 37°C bebrütet. In diesem Zeitraum wuchsen einzelne Bakterien zu Kolonien heran. Um nur Bakterien weiterzuverarbeiten, die Vektoren mit PCR-Produkt enthielten, fand eine zweifache Selektion statt. Da die Agarplatten mit Ampicillin präpariert waren, konnten nur *E. coli* Zellen wachsen, die das Plasmid mit Ampicillin-Resistenz-Gen erfolgreich integriert hatten. Die Selektion der Plasmide mit Insert erfolgte durch das im TOPO-Vektor enthaltene LAC-Z-Gen. Die erfolgreich transformierten Bakterien ohne Insert produzierten β -Galaktosidase, die das X-Gal auf den Agarplatten spaltete. So entstand unter O₂-Einfluss ein unlöslicher Farbstoff, der diese Kolonien blau färbte. Enthielt der Vektor jedoch das Insert, war also die Ligation erfolgreich, wurde die Basenfolge des LAC-Z-Gens unterbrochen und die Zellen konnten keine β -Galaktosidase herstellen. Die Kolonien erschienen weiß. Somit wurden ausschließlich weiße, einzeln stehende Klone gepickt und in 1,7 ml LB-Medium mit Ampicillin weitere 20 Stunden bei 37°C geschüttelt.

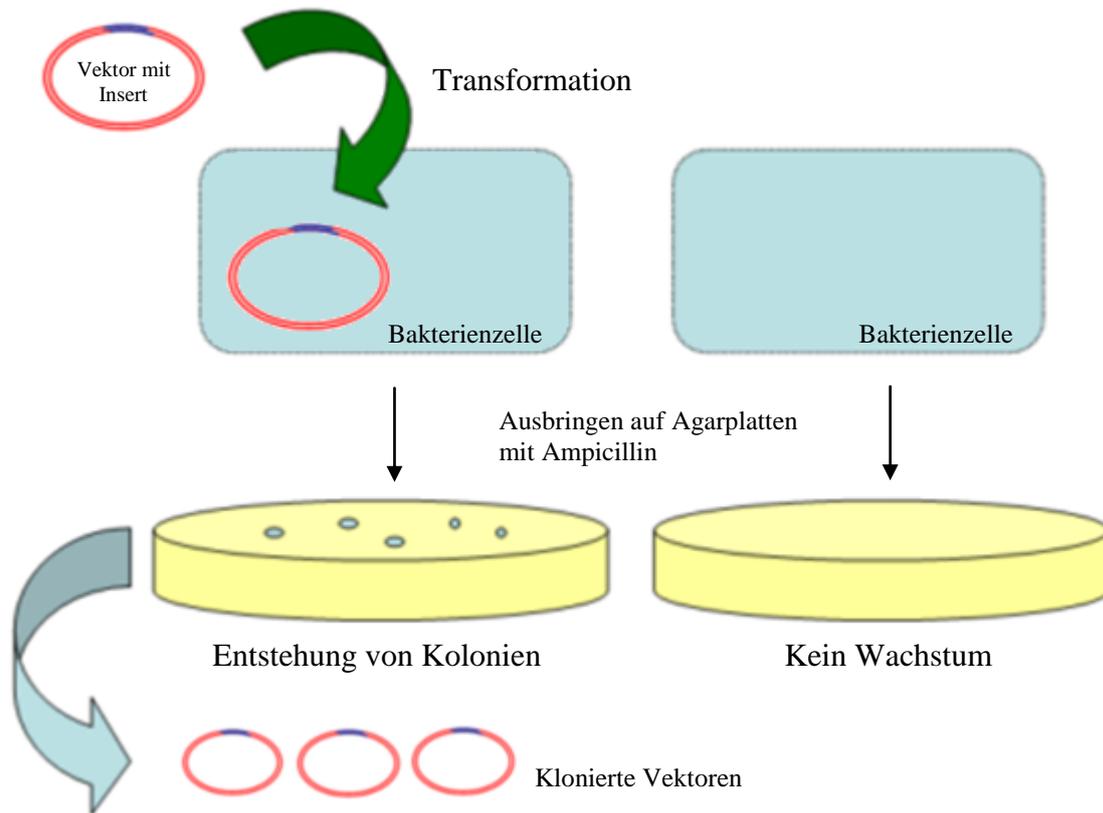


Abbildung 7: Transformation von Plasmiden in kompetente E. coli-Zellen

(modifiziert nach Andymuc 2005)

Mit den Plasmiden nehmen die E. coli-Zellen das Ampicillin-Resistenz- und das LAC-Z-Gen auf. Da die Agaroseplatten Ampicillin enthalten, können nur erfolgreich transformierte Zellen Kolonien bilden. Enthält ein Bakterium einen Vektor ohne PCR-Produkt, ist das LAC-Z-Gen intakt. Diese Zellen können β -Galaktosidase herstellen, die das X-Gal, mit dem die Platten bestrichen sind, spalten. Dabei entsteht ein blauer Farbstoff, welcher die Kolonien blau erscheinen lässt. Bei erfolgreicher Ligation des PCR-Produkts wird die Basenfolge des LAC-Z-Gens im TOPO-Vektor unterbrochen und die Zellen verlieren die Fähigkeit, β -Galaktosidase zu produzieren. Das X-Gal wird nicht gespalten, die Kolonien erscheinen weiß. Deshalb wurden zur weiteren Verarbeitung ausschließlich weiße Kolonien genutzt.

Durchführung:

Der Insertkontrollverdau diente als abschließende Kontrolle der Proben, die sequenziert werden sollten. Hierzu wurde ein Enzymmix aus *salt solution*, Wasser und dem EcoRI-Enzym hergestellt und 16 µl dieses Gemisches mit 4 µl Probe für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Das EcoRI-Enzym schnitt die Amplifikate aus den Plasmiden heraus. Durch Gel-Elektrophorese wurde die Länge der herausgetrennten DNA-Stücke überprüft. Befand sich die Bande im Bereich um 400 bp wurde die Probe sequenziert.

3.10 Sequenzierung des PCR-Amplifikats

Die Sequenzierung fand im Labor der Firma GATC (Konstanz) statt. Dort wurden die eingeschickten Proben mit Hilfe des Sequenzierkits von Applied Biosystems (Weiterstadt, D) und einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger bearbeitet. Als Primer dieser Reaktion diente der Primer T7 (5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'). Nach der Sequenzierung erhielten wir die Sequenzen der IgE- und IgM-Transkripte als Dateien im FASTA-Format. Im Folgenden ist die Sequenz eines repräsentativ ausgewählten IgE-Transkripts beispielhaft aufgetragen (**Abb. 8**).

>3203199.ID: _Pat-IgE_on_2...

```
gtgatggatatctgcagaattgcccttgggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattacctttagtagtcactggata
agttgggtccgccaggtccaggggaagggactggagtggtggccaacataaaccaagacggaagtgagaaatactatgt
ggactctgtgaagggccgattccatctccagagacaacgccaagaattcactgtatctgcaaatgagtagcctgagagcc
gaggactcggctgtctattactgtgcgattgccctacattattatgataatagtgcgtattatgtggactggfacticgatctctgg
ggccggggcaccctggctactgtctcctcagctccacacagagcccatccgtcttccccttgacctgctgcaaaaacat
aagggcgaattccagcacactggcggccgttactagtggatccgagctcggtagccaagcttggcgtaatcatggatagct
gtttcctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgccta
atgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgtgccagctgcattaatga
atcgccaacgcgcggggagagggcgtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggctcgt
tcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgg
```

Abbildung 8: Nukleinsäuresequenz eines beispielhaften IgE-Transkripts

g: Guanin; a: Adenin; t: Thymin; c: Cytosin

3.11 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse fand mit Hilfe der IMGT (*ImMunoGeneTics*) Datenbank und dem Programm V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/>) statt. So wurden die erhobenen Sequenzen den bekannten V_H-, D-, und J_H-Gensegmenten der Keimbahn zugeordnet und eine Mutationsanalyse durchgeführt (**Abb. 9**). Zur Identifizierung eines D-Genes waren minimal sechs nicht mutierte Nukleotide mit mindestens zwei nicht mutierten Nukleotiden an den Enden nötig. Nur ein D-Gensegment pro Sequenz wurde zugelassen. Wir definierten die CDR-H3 als das Stück zwischen dem konservierten Cystein (C104) der FR-H3 und dem konservierten Tryptophan (W118) der FR-H4. Nicht eindeutig auswertbare Sequenzen wurden manuell mit dem ABI-Elektropherogramm überprüft und bei uneindeutiger Nukleotidsequenz verworfen. Um die Frequenz der Antigen-selektierten Sequenzen darzustellen, nutzten wir die Algorithmen von (Lossos et al. 2000) und (Chang and Casali 1994) zur statistischen Analyse von *replacement* und *silent* Mutationen in den V_H-Gensegmenten. Die Darstellung der phylogenetischen Bäume erfolgten mit den Programmen *ClustalX* (www.ebi.ac.uk) (Larkin et al. 2007) und *Treedyn* (www.treedyn.org) (Chevenet et al. 2006).

Result summary:

Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)

V-GENE and allele IGHV3-7*01 score = 1040 identity = 87,13% (237/272 nt)

J-GENE and allele IGHJ2*01 score = 238 identity = 94,34% (50 / 53 nt)

D-GENE and allele IGHD3-22*01 D-REGION is in reading frame 2

[CDR1-IMGT.CDR2-IMGT.CDR3-IMGT] lengths and AA JUNCTION [8.8.20]

Alignment with FR-IMGT and CDR-IMGT delimitations

```
3203199.ID: Pat-IgE <-----FR1-IMGT-----
M99649 IGHV3-7*01 .....gtgatggatat...ctgcagaattcgcccttggggtccctgaga
gaggtgcagctggtggagtc---ggga...ggctt-gtcca---tgg-----

----->-----CDR1-IMGT-----<-----
3203199.ID: Pat-IgE ctctcctgtgcagcctctggatttaccttt.....agtagtcactggataagt
M99649 IGHV3-7*01 -----c-----.....-ct-t-----g--c

-----FR2-IMGT----->-----CDR
3203199.ID: Pat-IgE tgggtccgccaggctccaggaaggactggagtggtggccaacataaaccaagac...
M99649 IGHV3-7*01 -----g-----g-----t...

2-IMGT <-----
3203199.ID: Pat-IgE ...ggaagtgagaaataactatgtggactctgtgaag...ggccgattcacatctccaga
M99649 IGHV3-7*01 .....

-----FR3-IMGT-----
3203199.ID: Pat-IgE gacaacgccaagaattcactgtatctgcaaatgagtagcctgagagccgaggactcggct
M99649 IGHV3-7*01 -----c-----ac-----a-----

----->-----CDR3-IMGT-----
3203199.ID: Pat-IgE gtctattactgtgcgattgcctacattattatgataaatagtgcgtattatgtggactgg
M99649 IGHV3-7*01 --g-----ga-a

tacttcgatctctggggcggggcaccctggtcactgtctcctcagcctccacacagagc
M99649 IGHV3-7*01
```

Abbildung 9: Sequenzanalyse mit Hilfe von IMGT/V-QUEST

Der Teil „*result summary*“ der Abbildung zeigt die Zuordnung der V_H-, D-, J_H-Gensegmente aus der IMGT-Datenbank zur analysierten Sequenz. Im Teil „*Alignment*“ ist aufgeschlüsselt welche Sequenzabschnitte des analysierten V_H-Gens (3203199.ID: Pat-IgE_on_2) die jeweiligen Bereiche im Immunglobulinmolekül kodieren. Ebenfalls aufgetragen ist die Sequenz des zugeordneten V_H-Gens aus der Datenbank (IGHV3-7*01) um eventuelle Abweichungen in der Sequenz offenzulegen.

FR1,2,3: *framework region 1,2,3*; **CDR1,2,3:** *complementarity determining region 1,2,3*

3.12 Statistische Auswertung

Die Berechnungen zur Fallzahlanalyse wurden in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Aus der Analyse eigener Voruntersuchungen ergaben sich folgende Zahlen:

Um signifikante Unterschiede im Repertoire der Primär- bzw. IgE-Antikörper nachzuweisen (Vorgaben: t-Test für unabhängige Stichproben, Alpha = 0.05 und Beta = 0.2; Fallzahlberechnung mit dem Programm NCSS 2002), müssen pro Repertoire mindestens 10 Patienten à 28 Sequenzen untersucht werden.

