

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Immunologie  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Armin Saalmüller)

# **Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen porcines IgE**

## **Diplomarbeit**

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Elke Haiden

Wien, im Dezember 2019

## **Betreuerin:**

Ass.-Prof. Dr.med.vet. Martina Patzl  
Department für Pathobiologie  
Institut für Immunologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

## **Gutachter:**

Dr.med.vet. Lukas Schwarz  
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
Universitätsklinik für Schweine  
Veterinärmedizinische Universität Wien

## **Danksagung:**

Ich möchte mich zuerst aufrichtig bei meiner Betreuerin, Ass.-Prof. Martina Patzl, bedanken, die sowohl während der praktischen Arbeit, als auch während des Schreibprozesses, immer Unterstützung und ein offenes Ohr für alle Probleme parat hatte. Danke für die Gelegenheit, meine Diplomarbeit zu diesem Thema zu verfassen, danke für die Geduld, und alles, was ich in meiner Zeit am Institut lernen durfte!

Ein großes Dankeschön auch an Univ.-Prof. Dr. Armin Saalmüller für die Korrektur und fachliche Beratung. Danke auch an Kerstin Mair für die Unterstützung und die praktische Einführung in die Durchflusszytometrie.

Ich bedanke mich auch beim gesamten Team der Immunologie für die freundliche Aufnahme, die Kollegialität und die Hilfsbereitschaft!

Danke an meine Familie, insbesondere meine Mutter, die immer an mich glaubt!

An meine Uni-Freunde: Danke für die letzten Jahre – ohne euch wär's nicht (mehr) so gekommen, wie es gekommen ist. It was a wild ride.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Literaturübersicht.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Einleitung und Ziele.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Hypothese.....	2
<b>1.2. Immunglobulin E (IgE).....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Ursprung und Struktur.....	3
1.2.2. Bildung.....	4
1.2.3. Rezeptoren.....	6
1.2.4. Funktion und pathophysiologische Bedeutung.....	8
<b>1.3. Monoklonale Antikörper.....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Definition.....	13
1.3.2. Herstellung.....	13
<b>1.4. Anti-IgE.....</b>	<b>16</b>
1.4.1. Anwendung.....	16
1.4.1.1. Anti-IgE als Sekundärantikörper.....	16
1.4.1.2. Anti-IgE als Therapeutika.....	16
1.4.2. Herstellung.....	17
<b>1.5. Workflow dieses Projekts.....</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Materialien und Reagenzien.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.2.1. Herstellung des Immunogens und Immunisierung.....	30
2.2.2. Hybridomzellkultur.....	31
2.2.3. Screening der Hybridome.....	32
2.2.3.1. Dot-Blot.....	32
2.2.3.2. Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen.....	33
2.2.3.3. Screening der Klone auf FLAG <sup>®</sup> -pIgE-HEK 293T-Zellen.....	34
2.2.4. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper.....	36
2.2.4.1. 15-mer-Peptide.....	36
2.2.4.2. Lineares Epitop-Mapping im ELISA.....	38
2.2.4.3. Blocking Assay.....	39
2.2.4.4. Kompetitions-Assay.....	39
2.2.4.5. Test auf Kreuzreaktivität (ELISA).....	40
2.2.4.6. Immunpräzipitation.....	41
2.2.4.7. Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.2.4.8. Western Blot.....	43

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1. Screening der Hybridomzellen</b> .....	<b>44</b>
3.1.1. Dot-Blot.....	44
3.1.2. Screening der Klone auf FLAG <sup>®</sup> -pIgE-HEK 293T-Zellen.....	45
<b>3.2. Charakterisierung</b> .....	<b>46</b>
3.2.1. Lineares Epitop-Mapping im ELISA.....	46
3.2.2. Blocking Assay.....	48
3.2.3. Biotinylierung.....	52
3.2.4. Kompetitions-Assay.....	54
3.2.5. Test auf Kreuzreaktivität.....	55
3.2.6. Immunpräzipitation.....	56
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>57</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>60</b>
<b>6. Summary</b> .....	<b>61</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>62</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>64</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>69</b>

# 1. Einleitung und Literaturübersicht

## 1.1. Einleitung und Ziele

Das Schwein (*Sus scrofa*) gewinnt als Modellorganismus, sowohl in der biomedizinisch-pharmazeutischen Grundlagenforschung als auch in präklinischen Studien, zunehmend an Bedeutung. Dies ist Großteils durch seine genetische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen zu begründen (Mair et al. 2014). Das Schwein hat großes Potential, in weiteren Bereichen der Immunologie und Allergologie als Großtiermodell eingesetzt zu werden, was derzeit noch durch die geringe Verfügbarkeit spezifischer Antikörper für diese Spezies erschwert wird (Vernersson et al. 1997, Rupa et al. 2008). Auch in einer 2017 durchgeführten Studie über eosinophile Gastritis in gegen Erdnüsse sensibilisierten Ferkeln scheiterte der Nachweis von spezifischem IgE an einem geeigneten Antikörper gegen porcines IgE zur Durchführung eines ELISA (Mondoulet et al. 2017).