Die statistischen Analysen wurden mithilfe von *GraphPad Prism 5.0* (La Jolla, USA) und *SPSS v.17.0* (Chicago, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung einer Population wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Statistische Signifikanzen wurden ermittelt mittels Zweistichproben t-Tests für normalverteilte Daten oder mittels des U-Tests nach Mann-Whitney für nicht-normalverteilte Daten. Für kategorische Daten wurde ein Chi-Quadrat-Test mit *post hoc* Analyse, wie von (Collis et al. 2003) beschrieben, angewandt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant angesehen. Falls nicht anders angegeben wurden die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 1.366 funktionelle IgE-Sequenzen von 13 Kindern gewonnen. 473 dieser 1.366 Sequenzen waren *unique*, also nicht redundant (GenBank accession nos. FJ839966-FJ840439). Dies ist die bis *dato* größte Datenbank humaner IgE-Sequenzen. Als Referenz dienten 308 funktionelle IgM-Sequenzen von denen 281 *unique* waren (GenBank accession nos. FJ873815-FJ874095). **Abb. 10** zeigt ein repräsentatives Agarosegel, das die Amplifikation der Schwerketten-cDNA von IgE und IgM demonstriert.

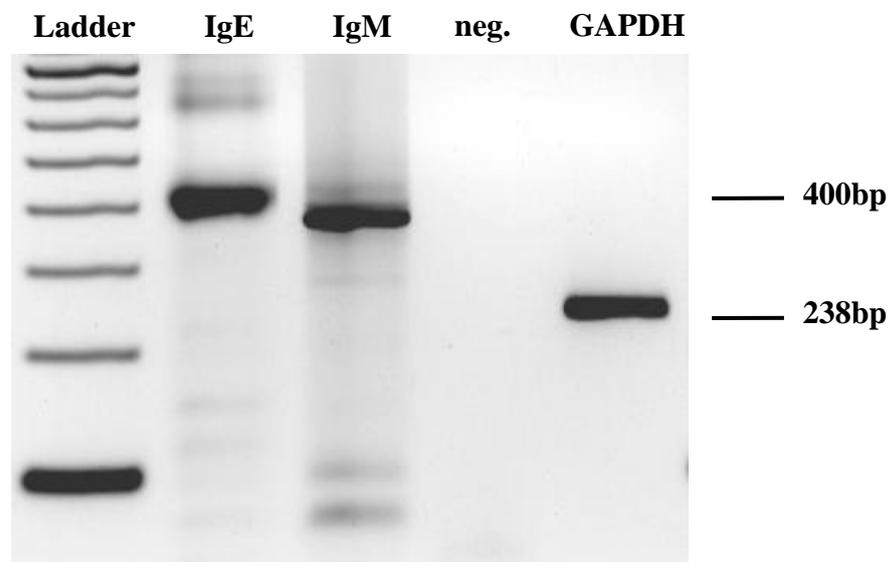


Abbildung 10: Agarose-Gel mit amplifizierter IgE- und IgM-Schwerketten-cDNA

Mithilfe der neu etablierten *semi-nested* PCR wurden Transkripte der schweren IgE-Ketten im Bereich von 400 Basenpaaren amplifiziert. Als Referenz gewannen wir IgM-Transkripte derselben Patienten. **neg:** DNA-freie Negativkontrolle; **GAPDH:** Positivkontrolle mit PCR-Produkten mit einer Länge von 238 Basenpaaren

4.1 Muster der V_H -, D- und J_H -Familiennutzung

Insgesamt wurden 30 individuelle V_H -Gene aus den Gruppen IGHV1, -2, -3, -4 und -5 für die IgM- und IgE-Sequenzen genutzt. Aus den kleinen Familien IGHV6 und -7 konnten keine Gen-Transkripte gefunden werden. Sowohl bei IgM als auch bei IgE war IGHV3 die dominierende Familie (IgM 56%; IgE 55%). Da IGHV3 die größte der V_H -Gruppen darstellt (s. Kapitel 2.3.2), entsprach die Verteilung der für die IgE-Transkripte

genutzten Gene ihrem Vorkommen auf der Keimbahn. Gene aus IGHV2 wurden für die IgM-Sequenzen signifikant häufiger genutzt als für IgE ($p < 0,001$). Es konnte jedoch keine bevorzugte Nutzung von Genen einer bestimmten Familie bei den IgE- gegenüber den IgM-Transkripten festgestellt werden. Das Verteilungsmuster der V_H -Genfamiliennutzung der IgE-Transkripte entsprach nahezu dem Muster der IgM-Transkripte (**Abb. 11**).

Bei 99,6% der IgE- (471 *unique*) sowie bei 96,8% der IgM-Sequenzen (272 *unique*) konnte ein D-Segment zugeordnet werden. IGHD3 wurde bei den IgE- gegenüber den IgM-Transkripten etwas bevorzugt ($p < 0,05$), war aber auch bei den IgM-Sequenzen die am häufigsten verwendete Familie. Sowohl bei IgE als auch bei IgM war IGHJ4 die mit Abstand häufigste J_H -Genfamilie. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Nutzung der J_H -Segmente zwischen den Isotypen festgestellt werden. Insgesamt war die Verteilung der D- und J_H -Genfamilien bei beiden analysierten Isotypen annähernd gleich und entsprach der statistischen Keimbahnverteilung (**Abb. 12**).

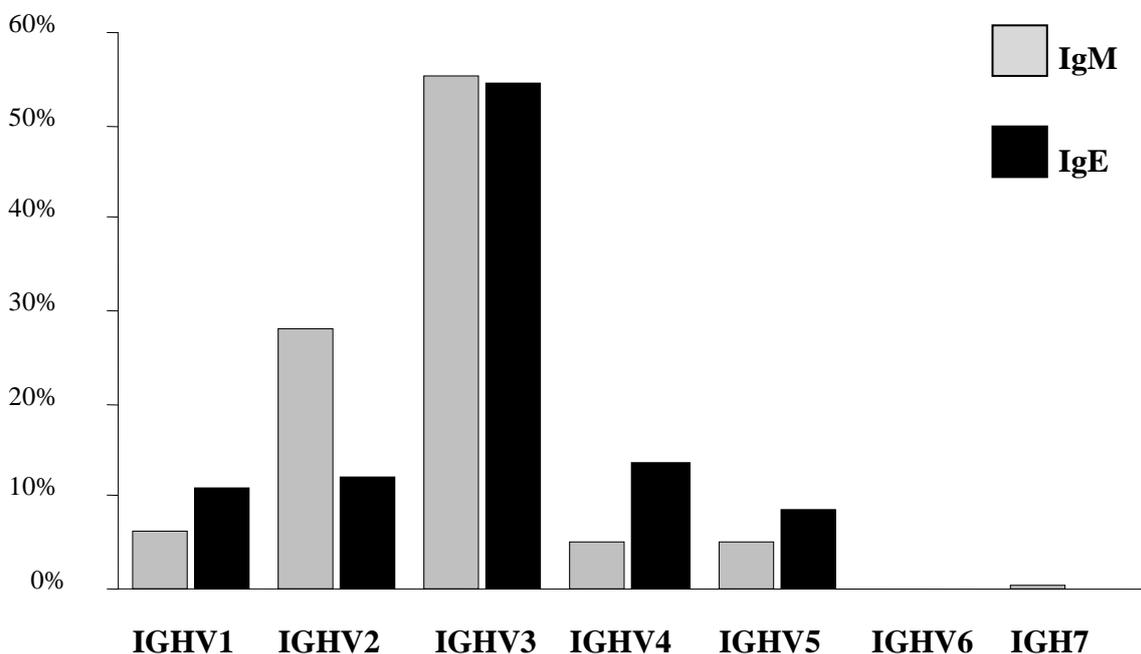


Abbildung 11: V_H -Familien-Nutzung der IgE- und IgM-Transkripte

Die Verteilung der bei den IgE-Transkripten genutzten V_H Familien entspricht ihrer Verteilung auf der Keimbahn. Insgesamt wurden 30 individuelle Gene aus allen V_H Familien (IGHV1, 2, 3, 4, 5) außer IGHV6 und IGHV7 für die IgE-, bzw. IgM-Transkripte genutzt. Bei beiden Isotypen war IGHV3 die dominierende V_H -Familie, während IGHV2 häufiger für IgM genutzt wurde ($p < 0,001$). Insgesamt ähneln sich die Verteilungsmuster der IgM- und IgE-Transkripte stark und es kann keine eindeutige Bevorzugung einer bestimmten Familie bei den IgE-Transkripten nachgewiesen werden.

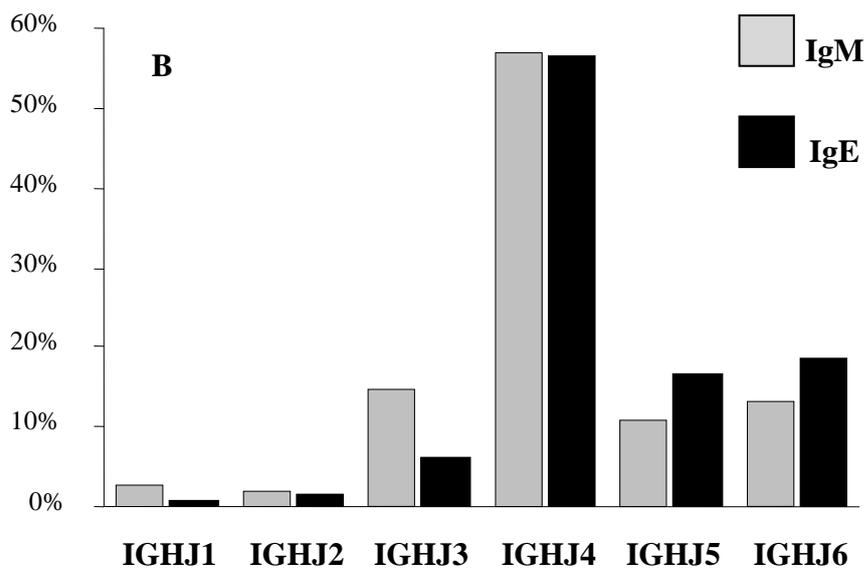
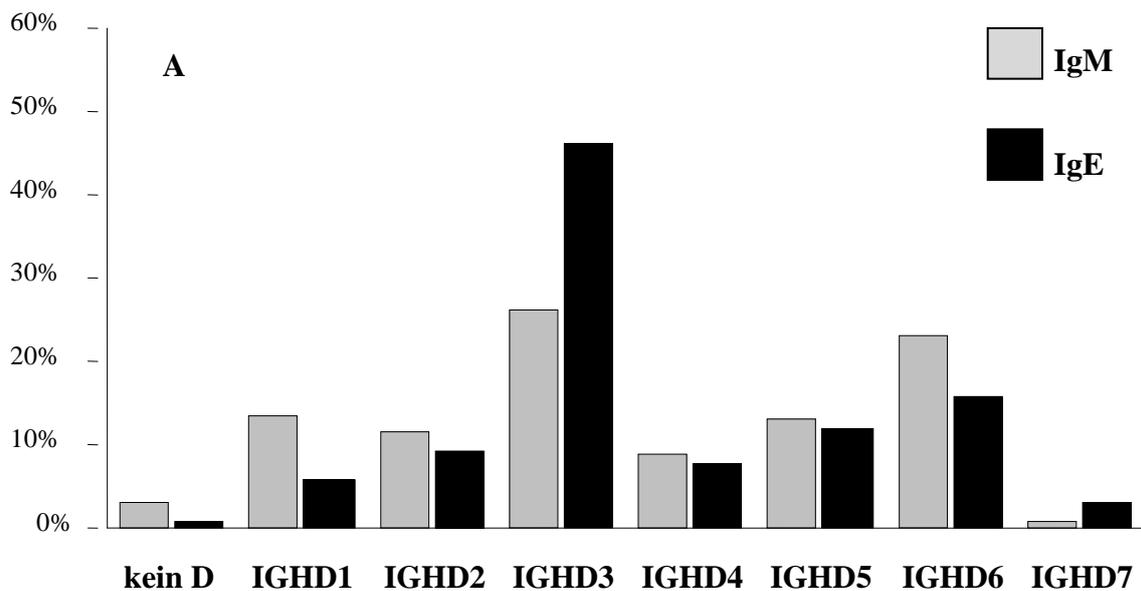


Abbildung 12: Verteilung der genutzten D- (A) und J_H- (B)-Genfamilien

471 der 473 *unique* IgE- und 272 der 281 *unique* IgM-Sequenzen zeigten ein D-Segment. IGHD3 wurde von IgE gegenüber IgM etwas bevorzugt ($p < 0,05$), war insgesamt aber auch bei IgM die am meisten genutzte D-Familie. IGHJ4 war bei beiden Isotypen die mit Abstand häufigste J_H-Genfamilie. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Nutzung der J_H-Gensegmente zwischen beiden Antikörperklassen gefunden werden. Das Verteilungsmuster der D- und J_H-Gensegmente der IgE entsprach dem bei den IgM-Antikörpern.

4.2 Länge und Zusammensetzung der CDR-H3

Sowohl die IgM- als auch die IgE-Transkripte wiesen mit 18 bis 81 Nukleotiden eine breite Verteilung der CDR-H3-Länge auf. Im Durchschnitt waren die CDR-H3 der IgE-Transkripte jedoch um ca. fünf Basenpaare länger (48.60 ± 12.52 bp) als die der IgM (42.94 ± 9.79 bp) ($p < 0.001$) (**Abb. 13**).

Um zu verstehen, welchen Anteil an der Gesamtlänge die V_HDJ_H -Keimbahnsequenz, das *exonucleolytic nibbling* und die Addition von N-Nukleotiden haben, analysierten wir die CDR-H3-Zusammensetzung der Sequenzen mit identifizierbarem D-Gen (**Abb. 13**). Hierbei fiel auf, dass das Muster der CDR-H3-Zusammensetzung der IgE-Sequenzen dem der IgM sehr ähnlich war. Die durchschnittliche Länge der V-Segmente war bei beiden Isotypen annähernd gleich. Signifikant länger bei den IgE-Transkripten waren jedoch die D-Segmente ($p < 0,01$) und die N-Regionen ($p < 0,01$). Dies spiegelt eine vermehrte Addition von N-Nukleotiden bei der somatischen Rekombination der IgE produzierenden Plasmazellen wider und erklärt die um ca. fünf Basenpaare längere Gesamtlänge der CDR-H3 der IgE-Sequenzen (**Abb. 14**).

4.3 Somatische Mutationsrate

Während ein großer Anteil der IgM-Sequenzen (31%) überhaupt nicht mutiert war, fanden wir bei den IgE-Transkripten keine einzige unmutierte Sequenz (0%). Die mittlere Mutationsrate der IgE-Sequenzen war mit 72‰ ebenfalls mehr als dreimal so hoch, wie die der IgM (20‰) ($p < 0,001$) (**Abb. 15**). Darüber hinaus wurden bei 59% der IgE-Sequenzen mehr als 50 Mutationen pro 1.000 Nukleotide gefunden. Dieser Gruppe der hoch mutierten Sequenzen gehörten hingegen nur 14% der IgM-Transkripte an ($p < 0,001$). Zur Abschätzung des *taq polymerase*-Fehlers bei der Amplifikation der Transkripte wurde die Fehlerrate in den konstanten Regionen der Antikörpersequenzen (C_H) ermittelt.

Diese war bei der Amplifikation der IgE 0,99 ‰ und 0,97 ‰ bei den IgM-Sequenzen. Somit sind die gefundenen Unterschiede in der somatischen Mutationsrate bei beiden Isotypen nicht durch einen *taq polymerase* Fehler erklärbar.

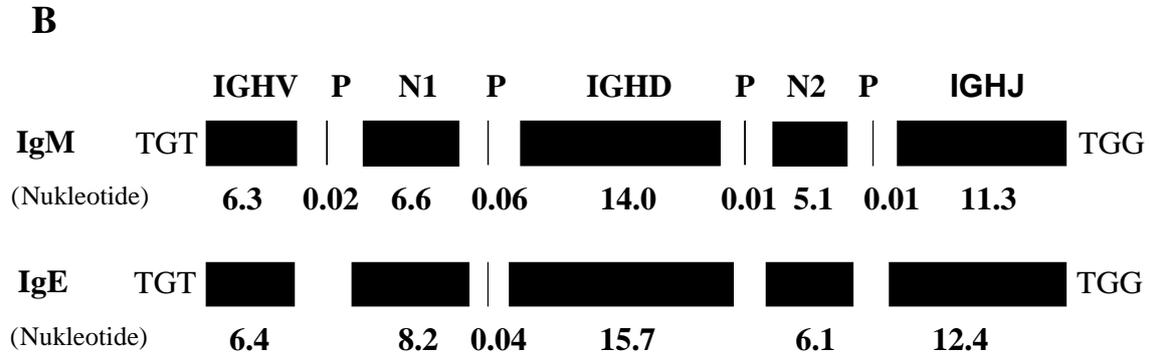
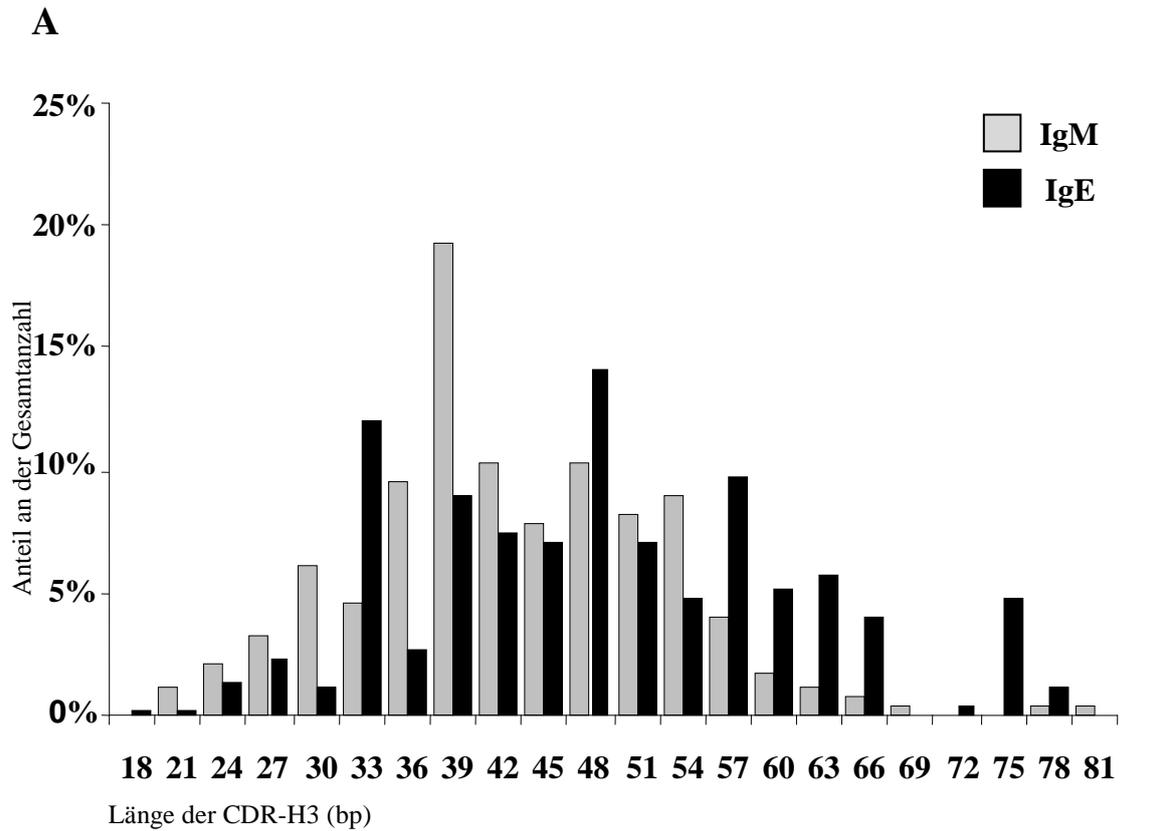


Abbildung 13: Längenverteilung (A) und Zusammensetzung (B) der CDR-H3

Beide Isotypen zeigten eine breite CDR-H3-Längenverteilung von 18 bis 81 Nukleotiden. Im Durchschnitt aber waren die IgE-Transkripte ca. fünf Basenpaare länger als die IgM-Transkripte. Um den Anteil der V_H , D- und J_H -Gene, sowie der N- und P-Nukleotide an der Gesamtlänge zu ermitteln, analysierten wir die Zusammensetzung der CDR-H3. Während das generelle Muster der Zusammensetzung der IgE-Transkripte dem der IgM entspricht, waren die vermehrte N-Nukleotid-Addition und längere D-Segmente für die längeren IgE CDR-H3 verantwortlich.

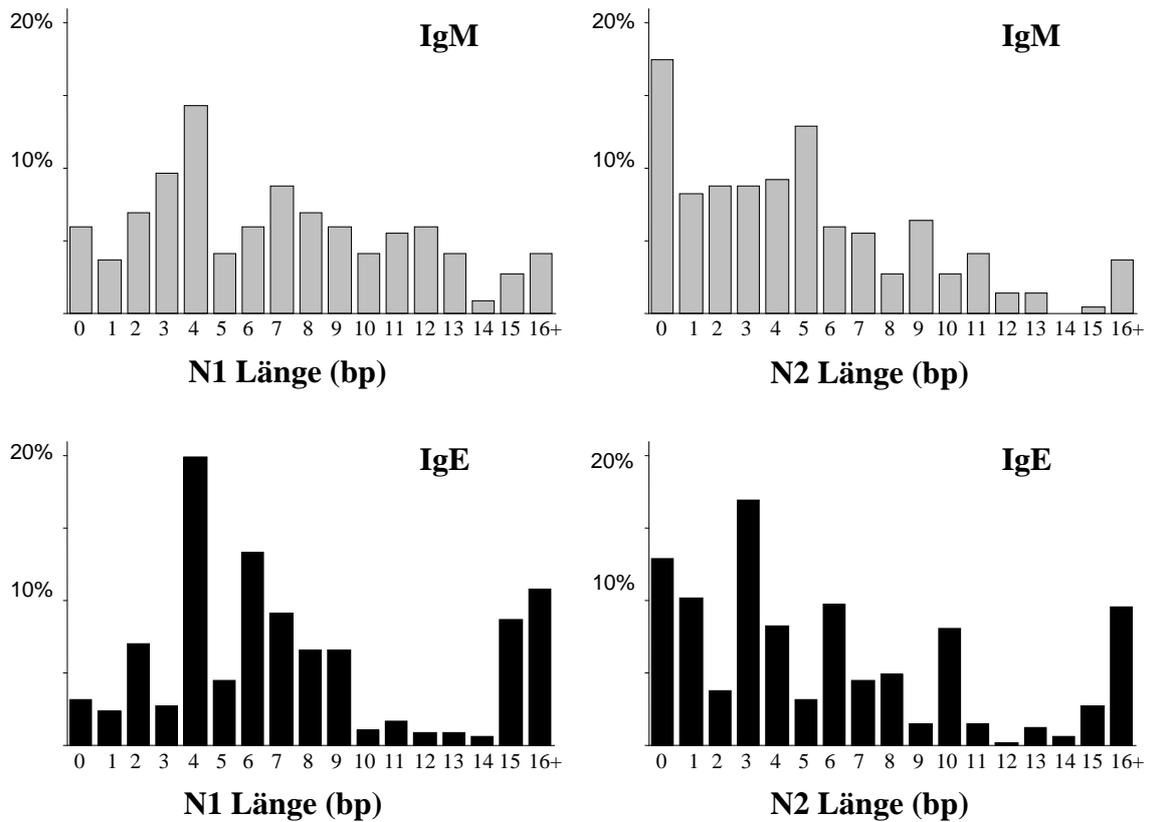


Abbildung 14: Längenverteilung der N-Regionen

Die längeren CDR-H3 der IgE-Transkripte wurden zum Teil verursacht durch eine signifikant vermehrte Addition von N-Nukleotiden ($p < 0,001$). Dies führt zu einer Verschiebung der Längenverteilung hin zu längeren N-Regionen der IgE Sequenzen.

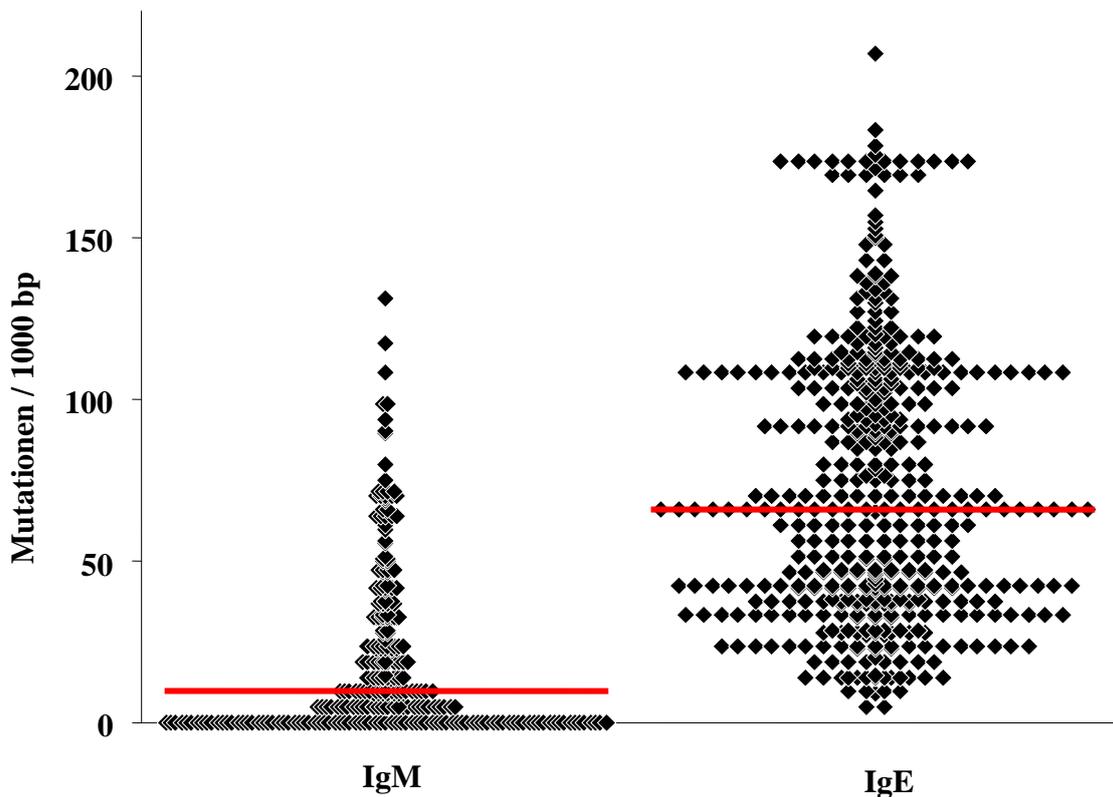


Abbildung 15: Somatische Mutationsrate (Mutationen / 1.000 Nukleotide)

Während 31% der IgM Sequenzen unmutiert waren, konnten wir keine nicht mutierte Sequenz unter den 1.366 funktionellen IgE Transkripten finden (0%). Die mittlere Mutationsrate der IgE-Transkripte lag bei 72‰ und somit mehr als dreimal höher als die der IgM (20‰) ($p < 0,001$). Außerdem zeigten 59% der IgE-Sequenzen eine Mutationsrate größer 50‰, während nur 14% der IgM-Transkripte in diese Gruppe der hoch-mutierten Sequenzen fiel. Die rot eingefärbten waagerechten Balken zeigen die Mediane.