Besonders an einem monoklonalen Antikörper, der speziell zur Detektion von porcinem Immunglobulin E (porcines IgE, pIgE) geeignet ist, besteht großer Bedarf, um das Schwein zukünftig als Modell für diverse pathophysiologische Vorgänge, wie allergisches Geschehen oder die Immunantwort auf Parasitosen, einsetzen zu können (Rupa et al. 2008).

Dass IgE Typ I-Hypersensitivitätsreaktionen mediiert und somit eine tragende Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen spielt, ist mittlerweile hinreichend bekannt (Gould und Sutton 2008). Ebenso steht fest, dass IgE bei der Immunreaktion auf Parasitosen beteiligt ist, weiters gibt es Hinweise darauf, dass es bei der Reaktion auf Tiergifte eine Rolle spielt (Vernersson et al. 2004, Mukai et al. 2016). Seine Bedeutung bei physiologischen Prozessen ist jedoch nicht vollständig geklärt, und auch in Bezug auf therapeutische Interventionsmöglichkeiten bei IgE-medierten Erkrankungen, wie insbesondere bei Atopien und Allergien, besteht großer Forschungsbedarf, wofür das Schwein als Großtiermodell unverzichtbar ist. (Vernersson et al. 1997, van Gramberg et al. 2013). Dass es beispielsweise im Rahmen von Futtermittelallergien beim Schwein zu erhöhten IgE-Titern kommt, die als Marker für eine allergische Reaktion genutzt werden können, wurde bereits nachgewiesen. Somit hat die Detektion von IgE im Serum bei Schweinemodellen für Hypersensitivitätsreaktionen große Relevanz (Schmied et al. 2013).

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen porcines IgE wurde bisher durch verschiedene Umstände erschwert. Die bei Schweinen gemessenen IgE-Serumkonzentrationen – selbst bei experimentell mit Parasiten infizierten Tieren oder Tieren, die zum Zeitpunkt der Serumgewinnung eine klinische allergische Reaktion zeigten – sind zu niedrig, um als Immunogen für die Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet zu werden. Die kommerzielle Verfügbarkeit von Antikörpern gegen porcines IgE ist somit derzeit noch limitiert (Roe et al. 1993, Rupa et al. 2008).

Im Rahmen dieses Projektes wurden murine monoklonale Antikörper gegen porcines IgE mittels Hybridomtechnik hergestellt.

Als Immunogen für die Gewinnung muriner pIgE-spezifischer B-Zellen wurde rekombinantes pIgE verwendet. (Auf das Immunogen wird später näher eingegangen. Siehe: **2.2.1. Herstellung des Immunogens und Immunisierung**).

Nach HAT-Selektion und Kultivierung der Hybridome, wurden die Klone, die monoklonale Antikörper produzieren, mithilfe eines zweistufigen Screening-Verfahrens ermittelt.

Danach wurden die aufgefundenen monoklonalen Antikörper charakterisiert. Ein Epitop-Mapping wurde durchgeführt, die Kreuzreaktivität mit anderen Immunglobulinklassen wurde geprüft, und in weiteren Schritten wurde ihre Verwendbarkeit für verschiedene gängige immunologische Methoden ermittelt.

### **1.1.1. Hypothesen**

Die gewonnenen monoklonalen Antikörper sind in der Lage, ein Epitop auf porcinem IgE zu erkennen.

Die von unterschiedlichen Klonen produzierten Antikörper haben das Potential, unterschiedliche Epitope zu erkennen.

Porcines IgE ist mit diesen monoklonalen Antikörpern darstellbar.

## **1.2. Immunglobulin E (IgE)**

### **1.2.1. Ursprung und Struktur**

Immunglobulin E (IgE) ist eine Immunglobulinklasse, die erstmals in den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts als eine bis dahin unbekannte fünfte Immunglobulinklasse des Menschen beschrieben wurde (Ishizaka et al. 1966, Bennich et al. 1968). Vermutlich evolvierte IgE als Teil eines Effektormechanismus gegen Parasitosen. Heute ist es jedoch in erster Linie für seine Beteiligung an Hypersensitivitätsreaktionen Typ I bekannt (Gould und Sutton 2008, Sutton und Davies 2015).