4.4 Antigenselektion

Um zu beurteilen, ob sich die IgE-Sequenzen unter dem Einfluss von Antigenselektion entwickelt haben, wurde die Verteilung von *replacement* und *silent* Mutationen in den *framework regions* und den *complementarity determining regions* der variablen Domänen der schweren Immunglobulinketten analysiert. Nach der von Lossos und Kollegen publizierte Methode bestimmten wir die Frequenz von *replacement* Mutationen und die relativen Längen der FR und CDR aller V_H-Gene der Keimbahn (Lossos et al. 2000). So wurde errechnet, dass die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit mit der es zufällig zu einer Mutation innerhalb der CDRs kommt, bei $0,23 \pm 0,012$ liegt. Die Sequenz-inhärente Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine Mutation in den CDRs eine *replacement* Mutation ist, wurde mit $0,79 \pm 0,01$ berechnet. Somit war die Wahrscheinlichkeit, dass eine zufällige Mutation zu einer *replacement* Mutation innerhalb der CDRs führt, gleich 0,18. Das 95% Konfidenzintervall für das Verhältnis von *replacement* Mutationen in den CDRs (R_{CDR}) zu allen Mutationen in der variablen Region (M_V) wurde bestimmt mit der Binominalverteilungs-Methode (Chang and Casali 1994), wie von Dahlke *et al.* beschrieben (Dahlke et al. 2006). Dieses Konfidenzintervall ist in **Abb. 16** dargestellt als grau schattierter Bereich. Datenpunkte außerhalb dieses Bereichs repräsentieren Sequenzen, die überzufällig viele *replacement* Mutationen in den hypervariablen Schleifen der klassischen Antigenbindungsstelle aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit, dass solche Sequenzen diese Mutationen zufällig in diesem speziellen Bereichen so angehäuften haben, liegt unter 5%. Daher wurde eine Sequenz oberhalb des 95%-Konfidenzintervalls für die zufällige Anhäufung von *replacement* Mutationen in den hypervariablen Schleifen als signifikant antigenselektiert gewertet.

Gemäß dieser Definition zeigten 91% der IgM-Transkripte keine Zeichen der Antigenselektion (**Abb. 16**). Mehr als die Hälfte der IgM-Sequenzen (58%) hatte überhaupt keine *replacement* Mutationen in den CDRs und sind daher auf der Abszisse des Diagramms zu finden. Nur 9% der IgM-Sequenzen lagen außerhalb des 95% Konfidenzintervalls für zufällige Mutationshäufung. Die IgE-Transkripte hingegen zeigten einen wesentlich höheren Anteil an Antigen-selektierten Sequenzen (**Abb. 16**). 29% der *unique* IgE-Sequenzen lagen oberhalb des 95% Konfidenzintervalls für signifikante Antigenselektion ($p < 0.001$).

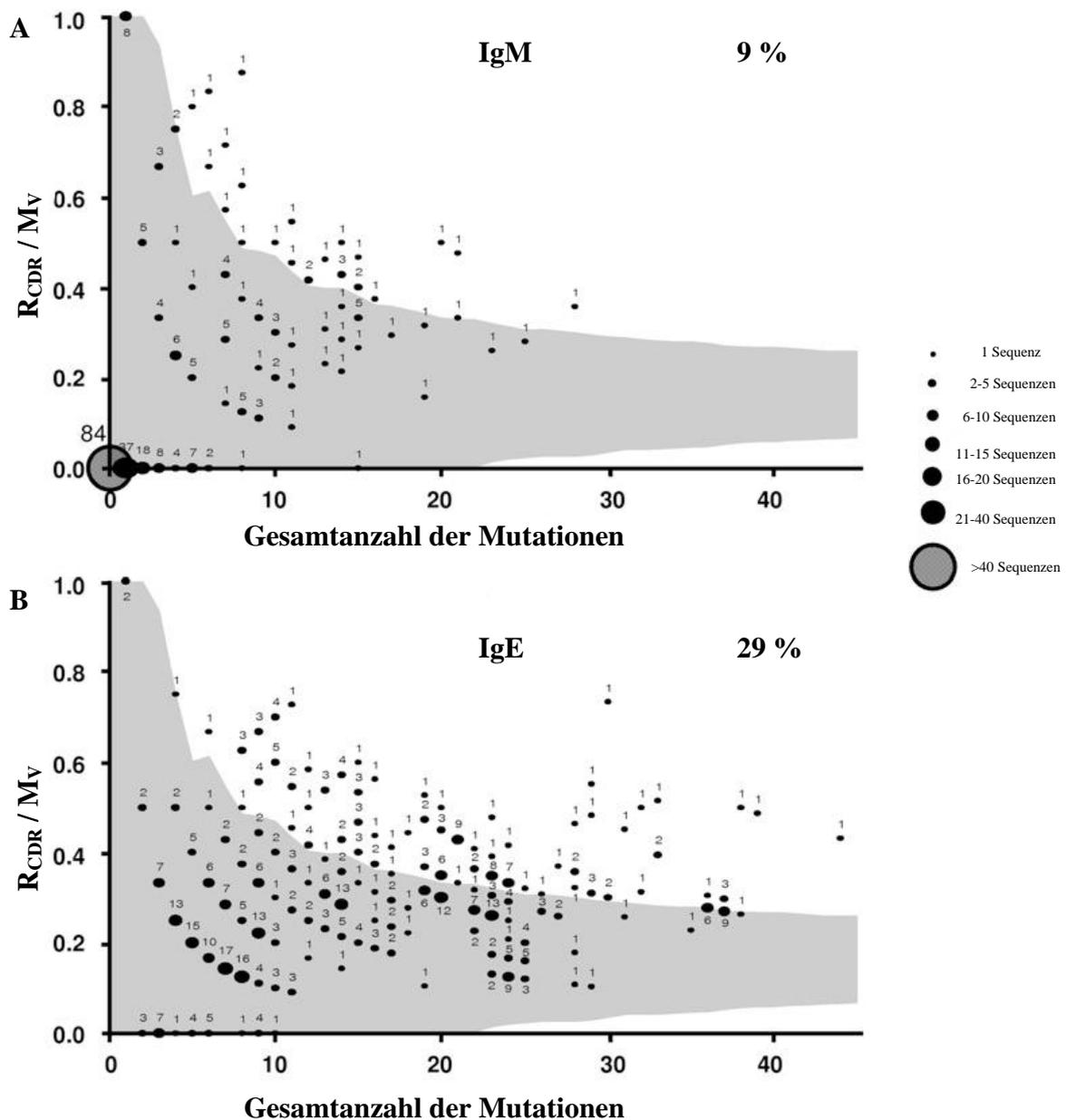


Abbildung 16: Zeichen der Antigenselektion bei IgM- und IgE-Sequenzen

Aufgetragen ist das Verhältnis von *replacement* Mutationen in CDR-H1 und -H2 (R_{CDR}) zu allen Mutationen in der variablen Region (M_V) gegen die Gesamtanzahl der Mutationen in der variablen Region (M_V). Der grau schattierte Bereich zeigt das 95% Konfidenzintervall für die zufällige Anhäufung von *replacement* Mutationen in diesen hypervariablen Abschnitten. Datenpunkte außerhalb dieses Bereichs stehen für Sequenzen mit einem großen Anteil an *replacement* Mutationen in den CDRs. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Mutationen zufällig entstanden sind, ist kleiner 5%. Datenpunkte oberhalb des Konfidenzintervalls wurden daher als signifikant antigenselektierte Sequenzen gewertet. Die Ziffern an jedem Datenpunkt stehen für die Anzahl an Sequenzen mit dieser Charakteristika.

58% aller IgM-Sequenzen zeigten überhaupt keine Mutationen innerhalb der CDRs. Während nur 9% der IgM-Sequenzen antigen-selektiert waren, zeigten die IgE-Sequenzen ein signifikant höheres Maß an Antigenselektion. Mit 29% der *unique* Sequenzen war der Anteil an antigen-selektierten Sequenzen etwa dreimal so hoch wie bei den IgM-Sequenzen ($p < 0.001$).

4.5 Klonale Verwandtschaft der Sequenzen

Zur Illustration der klonalen Verwandtschaft der Transkripte wurden Dendrogramme der genetischen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen erstellt. Sequenzen wurden als klonal verwandt bezeichnet, wenn sie identische V_H -, D- und J_H -Segmente, sowie eine gleiche CDR-H3-Länge hatten. Die 281 *unique* IgM-Sequenzen konnten 227 verschiedenen Klonotypen zugeordnet werden. Fast alle IgM-Sequenzen hatten somit einen eigenen klonalen Ursprung. Das IgE-Repertoire hingegen umfasste deutlich weniger Klonotypen. Unter den 473 *unique* IgE-Sequenzen wurden „nur“ 142 verschiedene Klonotypen identifiziert. **Abb. 17** zeigt die phylogenetischen Bäume eines repräsentativ ausgewählten Kindes (Patient 6 in **Tab. 1**). Von diesem Kind gewannen wir insgesamt 36 funktionelle IgM-Sequenzen, von denen 33 *unique* waren und zu 31 verschiedenen Klonotypen gehörten. Von den 114 gewonnenen, funktionellen IgE-Sequenzen dieses Kindes waren nur 38 *unique* und konnten nur 15 verschiedenen Klonotypen zugeordnet werden. Der Grad der klonalen Verwandtschaft bei IgE war somit sehr viel höher als bei IgM. Klonale Verwandtschaft heißt in diesem Zusammenhang, dass die die Antikörper produzierenden Plasmazellen einer gemeinsamen B-Zelle entstammen, aus der während der Affinitätsreifung verschiedene, genetisch nur leicht veränderte Tochterzellen hervorgegangen sind. Allein 18 der 38 *unique* Sequenzen gehörten zu einem einzigen gemeinsamen Klonotyp.

Das Verteilungsmuster der insgesamt erhobenen, sowie der *unique* Sequenzen und der verschiedenen dazugehörigen Klonotypen war bei allen Patienten nahezu identisch. Verdeutlicht wird dies in den *diversity plots* der einzelnen Patienten in **Abb. 18**, die das Verhältnis zwischen allen funktionellen Sequenzen und dazugehörigen Klonotypen anzeigen.