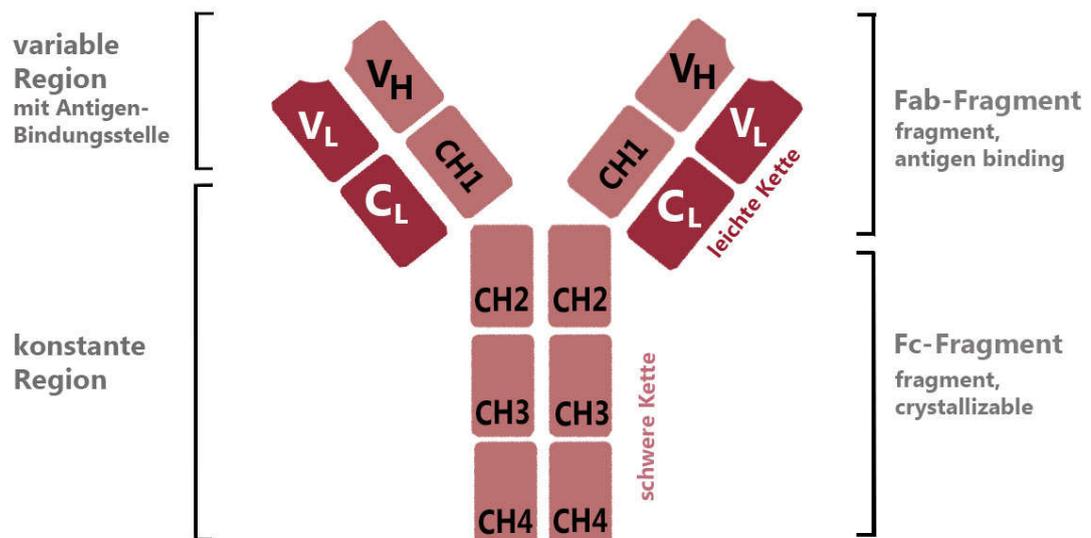
Die Entdeckung von IgE resultierte rasch in einem neuen Verständnis von allergischen Reaktionen, sowie deren klinischem Erscheinungsbild (Symptome) und ihrer Therapie. Vor allem im Kontext von Futtermittel- und Nahrungsmittelallergien gewann IgE in den letzten Jahren erneut an Bedeutung (Platts-Mills et al. 2016).

Wie auch Immunglobulin G (IgG) ist IgE eine Immunglobulinklasse, die bislang nur bei Säugetieren nachgewiesen wurde. Es gibt keine Hinweise darauf, dass IgG oder IgE bei Vögeln, Reptilien oder Amphibien auftreten (Warr et al. 1995). Das aviäre Immunglobulin Y (IgY) stimmt mit IgE in seiner Struktur (und Anzahl der konstanten Regionen der schweren Kette) überein. IgY ist bei Vögeln die Antikörperklasse mit der höchsten Serumkonzentration, und in diversen Aspekten seiner Funktion – wie beispielsweise Komplementaktivierung und Opsonisierung – mit IgG vergleichbar (Lundqvist et al. 2006). IgY kann andererseits auch die Sensibilisierung gegen ein Antigen vermitteln und ist an Hypersensitivitätsreaktionen beteiligt. Somit vereint IgY die Eigenschaften der Säugetier-Immunglobulinklassen IgG und IgE, und es wird angenommen, dass es sich dabei um deren evolutionären Vorgänger handelt, der sich im Laufe der Entwicklung gespalten hat (Faith und Clem 1973, Warr et al. 1995).

Das für IgE kodierende Gen ist evolutionär hoch konserviert (Hellman 1993). Die Aminosäuresequenzen der IgE-Moleküle verschiedener Spezies zeigen eine Übereinstimmung von bis zu 61 %. Die Ähnlichkeit zu IgM – also dem Immunglobulin, das als am stärksten konserviert gilt – beträgt etwa 25 % (Navarro et al. 1995).

IgE ist ein Glykoprotein mit einer Größe von etwa 190 kDa. Im Vergleich zu anderen Immunglobulinen ist der Grad der Glycosylierung sehr hoch (Navarro et al. 1995, Rupa et al. 2008). Es besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, und entspricht damit in

seiner Grundstruktur den anderen Immunglobulinen (Abb. 1). Von seinem (anzunehmend) nächsten Verwandten IgG unterscheidet es sich jedoch durch diverse Charakteristika. So weist IgE (wie auch IgM und der evolutionäre Vorgänger IgY) mit CH4 eine zusätzliche konstante Domäne der schweren Kette auf. Eine *hinge*-Region fehlt (Warr et al. 1995, Sutton et al. 2019).



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgE-Moleküls.** Es weist dieselbe Vier-Ketten-Struktur wie andere Immunglobuline auf, wobei die schweren Ketten aus vier konstanten Domänen bestehen (Sutton et al. 2019).

### 1.2.2. Bildung

Immunglobuline bilden die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems und werden von Plasmazellen gebildet. Diese sind die Effektorzellen, die nach Aktivierung von B-Lymphozyten durch Antigenkontakt gebildet werden und in weiterer Folge spezifische Antikörper herstellen. Zur Produktion von IgE durch aktivierte B-Zellen kommt es erst nach einem Klassenwechsel (beim Menschen in erster Linie von IgG1 zu IgE), der nur unter bestimmten Bedingungen stattfindet. Dieser Klassenwechsel findet in Lymphknoten oder Lymphfollikeln statt (Murphy und Weaver 2017).