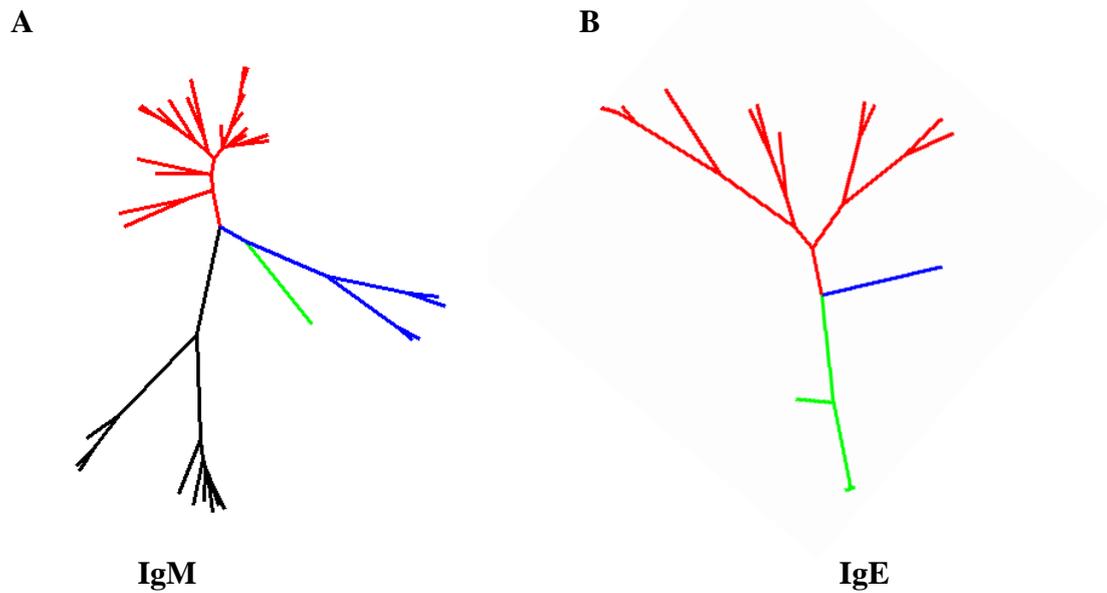


Abbildung 17: Phylogenetische Bäume der IgM- und IgE-Transkripte

Die phylogenetischen Bäume zeigen das Maß der klonalen Verwandtschaft zwischen den IgM- (A) und IgE- (B) Transkripten eines repräsentativ ausgewählten Kindes. Während fast jede IgM-Sequenz zu einem unterschiedlichen Klonotyp gehörte, setzte sich das IgE-Repertoire zum großen Teil aus klonal verwandten Sequenzen zusammen. Die 36 funktionellen IgM-Sequenzen dieses Patienten gehörten zu 31 verschiedenen Klonotypen, während die 114 funktionellen IgE-Sequenzen nur 15 verschiedenen Klonotypen zugeordnet wurden. Die IgE-Transkripte zeigen somit einen höheren Grad an klonaler Verwandtschaft. (Grün: IGHV1; Schwarz: IGHV2; Rot: IGHV3; Blau: IGHV5). Das hier gezeigte Verhältnis zwischen funktionellen Sequenzen, *unique* Sequenzen und Klonotypen war in allen Patienten sehr ähnlich und wird im *diversity plot* (Abb. 18) deutlich.

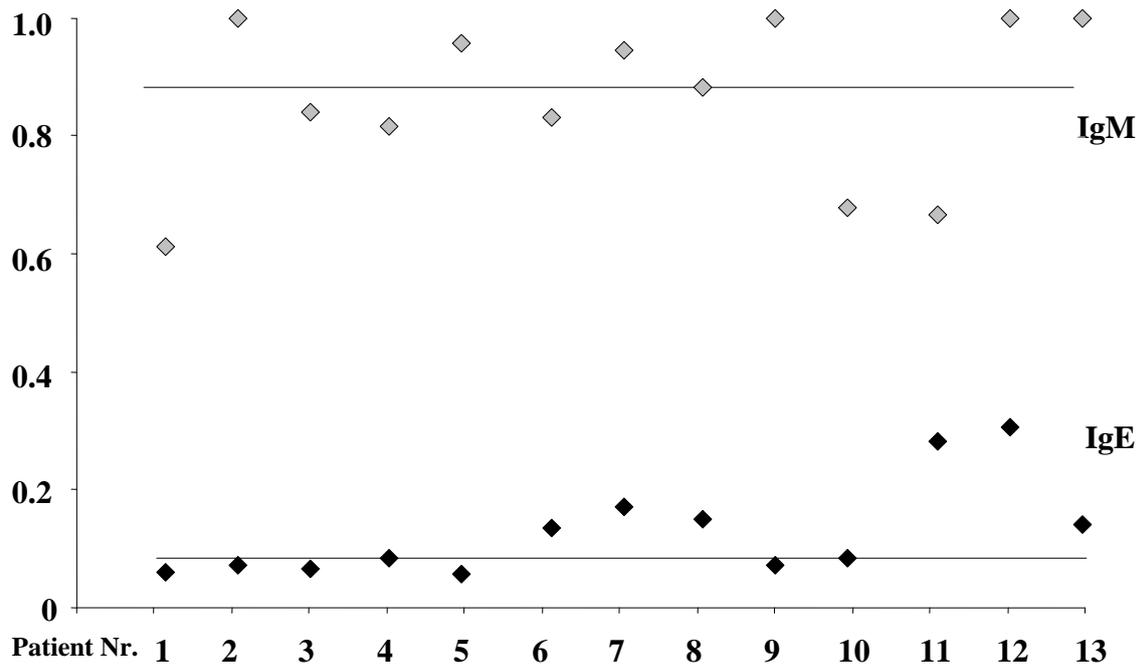


Abbildung 18: Diversity plots der einzelnen Patienten

Die Datenpunkte repräsentieren das Verhältnis zwischen der Gesamtanzahl der funktionellen Sequenzen der einzelnen Patienten und der dazugehörigen Anzahl verschiedener Klonotypen (IgM in grau; IgE in schwarz). Die horizontalen Balken zeigen die Mediane. Das Verhältnis von funktionellen Sequenzen zu verschiedenen Klonotypen ist bei den IgE-Transkripten wesentlich geringer.

4.6 Aminosäurezusammensetzung der CDR-H3

Insgesamt stimmte das Muster der für die CDR-H3 genutzten Aminosäuren bei den IgM- und IgE-Transkripten weitgehend überein, wobei Tyrosin, Glycin, Serin, Aspartat und Alanin bei beiden Isotypen die am häufigsten genutzten Aminosäuren waren. Während Tyrosin ($p < 0,001$) und Serin ($p < 0,001$) signifikant häufiger bei den IgE-Sequenzen genutzt wurden, wurde bei den IgM-Transkripten Lysin ($p < 0,001$) bevorzugt (**Abb. 19**).

Abb. 20 zeigt die Übersetzung der CDR-H3 der analysierten Beispielsequenz in die zugehörigen Aminosäuren.

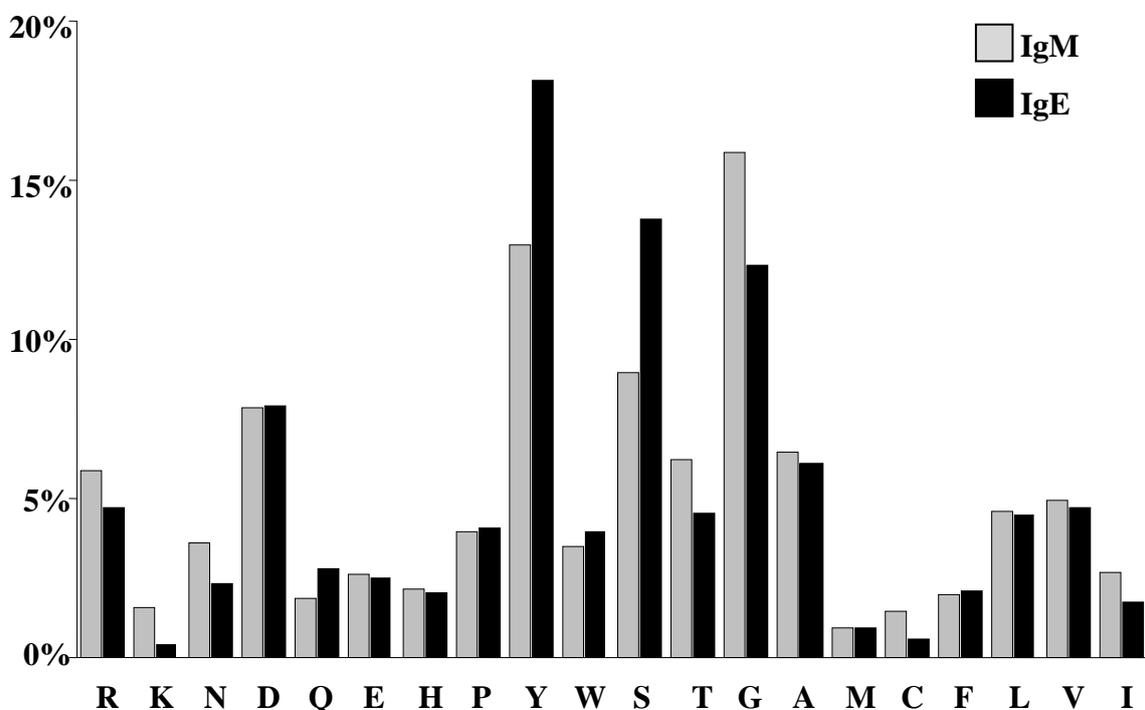


Abbildung 19: Aminosäurennutzung der CDR-H3

Das Muster der für die CDR-H3 genutzten Aminosäuren stimmte bei den IgM- und IgE-Transkripten zu großen Teilen überein, wobei Tyrosin, Glycin, Serin, Aspartat und Alanin die häufigsten Aminosäuren waren. (A, Alanin; C, Cystein; D, Aspartat; E, Glutamat; F, Phenylalanin; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; N, Asparagin; P, Prolin; Q, Glutamin; R, Arginin; S, Serin; T, Threonin; V, Valin; W, Tryptophan; Y, Tyrosin) Trotzdem gab es signifikante Unterschiede: Während Tyrosin ($p < 0,001$) und Serin ($p < 0,0001$) signifikant häufiger bei den IgE – Transkripten genutzt wurde, wurde Lysin ($p < 0,0001$) eher bei IgM genutzt.

Translation of the JUNCTION

Click on mutated (underlined> amino acid to see the original one:

	104	105	106	107	108	109	110	111	111.1	111.2	111.3	112.4	112.3	112.2	112.1	112	113	114	115	116	117	118	Frame	CDR3-IMGT length	Molecular mass	pI
	C	A	I	A	L	<u>H</u>	Y	Y	D	<u>H</u>	S	<u>A</u>	Y	Y	V	D	W	Y	F	D	L	W	+	20	2,792.08	4.1
3203199.ID_Pa-IgE_on_2...	tgt	gcg	att	goc	cta	cat	tag	tat	gat	agt	agt	gca	tat	tat	gtg	gac	tgg	tac	ttc	gat	ctc	tgg	+			

Be aware that some allele reference sequences may be incomplete or from cDNAs. In those cases, IMGT/JunctionAnalysis uses automatically the allele *01 for the analysis of the JUNCTION.

Abbildung 20: Übersetzung der Nukleinsäuresequenz einer beispielhaft ausgewählten CDR-H3 in Aminosäuren

C: Cystein; A: Alanin; I: Isoleucin; L: Leucin; H: Histidin; Y: Tyrosin; D: Aspartat; N: Asparagin;

S: Serin; V: Valin; W: Tryptophan; F: Phenylalanin

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass die allergische Immunantwort beim kindlichen Asthma bronchiale einer klassischen, Antigen-abhängigen B2-Zell-Reaktion entspricht.

Die Häufigkeit der im Rahmen der somatischen Rekombination genutzten V_H -, D-, und J_H -Gensegmente des IgE-Repertoires entsprach der Verteilung dieser Gene auf der Keimbahn. Keine Genfamilie wurde statistisch häufiger für die Expression der IgE-Transkripte genutzt, als es die Keimbahnverteilung hätte erwarten lassen. Die IgE-Transkripte fielen auf durch eine besonders lange dritte hypervariable Schleife (CDR-H3). Diese Längenzunahme gegenüber den CDR-H3 der Primärantikörper (IgM) ließ sich durch vermehrte N-Nukleotid-Addition und längere D-Segmente erklären. Mit 72‰ war die mittlere Mutationsrate der IgE-Sequenzen mehr als dreimal so hoch wie die mittlere Mutationsrate der IgM-Sequenzen (20‰). Bei 29% der IgE-Transkripte fanden sich Anzeichen einer signifikanten Antigenselektion. Im Vergleich dazu konnten bei den IgM-Transkripten nur 9% antigenselektierte Sequenzen gefunden werden. Ebenfalls bemerkenswert war die enge klonale Verwandtschaft der IgE-Sequenzen. Während fast jede erhobene IgM-Sequenz *unique* war und einem „eigenen“ B-Zell-Klon zugeordnet werden konnte, war weniger als jede dritte IgE-Sequenz von einem einzigartigen B-Zellklon produziert.

5.2 Kritische Betrachtung der Studie

5.2.1 Limitierung der Studie

Eine Limitation der Studie ist, dass das IgE-Repertoire im Patientenblut immer aus einem Gemisch von Transkripten besteht. Theoretisch könnten also Allergenspezifische Antikörper in einem „Hintergrundrauschen“ aus unspezifischen IgE-Sequenzen untergehen und in der Analyse unerkannt bleiben. In anderen Studien zum

Thema variierte der Anteil an Allergen-spezifischem IgE am Gesamt-IgE je nach Patient deutlich (Eibensteiner et al. 2000, Persson et al. 2007). Alle der von uns eingeschlossenen Patienten waren multisensibilisiert, weshalb Allergen-spezifische Unterschiede der Sequenzen nicht mehr gedeutet werden können. Es ist denkbar, dass verschiedene Typen von Allergenen auf verschiedene Weisen mit dem Immunsystem interagieren.