Der Klassenwechsel von IgG oder IgM zu IgE ist T-Zell abhängig (Geha et al. 2003). Dafür muss zuerst eine naive  $CD4^+$  T-Zelle einem Zytokinmilieu ausgesetzt sein, das die Differenzierung in  $T_H2$ -Zellen fördert.  $T_H2$ -Zellen entstehen in erster Linie in der Gegenwart von Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-9 und IL-13. Die Produktion dieser Zytokine überwiegt beispielsweise in der Haut und im Bereich respiratorischer und gastrointestinaler Schleimhäute. Damit überwiegt ein Milieu an den potentiellen Eintrittspforten für multizelluläre Parasiten und Allergene, das die Differenzierung in  $T_H2$ -Zellen, und in weiterer Folge die Bildung von IgE, begünstigt.  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4 und IL-13, welche den aktivierten B-Zellen als erstes Signal für den Klassenwechsel zu IgE dienen und gleichzeitig die  $T_H2$ -Antwort weiter fördern. Als zweites Signal kommt es zu einer Interaktion zwischen dem CD40-Liganden auf der  $T_H2$ -Zell-Oberfläche und CD40 auf der aktivierten B-Zelle. Dieses kostimulatorische Signal wird für jeden Antikörper-Klassenwechsel benötigt (Murphy und Weaver 2017).

Es gibt Hinweise darauf, dass unter bestimmten Bedingungen ein Klassenwechsel ohne Beteiligung von  $T_H2$ -Zellen stattfinden kann, wobei noch nicht ganz geklärt ist, unter welchen Umständen es dazu kommt. So sind diverse Signalwege zum IgE-Klassenwechsel beschrieben, die IL-4 in Verbindung mit Kortikosteroiden, die Transkriptionsfaktoren BAFF/APRIL oder C4BP (Komplementbindendes Protein 4) involvieren, aber von einer T-Zell-Antwort unabhängig sind (Geha et al. 2003).

IgE-produzierende Plasmazellen scheinen relativ kurzlebig zu sein. So sind 35 Tage nach Kontakt mit einem Allergen nur noch 1 % der Ausgangspopulation an  $IgE^+$  Plasmazellen im Knochenmark nachweisbar. Es wurden allerdings B-Gedächtniszellen nachgewiesen, die bei wiederkehrendem Kontakt mit dem Antigen offenbar einen sofortigen Klassenwechsel von IgG1 zu IgE durchführen können (Talay et al. 2012).

### 1.2.3. Rezeptoren

Um Funktion und pathophysiologische Bedeutung von IgE genauer betrachten zu können, muss auf die Interaktion von IgE mit seinen Rezeptoren eingegangen werden.

Es gibt zwei Typen von IgE-Rezeptoren: FcεRI und FcεRII/CD23.

FcεRI ist ein hoch affiner Rezeptor der zur Immunglobulin-Superfamilie zählt, und hauptsächlich von Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert wird (Murphy und Weaver 2017), aber auch von verschiedenen anderen Zelltypen, wie beispielsweise diversen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, Langerhans'sche Zellen), sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Murphy und Weaver 2017). Beim Menschen wurde dieser Rezeptortyp auch auf respiratorischen und intestinalen Epithelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen (Sutton und Davies 2015).

FcεRI besteht aus zwei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Region, die von vier Polypeptidketten: α, β, sowie zwei γ-Ketten gebildet werden (Abb. 2). Die extrazelluläre Region besteht aus zwei Domänen der Immunglobulin-Superfamilie (α(1) und α(2)), gebildet von der α-Kette des Rezeptors. Diese extrazelluläre Region hat die Kapazität, IgE zu binden. Die β-Kette und die beiden γ-Ketten bilden intrazellulär je ein ITAM (tyrosine-based activation motif), welches die Signaltransduktion ins Zellinnere vermittelt. Die β-Kette durchquert die Membran viermal, die α-Kette und die beiden γ-Ketten je einmal (Sutton und Davies 2015, Sutton et al. 2019).

Der von Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimierte FcεRI ist ein Tetramer aus vier Polypeptidketten. Auf anderen Zelltypen wurden jedoch FcεRI-Rezeptoren nachgewiesen, welche keine β-Kette aufweisen. Die Funktion der β-Kette ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sie die Signaltransduktion verstärkt oder eine Rolle bei der Regulation der FcεRI-Oberflächenexpression spielt (Sutton et al. 2019).