Als Referenz diente das Primärantikörper-Repertoire der Patienten. Bisher ist es nicht gelungen das IgE-Repertoire von klinisch gesunden Probanden vergleichend zu analysieren, da die IgE-Spiegel von Nicht-Atopikern mit einigen Nanogramm pro Liter etwa 1000fach geringer als die Spiegel von z.B. IgM oder IgG sind. In der Regel lassen sich aus dem peripheren Blut von nicht-Atopikern bisher keine IgE-Transkripte isolieren.

5.2.2 Stärken der Studie

Die Stärken unserer Studie sind die neu etablierte, hochsensitive IgE-PCR, durch die erstmals auch bei relativ geringen IgE-Spiegeln Transkripte aus kleinen Blutproben amplifiziert und analysiert wurden und der Umfang der erhobenen Daten. Dieser Umfang ist bisher einzigartig: Im Rahmen der Studie wurde die bis *dato* größte Sammlung humaner IgE-Sequenzen erstellt, was eine statistische Analyse des IgE-Repertoires von Kindern mit allergischem Asthma möglich machte.

5.3 Superantigen-ähnliche Interaktion

Viele der jüngeren Arbeiten zur Reifung der IgE-Antwort bei Allergien zeigten eine bevorzugte Nutzung einer bestimmten V_H -Genfamilie, was, wie in Kapitel 2.3.2 erläutert, als Zeichen einer Superantigen-ähnlichen Bindung des Allergens an den Antikörper gedeutet wurde.

Bereits 1995 analysierten Snow und Kollegen die V_{HE} -Transkripte aus Milz-B-Lymphozyten eines Patienten mit allergischem Asthma, und fanden bei fünf der 14 erhobenen Sequenzen eine Nutzung von V_H -Genen der V_H5 -Familie (Snow et al. 1995).

Diese Genfamilie beinhaltet nur zwei Gene und wird sonst im sekundären Repertoire nur sehr selten verwendet. Die Autoren schlossen daraus, dass die signifikant häufigere Nutzung der kleinen V_H5-Familie ein Charakteristikum von IgE-produzierenden B-Zellen sei, und werteten dies als Argument für eine Superantigen-Bindung der Allergene an die IgE-Antikörper. Zu bedenken ist jedoch, dass in dieser Studie insgesamt nur 14 Sequenzen analysiert wurden und dass der eine untersuchte Patient eine Monosensibilisierung gegen Hausstaubmilben vorwies. Die signifikante Überrepräsentation von Genen der V_H5-Familie könnte bei diesem Patienten also auch eine monoklonale und damit fokussierte Antigen-gesteuerte Immunantwort auf Hausstaubmilben widerspiegeln (Zemlin et al. 2009). Darüber hinaus ist es nicht unwahrscheinlich, dass die 14 Sequenzen alle einem einzigen Klon zuzuordnen sind.

In der immunogenetischen Analyse der V_Hε-Transkripte von zwei Patienten mit einer Allergie gegen Erdnüsse fanden Janezic *et al.* eine bevorzugte Nutzung der Familie V_H1 (Janezic et al. 1998). Interessanterweise war das Verteilungsmuster der V_H-Nutzung bei beiden Patienten gleich. Durch die Schlussfolgerung, dass Antigene von Hausstaubmilben eher an Sequenzen mit einem V-Segment aus der V_H5-Familie binden, während Erdnussantigene eher V_H1 selektieren, festigten die Autoren die Hypothese einer Superantigen-ähnlichen Aktivierung bei der IgE-Antwort.

Eine Studie aus dem Jahre 2005, die das IgE-Schwerketten-Repertoire aus B-Zellen der nasalen Mukosa von Patienten mit allergischer Rhinitis analysierte, zeigte ebenfalls eine bevorzugte Nutzung der V_H5-Familie (Coker et al. 2005). Gedeutet wurde dies von den Autoren als Hinweis auf eine Superantigen-ähnliche Aktivierung der B-Zell Expansion. Als mögliche Erklärung wurde vermutet, dass diese Superantigene aus Mukosa-ständigen Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*) stammen könnten. Hintergrund dieser Hypothese war die bereits bekannte Tatsache, dass von diesen Bakterien produzierte Enterotoxine die B-Zell Proliferation und die IgE-Synthese stimulieren können (Jabara and Geha 1996, Bachert et al. 2003).

Dahlke *et al.* berichteten in ihrer Studie, dass 48 der 76 aus peripherem Blut eines Patienten mit atopischer Dermatitis erhobenen Sequenzen aus der V_H4-Familie stammten (Dahlke et al. 2006) und lieferten so weitere Argumente für die Superantigen-ähnliche Aktivierung.

Ebenfalls im Jahr 2006 wurde dann konsequenterweise von Marone und Kollegen der Terminus „Superallergen“ für diese Allergene vorgeschlagen (Marone et al. 2006).

Eine der aktuellen Studien zum Thema stammt von Lim *et al.* und erschien im Jahr 2007 (Lim et al. 2007). Analysiert wurde das IgE-Repertoire von 14 erwachsenen Patienten mit atopischer Dermatitis und mit sehr hohen IgE Spiegeln (>1000 kU/l). Das Ergebnis dieser Arbeit war, dass das genutzte V_H-Repertoire der IgE-Sequenzen dem der IgM und IgG entspricht und somit die V_H3-Familie die häufigste darstellt. Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeit von Davies und O’Hehir, die keine bevorzugte Nutzung einer bestimmten V_H-Genfamilie nachweisen konnten (Davies and O’Hehir 2004). Untersucht wurden drei Patienten mit allergischer Rhinitis auf Gräserpollen und die Autoren schlussfolgerten, dass keine Anzeichen einer Superantigen-ähnlichen Aktivierung gefunden werden konnten.

Es wird deutlich, dass bisher jede der V_H-Familien außer V_H2 und V_H7 in mindestens einer Studie statistisch signifikant überrepräsentiert war. Die bevorzugte Nutzung bestimmter V_H-Familien wurde von verschiedenen Autoren als Zeichen einer Superantigen-Bindung an die IgE-Antikörper gedeutet. Man sollte bei der Interpretation dieser Ergebnisse jedoch in Betracht ziehen, dass die meisten dieser Studien auf eine sehr begrenzte Zahl von IgE-Sequenzen (n<100), von oftmals nur ein oder zwei Patienten gründen.

Außerdem wurden Patienten mit Sensibilisierungen auf verschiedene Allergene und mit unterschiedlichen allergischen Erkrankungen verglichen. In unserer aktuellen Arbeit mit 1.366 funktionellen IgE-Sequenzen von insgesamt 13 Kindern mit allergischem Asthma entsprach die Nutzung der V_H-Familien der Keimbahnverteilung, was V_H3 zur am häufigsten genutzten Familie machte. Bei 14% der analysierten IgE-Sequenzen wurde V3-23 genutzt, welches auch im primären B-Zell-Repertoire das am häufigsten genutzte V_H-Gen darstellt.

Das IgE-Repertoire von Kindern mit allergischem Asthma spiegelt somit die Keimbahnkomplexität wider und folgt dabei dem V_H-Verteilungsmuster des Primärantikörper-Repertoires. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Superantigen-ähnliche Aktivierung der IgE-Immunantwort.

5.4 Polyklonale Aktivierung von B1-Zellen

Ein großer Anteil der IgE-Sequenzen unserer Studie war hochmutiert mit einer somatischen Mutationsrate größer als 50%. Dies deckt sich zunächst mit den Beobachtungen von Davies und O'Hehir, die ebenfalls eine hohe somatische Mutationsrate in den V_Hε-Transkripten von drei Patienten mit allergischer Rhinitis fanden (Davies and O'Hehir 2004). Darüber hinaus fanden sie einen kleinen Anteil an IgE-Klonen, die zu 98-100% mit der Keimbahnsequenz übereinstimmten. Diese außerordentlich hohe Ähnlichkeit mit den Keimbahngenomen wurde erklärt durch eine mögliche Beteiligung von CD5⁺/CD19⁺ B-Zellen. Diese Zellen sind murinen B1a-Zellen ähnlich und können funktional charakterisiert werden durch eine polyklonale Aktivierung und durch die Produktion von polyreaktiven IgM-Antikörpern, die zur Autoreaktivität tendieren. Physiologischerweise werden B1-Zellen während der Fetal- und Neonatalperiode produziert (Hardy 2006) und machen einen mengenmäßig relevanten Anteil der peripheren B-Zellen in der Kindheit aus (Bhat et al. 1992). Es wird vermutet, dass diese Zellen eine Art angeborenes Abwehrnetzwerk darstellen, das ohne Interaktion mit T-Zellen funktioniert. Da kein Antigenkontakt zur Expression dieser Antikörper nötig ist, werden sie „natürliche Antikörper“ genannt.

In einer Studie an zehn Atopikern von Eibensteiner *et al.* stammte das Allergenspezifische IgE aus einer breiten Varietät an B-Zellen, was von den Autoren als Hinweis auf eine polyklonale Aktivierung multipler B-Zellen gedeutet wurde (Eibensteiner et al. 2000). Eine weitere Studie, in der eine potentielle Rolle von B1-Zellen bei der allergischen Immunantwort diskutiert wurde, kam dann von Edwards und Kollegen (Edwards et al. 2002). Die Autoren fanden bei 33% der 51 analysierten IgE-Sequenzen von drei Patienten mit atopischer Dermatitis die sonst seltene V_H-Familie 6. Das einzige Gen dieser Familie, IGHV6-1 liegt am meisten proximal zu den D-Genen (Cook et al. 1994) und wird normalerweise von fetalen B-Zellen exprimiert (Schroeder and Wang 1990). Da bei der Sequenzanalyse außerdem eine geringe somatische Mutationsrate sowie sehr kurze CDR-H3 aufgrund verminderter N-Nukleotid-Addition auffielen, vermuteten auch Collins *et al.* eine Beteiligung von B1-Zellen, als Quelle polyreaktiver IgE-Antikörper bei allergischen Erkrankungen (Collins et al. 2003).

Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Daten können diese Beobachtungen nicht bestätigen. Im Gegenteil zeigten die IgE-Transkripte von Kindern mit

allergischem Asthma signifikant längere CDR-H3 durch vermehrte Addition von N-Nukleotiden und lange D-Segmente. Erstaunlicherweise fanden wir unter 1.366 funktionellen IgE-Sequenzen nicht eine einzige unmutierte Sequenz. Daraus schließen wir, dass das IgE-Repertoire von Kindern mit allergischem Asthma nicht auf eine Beteiligung von polyklonalen B1-Zellen hinweist.

5.5 Klassische Immunantwort vom B2-Typ mit Antigenselektion

Die Qualität und die Verteilung von somatischen Mutationen innerhalb der Antikörpersequenzen geben Hinweise auf den vorherrschenden Selektionsdruck während der Affinitätsreifung. Wenn Allergene in einer Superantigen-ähnlichen Weise an die Antikörper bänden, würde man zwar eine Verschiebung bei der V_H -Familiennutzung erwarten aber keine Zeichen der Antigenselektion. Daher ist es wichtig, Zeichen der Antigenselektion zu erkennen und zu analysieren.

Verschiedene statistische Methoden sind vorgeschlagen worden, um antigenselektierte von zufällig entstandenen Mutationsmustern in den schweren Immunglobulinketten unterscheiden zu können (Betz et al. 1993, Wagner et al. 1995, Lossos et al. 2000, Bose and Sinha 2005, Dahlke et al. 2006). Diese Methoden stimmen überein in folgenden Punkten: 1. Eine Antigen-gesteuerte Selektion kann nur *replacement* Mutationen betreffen. 2. *Replacement* Mutationen, die innerhalb der variablen Schleifen (CDR) auftreten, verändern mit höherer Wahrscheinlichkeit die Antigenerkennung als Mutation in den *framework regions* (FR). 3. Veränderungen der Aminosäuresequenz aufgrund von *replacement* Mutationen innerhalb der *framework regions* (FR) bergen die Gefahr der Zerstörung der funktionellen Integrität des Antikörpers. Dementsprechend weisen antigenselektierte Sequenzen in den CDRs ein hohes Verhältnis von *replacement* Mutationen zu *silent* Mutationen (R/S Rate) auf und in den *framework regions* ein niedriges. Es kommt also zu einer Anhäufung von *replacement* Mutationen innerhalb der hypervariablen Schleifen, um die Antigenspezifität im Rahmen der Affinitätsreifung gezielt zu erhöhen. Trotz des Konsenses in diesen Punkten können sich die Ergebnisse der Sequenzanalysen je nach Methode sehr voneinander unterscheiden, da verschiedene Definitionen für CDRs und FRs publiziert worden sind und noch kein Konsens gefunden wurde (Chothia et al. 1989, Kabat and Wu 1991, Giudicelli et al. 2006). Vor diesem Hintergrund wirkt es nicht überraschend, dass die Autoren der Studien über

somatische Mutationen innerhalb der schweren IgE-Ketten zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen.

Davies und O’Hehir fanden eine Anreicherung von *replacement* Mutationen in den CDRs, obwohl sie hohe intraindividuelle Unterschiede offenlegen konnten (Davies and O’Hehir 2004). Diese Analyse deckt sich mit unserer Beobachtung, dass die IgE-Transkripte von Kindern mit allergischem Asthma signifikante Zeichen einer Antigenselektion aufweisen.

Wie aber kann unser Ergebnis interpretiert werden in Zusammenhang mit den Daten von Dahlke *et al.*, die niedrige somatische Mutationsraten und keine Zeichen der Antigenselektion für die IgE-Transkripte von allergischen und nicht allergischen Individuen gefunden haben (Dahlke et al. 2006)? Der Erklärungsansatz der Autoren war, dass IgE-Transkripte generell eine geringere Affinität zu ihren Antigenen aufwiesen und somit einem ganz anderen Entwicklungsweg entstammten als andere Isotypen. Erwähnenswert ist sicherlich der Größenunterschied der beiden Studien. Während Dahlke *et al.* 76 IgE-Sequenzen von einem einzigen allergischen Patienten gewonnen haben, analysierten wir 1.366 Sequenzen von 13 Kindern. Außerdem wurden in den Studien verschiedene allergische Entitäten untersucht. Der Patient aus der Studie von Dahlke und Kollegen war multisensibilisiert und litt an atopischer Dermatitis. Wir betrachteten Kinder mit vornehmlich allergischem Asthma bronchiale. Es erscheint denkbar, dass die allergische Immunantwort der atopischen Dermatitis weniger fokussiert ist, als z. B. beim allergischen Asthma.

Gestützt wird die Beobachtung, dass IgE-Sequenzen von Kindern mit allergischem Asthma Anzeichen der Antigenselektion zeigen durch die Beobachtung, dass der Grad der klonalen Verwandtschaft zwischen den IgE-Sequenzen bemerkenswert groß war. Fast jede der *unique* IgM-Sequenzen gehörte zu einem eigenen Klonotyp, während den 473 *unique* IgE-Transkripten „nur“ 142 Klone zugeordnet werden konnten. Dies steht in Einklang mit Davies und O’Hehir, die ebenfalls eine enge klonale Verwandtschaft der Sequenzen des IgE-Repertoires von drei Patienten mit Heuschnupfen zeigen konnten (Davies and O’Hehir 2004). Eine enge klonale Verwandtschaft deutet auf eine affinitätsgereifte und fokussierte IgE-Antwort hin. Diese Beobachtungen legen eine oligoklonale Expansion der B-Zellen im Sinne der adaptiven Immunantwort anderer sekundärer Antikörper nahe.

5.6 Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das IgE-Repertoire im Kindesalter systematisch charakterisiert. Dabei wurde die bis *dato* umfangreichste Sammlung humaner IgE-Sequenzen erhoben. Die Analyse dieser Sequenzen zeigte: (1) Das Muster der V_H-Familienverteilung bei IgE-Transkripten spricht gegen eine Superantigen-ähnliche Aktivierung bei der IgE-Antwort. (2) Die langen und hochmutierten CDR-H3 machen eine relevante Beteiligung von polyklonalen B1-Zellen unwahrscheinlich. (3) IgE-Transkripte zeigen deutliche Zeichen einer signifikanten Antigenselektion und weisen damit auf eine klassische Antigen-abhängige Immunantwort mit Affinitätsreifung hin. Bekräftigt wird dieses Ergebnis durch die Beobachtung der engen klonalen Verwandtschaft der IgE-Sequenzen. Zusammenfassend kommt die vorliegende Arbeit zu dem Schluss, dass die IgE-Antwort bei Kindern mit allergischem Asthma einer klassischen, Antigen-abhängigen und affinitätsgereiften oligoklonalen B2-Zell-Antwort entspricht.

Die vorliegende Arbeit enthält die Methodik und die Referenzdaten zur Charakterisierung der Immunmechanismen bei Therapieansätzen, welche die IgE-Antwort modulieren (z. B. die anti-IgE Therapie und die allergenspezifische Immuntherapie).

6. Literatur

- Alt, F., E. Oltz, F. Young, J. Gorman, G. Taccioli & J. Chen (1992) VDJ recombination. *Immunol Today*, 13, 306-14.
- Andymuc (2005) "Klonierung2.pgn" bzw. "Transformation2.pgn"
<http://de.wikipedia.org/wiki/Klonierung>
- Bach, J. F. (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, 347, 911-20.
- Bacharier, L., A. Boner, K. Carlsen, P. Eigenmann, T. Frischer, M. Götz, P. Helms, J. Hunt, A. Liu, N. Papadopoulos, T. Platts-Mills, P. Pohunek, F. Simons, E. Valovirta, U. Wahn & J. Wildhaber (2008) Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy*, 63, 5-34.
- Bachert, C., T. van Zele, P. Gevaert, L. De Schrijver & P. Van Cauwenberge (2003) Superantigens and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3, 523-31.
- Basu, M., M. Hegde & M. Modak (1983) Synthesis of compositionally unique DNA by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Biochem Biophys Res Commun*, 111, 1105-12.
- Berek, C., G. Griffiths & C. Milstein (1985) Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature*, 316, 412-8.
- Berend, N., C. Salome & G. King (2008) Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology*, 13, 624-31.
- Berland, R. & H. Wortis (2002) Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*, 20, 253-300.
- Betz, A., M. Neuberger & C. Milstein (1993) Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol Today*, 14, 405-11.
- Bhat, N., A. Kantor, M. Bieber, A. Stall, L. Herzenberg & N. Teng (1992) The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells. *Int Immunol*, 4, 243-52.
- Bose, B. & S. Sinha (2005) Problems in using statistical analysis of replacement and silent mutations in antibody genes for determining antigen-driven affinity selection. *Immunology*, 116, 172-83.
- Bosse, Y. & M. Rola-Pleszczynski (2007) Controversy surrounding the increased expression of TGF beta 1 in asthma. *Respir Res*, 8, 66.
- Bousquet, J., P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson & A. M. Vignola (2000) Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, 1720-45.
- Brezinschek, H. P., S. J. Foster, R. I. Brezinschek, T. Dorner, R. Domiati-Saad & P. E. Lipsky (1997) Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest*, 99, 2488-501.
- Broide, D. H. (2008) Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 560-70; quiz 571-2.
- Burchell, J., D. Strickland & P. Stumbles (2009) The role of dendritic cells and regulatory T cells in the regulation of allergic asthma. *Pharmacol Ther*.
- Busse, W. W. & R. F. Lemanske, Jr. (2001) Asthma. *N Engl J Med*, 344, 350-62.
- Carroll, M. & A. Prodeus (1998) Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 10, 36-40.
- Casali, P. & E. Schettino (1996) Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 210, 167-79.

- Chang, B. & P. Casali (1994) The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today*, 15, 367-73.
- Chevenet, F., C. Brun, A. L. Banuls, B. Jacq & R. Christen (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, 7, 439.
- Chothia, C., A. Lesk, A. Tramontano, M. Levitt, S. Smith-Gill, G. Air, S. Sheriff, E. Padlan, D. Davies & W. Tulip (1981) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342, 877-83.
- Coker, H., H. Harries, G. Banfield, V. Carr, S. Durham, E. Chevetton, P. Hobby, B. Sutton & H. Gould (2005) Biased use of VH5 IgE-positive B cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 445-52.
- Colgan, J. & I. Hankel (2010) Signaling pathways critical for allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10, 42-7.
- Collins, A., W. Sewell & M. Edwards (2003) Immunoglobulin gene rearrangement, repertoire diversity, and the allergic response. *Pharmacol Ther*, 100, 157-70.
- Collis, A., A. Brouwer & A. Martin (2003) Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol*, 325, 337-54.
- Cook, G., I. Tomlinson, G. Walter, H. Riethman, N. Carter, L. Buluwela, G. Winter & T. Rabbitts (1994) A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat Genet*, 7, 162-8.
- Cookson, W. (1999) The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*, 402, B5-11.
- Corry, D. B. & F. Kheradmand (1999) Induction and regulation of the IgE response. *Nature*, 402, B18-23.
- Dahlke, I., D. Nott, J. Ruhno, W. Sewell & A. Collins (2006) Antigen selection in the IgE response of allergic and nonallergic individuals. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 1477-83.
- Davies, D., E. Padlan & D. Segal (1975) Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem*, 44, 639-67.
- Davies, D. R. & S. Chacko (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.*, 26, 421-427.
- Davies, J. & R. O'Hehir (2004) VH gene usage in immunoglobulin E responses of seasonal rhinitis patients allergic to grass pollen is oligoclonal and antigen driven. *Clin Exp Allergy*, 34, 429-36.
- De Monchy, J., H. Kauffman, P. Venge, G. Koëter, H. Jansen, H. Sluiter & K. De Vries (1985) Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis*, 131, 373-6.
- Duan, B. & L. Morel (2006) Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 5, 403-8.
- Eder, W., M. J. Ege & E. von Mutius (2006) The asthma epidemic. *N Engl J Med*, 355, 2226-35.
- Edwards, M., W. Brouwer, C. Choi, J. Ruhno, R. Ward & A. Collins (2002) Analysis of IgE antibodies from a patient with atopic dermatitis: biased V gene usage and evidence for polyreactive IgE heavy chain complementarity-determining region 3. *J Immunol*, 168, 6305-13.
- Eibenstein, P., S. Spitzauer, P. Steinberger, D. Kraft & R. Valenta (2000) Immunoglobulin E antibodies of atopic individuals exhibit a broad usage of VH-gene families. *Immunology*, 101, 112-9.
- GELL, P. G. H. & R. R. A. COOMBS. 1963. Clinical Aspects of Immunology. Clinical aspects of immunology 1963 pp. xxvi + 883 pp.

- Giudicelli, V., P. Duroux, C. Ginestoux, G. Folch, J. Jabado-Michaloud, D. Chaume & M. Lefranc (2006) IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*, 34, D781-4.
- Gould, H. J. & B. J. Sutton (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8, 205-17.
- Graille, M., E. Stura, A. Corper, B. Sutton, M. Taussig, J. Charbonnier & G. Silverman (2000) Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5399-404.
- Han, W., J. Mou, J. Sheng, J. Yang & Z. Shao (1995) Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry*, 34, 8215-20.
- Hardy, R. (2006) B-1 B cell development. *J Immunol*, 177, 2749-54.
- Hayakawa, K., R. Hardy, M. Honda, L. Herzenberg & A. Steinberg (1984) Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 2494-8.
- Herzenberg, L. (2000) B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev*, 175, 9-22.
- Holt, P. (2000) Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, S151-6.
- Homer. Ilias. (Übersetzung von Johann Heinrich Voß (2008)) http://www.digbib.org/Homer_8JHvChr/De_Ilias_.pdf.
- Hui, J., A. Oka, A. James, L. J. Palmer, A. W. Musk, J. Beilby & H. Inoko (2008) A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum Genet*, 123, 297-306.
- Jabara, H. & R. Geha (1996) The superantigen toxic shock syndrome toxin-1 induces CD40 ligand expression and modulates IgE isotype switching. *Int Immunol*, 8, 1503-10.
- Janezic, A., C. Chapman, R. Snow, J. Hourihane, J. Warner & F. Stevenson (1998) Immunogenetic analysis of the heavy chain variable regions of IgE from patients allergic to peanuts. *J Allergy Clin Immunol*, 101, 391-6.
- Kabat, E. & T. Wu (1991) Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*, 147, 1709-19.
- Kantor, A., C. Merrill, L. Herzenberg & J. Hillson (1997) An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol*, 158, 1175-86.
- Kauffman, H., J. Tomee, M. van de Riet, A. Timmerman & P. Borger (2000) Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 1185-93.
- Kinet, J. P. (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*, 17, 931-72.
- Laitinen, T., A. Polvi, P. Rydman, J. Vendelin, V. Pulkkinen, P. Salmikangas, S. Makela, M. Rehn, A. Pirskanen, A. Rautanen, M. Zucchelli, H. Gullsten, M. Leino, H. Alenius, T. Petays, T. Haahtela, A. Laitinen, C. Laprise, T. J. Hudson, L. A. Laitinen & J. Kere (2004) Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science*, 304, 300-4.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T.