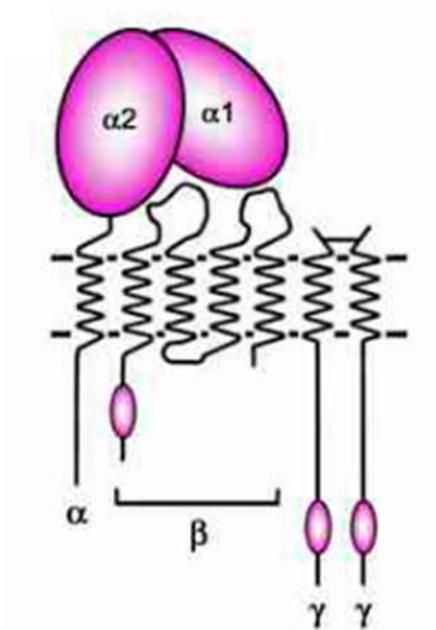


Abb. 2: Schematische Darstellung des vollständigen Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors (Sutton et al. 2019).

Bei anderen Immunglobulinen findet die Interaktion mit dem Rezeptor erst nach Antigenbindung (also in Form von Antigen-Antikörper-Komplexen) statt. IgE stellt in dieser Hinsicht eine Ausnahme dar, da es auch in Abwesenheit des Antigens an seinen hochaffinen Rezeptor Fc $\epsilon$ RI bindet und somit großteils an der Oberfläche von Fc $\epsilon$ RI-exprimierenden Zellen gebunden vorliegt (Murphy und Weaver 2017).

Bei Bindung von Antigenen oder Allergenen kommt es zur Quervernetzung von Fc $\epsilon$ RI-gebundenem IgE auf der Zelloberfläche und dadurch zu den mit einer allergischen Reaktion verbundenen pathophysiologischen Konsequenzen (siehe: **1.2.4. Funktion und pathophysiologische Bedeutung**). Hohe IgE-Spiegel resultieren in einer Hochregulation von Fc $\epsilon$ RI auf Mastzellen, wodurch die Sensitivität gegenüber dem Allergen verstärkt wird (Murphy und Weaver 2017). Die Rolle der Fc $\epsilon$ RI-IgE-Interaktion bei Hypersensitivitätsreaktionen ist somit gut bekannt, seine Bedeutung bei der Immunantwort auf Parasiten ist jedoch noch nicht ganz geklärt (Vernersson et al. 2004).

Fc $\epsilon$ RII (oder CD23) ist ein Rezeptor mit geringerer Affinität für IgE. Er zählt zur Familie der C-Typ-Lektin-Rezeptoren und ist auf vielen Zelltypen vertreten, wie beispielsweise B-Zellen,

aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen (Murphy und Weaver 2017). Auch auf respiratorischen und gastrointestinalen Epithelzellen wurde FcεRII/CD23 nachgewiesen. FcεRII/CD23 existiert sowohl in einer gelösten (sCD23) als auch in einer membrangebundenen Form (mCD23) (Sutton und Davies 2019). Die Funktion von FcεRII/CD23 ist nicht restlos geklärt und variiert stark je nach exprimierendem Zelltyp. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass der Rezeptor einerseits eine wesentliche Rolle in der IgE-Homöostase spielt, und andererseits bei der Antigenpräsentation sowie der Transzytose von Antigenen im Respirations- und Gastrointestinaltrakt involviert ist (Gould und Sutton 2008, Murphy und Weaver 2017, Sutton und Davies 2019). Hine et al. beschrieben 2010 den Nachweis von FcεRII/CD23-RNA-Transkripten in Milchdrüsen-Epithelzellen von Schafen. Dies weist darauf hin, dass FcεRII/CD23 am Transport von IgE ins Kolostrum, beziehungsweise in die Milch während der gesamten Laktation beteiligt ist und somit auch bei der passiven Immunisierung der Jungtiere eine Rolle spielen könnte.

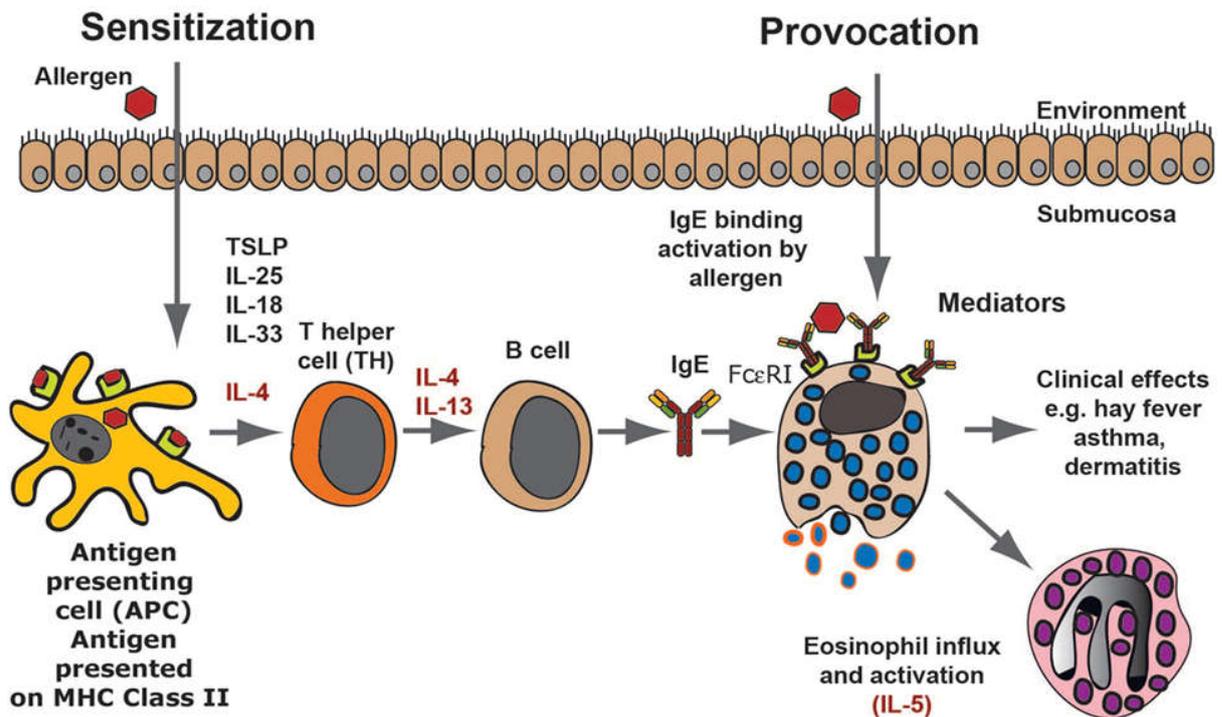
#### **1.2.4. Funktion und pathophysiologische Bedeutung**

Große Bedeutung kommt IgE im Kontext von Typ I-Hypersensitivitätsreaktionen zu, nicht zuletzt, weil die Prävalenz von Allergien, vor allem in der westlichen Welt, in den letzten Jahrzehnten immer weiter ansteigt (Romagnani 2004).

Typ I-Hypersensitivitätsreaktionen werden durch IgE mediiert. Dabei kommt es beim Erstkontakt mit einem Antigen zu einer sogenannten Sensibilisierung, bei der IgE-Antikörper gegen das Antigen gebildet werden. Dies beinhaltet einen Immunglobulin-Klassenwechsel, wie oben beschrieben. Als Atopie bezeichnet man die Prädisposition für eine solche Sensibilisierung gegen ein Umweltantigen (Murphy und Weaver 2017).

Kommt ein sensibilisiertes Individuum erneut mit dem Antigen in Kontakt, bindet dieses an IgE, das nach dem Erstkontakt gebildet wurde und bereits an den FcεRI auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden ist (Abb. 3). Dadurch kommt es zu einer Quervernetzung der Rezeptormoleküle, was zu einer schlagartigen Degranulation der Mastzellen führt, wobei vasoaktive Stoffe (Histamin und Heparin), sowie diverse Enzyme mit Proteasewirkung aus den Granula freigesetzt werden (Gould und Sutton 2008, Murphy und Weaver 2017).

Gleichzeitig mit der Freisetzung der Granula werden Prostaglandine, Leukotriene und plättchenaktivierender Faktor neu synthetisiert und die Zytokin- und Chemokintranskription aktiviert. Dadurch kommt es lokal zu einer Entzündungsreaktion mit den entsprechenden Symptomen (Oettgen und Geha 2001, Murphy und Weaver 2017) und der Einwanderung weiterer Immunzellen an den Entzündungsort (Hellman et al. 2017). Die klinischen Symptome einer Hypersensitivitätsreaktion ergeben sich als direkte Konsequenz dieser pathophysiologischen Kettenreaktion.



**Abb. 3: Schematische Darstellung einer allergischen Immunreaktion (Hellman et al. 2017).** Das Antigen wird von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und naiven T-Zellen präsentiert, die in einem passenden Zytokinmilieu zu  $T_H2$ -Zellen werden. Diese produzieren IL-4 und IL-13, welche den Klassenwechsel zu IgE vorantreiben. Nach Sensibilisierung bindet IgE an seine Rezeptoren an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten und weiteren Zelltypen, die fakultativ FcεRI exprimieren. Es kommt in der Folge zur Quervernetzung des Rezeptors und dadurch zu einer Ausschüttung der Mediatoren aus den Granula, sowie spezifischer Genexpression, wobei wieder vermehrt  $T_H2$ -Zytokine gebildet werden. Bei andauernder Allergenexposition entsteht eine Entzündungsreaktion und mit entsprechenden klinischen Konsequenzen.