- J. Gibson & D. G. Higgins (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-8.
- Lim, A., S. Luderschmidt, A. Weidinger, C. Schnopp, J. Ring, R. Hein, M. Ollert & M. Mempel (2007) The IgE repertoire in PBMCs of atopic patients is characterized by individual rearrangements without variable region of the heavy immunoglobulin chain bias. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 696-706.
- Lossos, I. S., R. Tibshirani, B. Narasimhan & R. Levy (2000) The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol*, 165, 5122-6.
- Maddox, L. & D. A. Schwartz (2002) The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med*, 53, 477-98.
- Maizels, N. (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet*, 39, 23-46.
- Marone, G., G. Spadaro, B. Liccardo, F. Rossi, C. D'Orio & A. Detoraki (2006) Superallergens: a new mechanism of immunologic activation of human basophils and mast cells. *Inflamm Res*, 55 Suppl 1, S25-7.
- Matsuda, F., K. Ishii, P. Bourvagnet, K. Kuma, H. Hayashida, T. Miyata & T. Honjo (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med*, 188, 2151-62.
- Meffre, E., M. Milili, C. Blanco-Betancourt, H. Antunes, M. Nussenzweig & C. Schiff (2001) Immunoglobulin heavy chain expression shapes the B cell receptor repertoire in human B cell development. *J Clin Invest*, 108, 879-86.
- Moffatt, M. F., M. Kabesch, L. Liang, A. L. Dixon, D. Strachan, S. Heath, M. Depner, A. von Berg, A. Bufe, E. Rietschel, A. Heinzmann, B. Simma, T. Frischer, S. A. Willis-Owen, K. C. Wong, T. Illig, C. Vogelberg, S. K. Weiland, E. von Mutius, G. R. Abecasis, M. Farrall, I. G. Gut, G. M. Lathrop & W. O. Cookson (2007) Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*, 448, 470-3.
- Murphy, K. M. 2007. *Janeway's Immunobiology, Seventh Edition*. Garland Science
- Nemazee, D. (2006) Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*, 6, 728-40.
- Padlan, E. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 31, 169-217.
- Persson, H., M. Sadegh, L. Greiff & M. Ohlin (2007) Delineating the specificity of an IgE-encoding transcriptome. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 1186-92.
- Poljak, R., L. Amzel & R. Phizackerley (1976) Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins. *Prog Biophys Mol Biol*, 31, 67-93.
- Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381, 751-8.
- Rivera, J. & A. Olivera (2008) A current understanding of Fc epsilon RI-dependent mast cell activation. *Curr Allergy Asthma Rep*, 8, 14-20.
- Sanderson, C. (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*, 79, 3101-9.
- Schroeder, H. J. & J. Wang (1990) Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6146-50.
- Shinkura, R., S. Ito, N. Begum, H. Nagaoka, M. Muramatsu, K. Kinoshita, Y. Sakakibara, H. Hijikata & T. Honjo (2004) Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol*, 5, 707-12.
- Silverman, G. (1998) B cell superantigens: possible roles in immunodeficiency and autoimmunity. *Semin Immunol*, 10, 43-55.
- Snow, R., C. Chapman, A. Frew, S. Holgate & F. Stevenson (1995) Analysis of Ig VH region genes encoding IgE antibodies in splenic B lymphocytes of a patient with asthma. *J Immunol*, 154, 5576-81.

- Snow, R., C. Chapman, A. Frew, S. Holgate & F. Stevenson (1997) Pattern of usage and somatic hypermutation in the V(H)5 gene segments of a patient with asthma: implications for IgE. *Eur J Immunol*, 27, 162-70.
- Snow, R., R. Djukanovic & F. Stevenson (1999) Analysis of immunoglobulin E VH transcripts in a bronchial biopsy of an asthmatic patient confirms bias towards VH5, and indicates local clonal expansion, somatic mutation and isotype switch events. *Immunology*, 98, 646-51.
- Sterk, P. (1995) The place of airway hyperresponsiveness in the asthma phenotype. *Clin Exp Allergy*, 25 Suppl 2, 8-11; discussion 17-8.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302, 575-81.
- Tornberg, U. C. & D. Holmberg (1995) B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique VHDJH repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. *Embo J*, 14, 1680-9.
- Tung, J. & L. Herzenberg (2007) Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol*, 19, 150-5.
- von Boehmer, H. & F. Melchers (2010) Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol*, 11, 14-20.
- Wagner, S., C. Milstein & M. Neuberger (1995) Codon bias targets mutation. *Nature*, 376, 732.
- Wan, T., R. Beavil, S. Fabiane, A. Beavil, M. Sohi, M. Keown, R. Young, A. Henry, R. Owens, H. Gould & B. Sutton (2002) The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nat Immunol*, 3, 681-6.
- Xu, J. & M. Davis (2000) Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*, 13, 37-45.
- Zemlin M, Rogosch T, Kerzel S (2010) The Immunogenetics of Allergic Sensitization: Selection of the IgE Repertoire. in: MA Osborne, Advances in Genetics Research, Volume 1. Hauppauge NY 2010 (Nova Science Publishers)
- Ziegner, M., G. Steinhauser & C. Berek (1994) Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol*, 24, 2393-400.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Strukturelle Unterschiede zwischen IgE und IgG
- Abb. 2: Zusammensetzung der klassischen Antigenbindungsstelle
- Abb. 3: Alternative Erklärungsansätze zur Prägung der allergischen Immunreaktion
- Abb. 4: Arbeitsschritte der IgE-Sequenzierung
- Abb. 5: Primerbindungsstellen der *semi-nested* IgE-PCR
- Abb. 6: Ligation des PCR-Produkts in den TOPO-Vektor
- Abb. 7: Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*-Zellen
- Abb. 8: Nukleinsäuresequenz eines beispielhaften IgE-Transkripts
- Abb. 9: Sequenzanalyse mit Hilfe von IMGT/V-QUEST
- Abb. 10: Agarose-Gel mit amplifizierter IgE- und IgM-Schwerketten-cDNA
- Abb. 11: V_H-Familien-Nutzung der IgE- und IgM-Transkripte
- Abb. 12: Verteilung der genutzten D- (A) und J_H- (B) Genfamilien
- Abb. 13: Längenverteilung (A) und Zusammensetzung (B) der CDR-H3
- Abb. 14: Längenverteilung der N-Regionen
- Abb. 15: Somatische Mutationsrate
- Abb. 16: Zeichen der Antigenselektion bei IgM- und IgE-Sequenzen
- Abb. 17: Phylogenetische Bäume der IgM- und IgE Transkripte
- Abb. 18: *Diversity plots* der einzelnen Patienten
- Abb. 19: Aminosäurenutzung der CDR-H3
- Abb. 20: Übersetzung der Nukleinsäuresequenz einer beispielhaft ausgewählten CDR-H3 in Aminosäuren

7.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Charakterisierung des Patientenkollektivs
- Tab. 2: Pipettierschema der *semi-nested* IgE-PCR

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
APC	Antigen-präsentierende Zellen
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C _H	konstante Region der schweren Immunglobulinkette
C _L	konstante Region der leichten Immunglobulinkette
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
FR	<i>framework region</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-Nukleotide	<i>nontemplate</i> -Nukleotide
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-Nukleotide	palindromische-Nukleotide
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
V _H	variable Region der schweren Immunglobulinkette
V _H ,D-,J _H	<i>variable-, diversity-, joining</i> -Gensegment
V _L	variable Region der leichten Immunglobulinkette

7.4 Eigene Veröffentlichung zum Thema

7.4.1 Originalarbeiten

Kerzel, S., T. Rogosch, B. Struecker, R. F. Maier und M. Zemlin (2010)

IgE transcripts in the circulation of allergic children reflect a classical antigen-driven B cell response and not a superantigen-like activation.

J Immunol, 185, 2253-60.

7.4.2 Vorträge und Posterpräsentationen

B. Strücker, T. Rogosch, R. F. Maier, M. Zemlin und S. Kerzel (2009)

„Die IgE-Antwort bei Kindern mit allergischem Asthma spiegelt eine klassische, oligoklonale Immunantwort wieder.“

Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin

B. Strücker, T. Rogosch, R. F. Maier, M. Zemlin und S. Kerzel (2009)

„Das IgE-Repertoire von Kindern und Jugendlichen mit allergischem Asthma

Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin

7.5 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Geburtsdatum 25. Oktober 1980
Geburtsort Bad Oeynhausen
Familienstand ledig

Schulbildung

1987 – 1991 Grundschule Löhne
1991 – 06/2000 Gymnasium Löhne, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst und Ausbildung

10/2000 – 08/2001 Zivildienst (Rettungssanitäter)
09/2001 – 02/2003 Rettungsassistent (Berufsfirewehr Köln)

Studium der Humanmedizin

03/2003 – 03/2005 Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2004 – 02/2005 Universidad Miguel Hernandez, Alicante, Spanien (ERASMUS)
03/2005 1. Ärztliche Prüfung (LMU, München)
10/2005 – 12/2009 Philipps-Universität Marburg
12/2009 2. Ärztliche Prüfung

Famulaturen

07/2005 Chirurgie, Hospital-Cosme-Argerich Buenos Aires, Argentinien
08/2006 Geburtshilfe, Klinikum der Philipps-Universität Marburg
09/2006 Pädiatrie, Centro de salud de Campello, Spanien
02/2007 – 04/2007 Chirurgie und Geburtshilfe, Orotta-Hospital Asmara, Eritrea

Praktisches Jahr

08/2008 – 12/2008 Innere Medizin, Hospital Clínic Barcelona, Spanien
12/2008 – 01/2009 Chirurgie, Moassat-Hospital Damaskus, Syrien
02/2009 – 03/2009 Chirurgie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg
04/2009 – 07/2009 Pädiatrie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg

Beruflicher Werdegang

Seit 04 / 2010 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Neuhaus
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

7.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

in München die Damen und Herren Welsch, Reiser, Meyer, Schenzle, Putz, Kemenes

in Marburg die Damen und Herren Barth, Baum, Baumann, Bien, Fendrich, Görg, Gress, Graf, Hegele, Hofmann, Hörle, Jungclas, Kerzel, Kill, Klaus, Klose, Köhler, König, Krause, Kroll, Lohoff, Kühnert, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Renz, Richter, Rolfes, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seitz, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Wulf, Zemlin

in Campello Frau Jimenez

in Asmara Herr Tomes

in Barcelona die Damen und Herren Grau , Lopez Soto, Prieto, San Clemente, Uchima

sowie in Damaskus die Herren Kamal Eddine, Khalil, Sleiman

7.7 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Maier, der mir in seiner Klinik hervorragende Arbeitsbedingungen bereitgestellt hat und somit diese Dissertation erst ermöglicht hat. Dann gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Zemlin, in dessen Arbeitsgruppe ich vom ersten Moment an sehr herzlich aufgenommen wurde und der mir mit seiner großen wissenschaftlichen, wie menschlichen Erfahrung immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Den größten Dank jedoch schulde ich meinem Betreuer Herrn Dr. Sebastian Kerzel, der mich vom ersten bis zum letzten Moment bei dieser Arbeit begleitet hat und der mich das wissenschaftliche Denken und Arbeiten gelehrt hat. Herr Kerzel hat mir mit viel Vertrauensvorsprung und Hilfsbereitschaft, unzähligen Tipps und dem entscheidenden Anstoß zum richtigen Zeitpunkt gezeigt wie man ein wissenschaftliches Projekt plant, umsetzt und auswertet und dabei bewiesen, dass man zielstrebig und ehrgeizig arbeiten kann, ohne auf ehrliche Freundlichkeit, Geduld und Fairness zu verzichten.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Tobias Rogosch, der mir sowohl die Methodik eines Labors erklärt als auch bei der Auswertung der Daten entscheidend geholfen hat. Für Hilfe und viele amüsante Stunden im Labor möchte ich Frau Regina Stöhr und Frau Sabine Jennemann danken.

Ich möchte betonen, dass diese Arbeit ohne das konstruktive, faire, freundliche Miteinander in der Arbeitsgruppe von Herrn Zemlin so definitiv nicht möglich gewesen wäre. Aus eigener Erfahrung, wie aus den Erzählungen befreundeter Doktoranden weiß ich, dass dies keine Selbstverständlichkeit ist.

Dann möchte ich Frau Katharina Bohne danken für ihr Verständnis und ihre Geduld. Es gab manche freie Stunde, die man auch anders hätte verbringen können, aber sie hat mich trotzdem bestärkt weiter zu arbeiten. Frau Karin Minnerup danke ich dafür, dass sie mir die Bearbeitung der Grafiken ermöglicht hat. Herrn Arne Göbbert danke ich für den guten Kaffee. Dem AS Pirin (Schwarz-Weiß wie Schnee) für alles.

Zu guter Letzt bin ich natürlich meinen Eltern (inkl. Jürgen Förster), meinen Großeltern (inkl. den „Oldentruppern“), sowie meinen Geschwistern und Klaus Förster zu riesen Dank verpflichtet. Sie ermöglichten mir das Studium der Medizin und die Dissertation. Sie waren immer für mich da, haben mich stets ermutigt und immer ohne Einschränkungen geholfen, wenn es mal wieder brenzlich wurde und dringend nötig war. Jeder hat, auch in schwierigen Situationen, auf seine Weise dazu beigetragen, dass die Dinge so sind wie sie sind und dafür bin ich sehr dankbar.