Mastzellen sind vor allem in Haut und Schleimhaut zu finden. Ihre physiologische Funktion und Bedeutung liegt in der Auslösung einer Entzündungsreaktion, besonders bei Parasitenbefall. Daher sind die klinischen Symptome und Folgen einer allergischen Reaktion nicht nur von der Dosis des Antigens, sondern auch in hohem Maße von der Eintrittspforte abhängig (Murphy und Weaver 2017).

So führt eine Hypersensitivitätsreaktion im Respirationstrakt in erster Linie zu Bronchokonstriktion, einem Anstieg der Schleimproduktion und der Bildung eines Bronchialödems (Oettgen und Geha 2001). Im Gastrointestinaltrakt, beispielsweise im Kontext von Nahrungs- oder Futtermittelallergien, kommt es in erster Linie zu einer Steigerung der Peristaltik und der Schleimsekretion. Blutgefäße reagieren mit einem Anstieg der Permeabilität, es kommt zu erhöhtem Lymphfluss zu regionalen Lymphknoten. In der Peripherie kommt es durch die Permeabilitätssteigerung zu einem Versacken von Flüssigkeit im extravaskulären Raum, welche zu einem Blutdruckabfall führen. Dieser und die Ödembildung, hauptsächlich in Subcutis oder Submucosa, können zum anaphylaktischen Schock führen (Murphy und Weaver 2017).

Die ursprüngliche Funktion der IgE-Antwort und der darauf folgenden Entzündungskaskade ist höchstwahrscheinlich die rasche Elimination von Parasiten auf der Schleimhaut (Gould und Sutton 2008, Murphy und Weaver 2017).

Besonders die Reaktion auf multizelluläre Parasiten wie Helminthen geht mit einer durch  $T_H2$ -Zellen medierte Immunreaktion und erhöhten IgE-Titern einher. Sowohl antigenspezifisches, als auch unspezifisches IgE sind im Rahmen von Parasitosen erhöht (Mukai et al. 2016, Anthony et al. 2007). Die Funktion von IgE bei der Immunantwort auf Parasiten ist nicht vollständig geklärt (Anthony et al. 2007). Es kann aber davon ausgegangen werden, dass eine Quervernetzung von  $Fc\epsilon RI$ -gebundenem IgE auf der Oberfläche von Mastzellen zu einer Entzündungskaskade führt, die die Elimination des Parasiten begünstigt (Anthony et al. 2007, Murphy und Weaver 2017).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass das unspezifische IgE, das bei der Immunantwort auf multizelluläre Parasiten gebildet wird, eher einen Schutzmechanismus für den Parasiten als für den Wirt darstellt. Das ist dadurch begründet, dass das unspezifische IgE, das bei einer Parasitose initial gebildet wird, das später gebildete antigen-spezifische IgE an seinen Rezeptoren kompetitiv hemmt (Pritchard 1993).

Die physiologische Funktion von IgE scheint auch bei der Reaktion auf Tiergifte eine Rolle zu spielen (Mukai et al. 2016). Dabei handelt es sich nicht nur um schwere allergische Reaktionen bis hin zur Anaphylaxie, sondern es gibt auch Hinweise auf einen IgE-abhängigen Mechanismus der Resistenzbildung. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mäuse nach erfolgter Sensibilisierung mit Bienengift, bei Reexposition eine schnellere humorale Immunantwort und eine höhere Überlebensrate aufwiesen (Marichal et al. 2013).

IgE-medierte Immunreaktionen, unabhängig von der Art des verursachenden Antigens, sind gewissermaßen selbst erhaltend. Mastzellen und basophile Granulozyten, die durch Quervernetzung des gebundenen Antigens aktiviert wurden, exprimieren den CD40-Liganden und produzieren IL-4. Damit treiben sie aktiv den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE voran (Murphy und Weaver 2017).

Die IgE-Serumkonzentration unterliegt starken situationsbedingten Schwankungen. So ist im Falle einer klinischen allergischen Reaktion der IgE-Titer auf das bis zu zehnfache erhöht. Bei Menschen mit einer Parasitose wurden bereits tausendfach erhöhte IgE-Titer nachgewiesen, jedoch zeigen sich starke individuelle Unterschiede (Lawrence et al. 2017).

Während vor allem beim Menschen viel über Funktion und Konzentration von IgE bei verschiedenen Erkrankungen bekannt ist, und auch bei Hunden, Katzen und Pferden vor allem bei Allergien Parallelen zur humanen Pathophysiologie gefunden wurden, ist das Wissen über Funktion und Konzentration von IgE beim Schwein noch sehr spärlich.

## **1.3. Monoklonale Antikörper**

### **1.3.1. Definition**

Bei einer Immunreaktion *in vivo* wird eine polyklonale humorale Immunantwort gegen ein Antigen ausgelöst. Das bedeutet, dass die von verschiedenen B-Lymphozyten gebildeten Immunglobuline für unterschiedliche Epitope des Antigens spezifisch sind und diese meist auch mit unterschiedlicher Affinität erkennen. Polyklonale Antisera variieren somit, je nachdem, welches Individuum zur Gewinnung genutzt wurde. Selbst Antisera von genetisch identen Tieren, die mit demselben Immunogen in Kontakt gekommen sind, zeigen Unterschiede bezüglich Spezifität und Avidität. Monoklonale Antikörper dagegen binden an ein definiertes Epitop mit konstanter Affinität, da sie von einer einzigen B-Zelle abstammen (National Research Council 1999, Murphy und Weaver 2017).

Monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies, mAb) gehören heute zum Standardrepertoire für serologische Assays, die serologische Diagnostik, sowie die Therapie diverser Erkrankungen (Murphy und Weaver 2017).

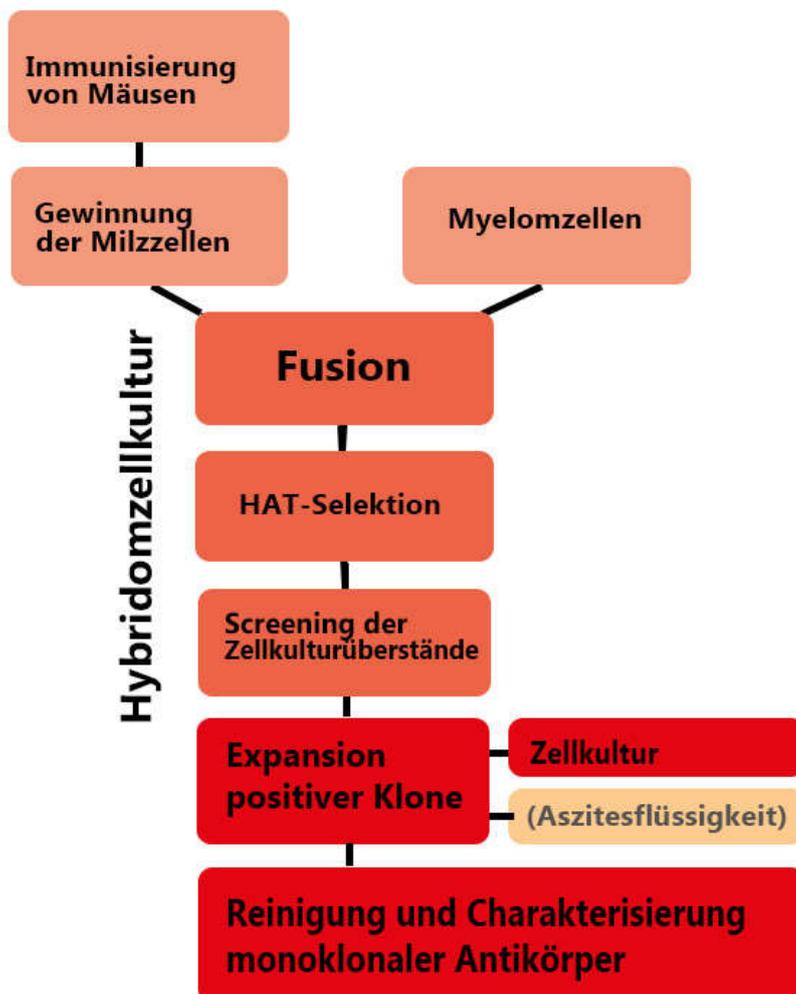
### **1.3.2. Herstellung**

Köhler und Milstein gelang es erstmals 1975, mAb definierter Spezifität herzustellen. Dafür gewannen sie Milzzellen von immunisierten BALB/c-Mäusen und führten eine Sendai-Virus-induzierte Fusion mit Maus-Myelomzellen durch. Die so hybridisierten Zellen hatten die Kapazität, unendlich zu proliferieren und einzelne Klone produzierten mAb gegen das Immunogen.

Nach der Fusion der B-Zelle mit der Myelomzelle erfolgt eine Selektion der Zellen, mit dem Ziel, nur die B-Zell-Myelom-Hybride (Hybridome) weiter zu kultivieren. Dafür wird ein Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) verwendet, in dem die nicht fusionierten Myelomzellen nicht überleben können, da Folsäure durch Aminopterin antagonisiert wird, und sie durch einen Enzymdefekt Hypoxanthin nicht zur Purinsynthese nutzen können. Auch nicht fusionierte B-Zellen sind nicht fähig, längerfristig im Kulturmedium zu überleben. Somit werden nach der HAT-Selektion nur fusionierte Zellen weiterkultiviert. Da jede Hybridomzelle von einer einzelnen B-Zelle abstammt, müssen die Zellen vereinzelt und einzeln kultiviert werden. Nur Abkömmlinge derselben Hybridomzelle erzeugen

Antikörper, die in Struktur, Affinität und Spezifität identisch sind und somit exakt dasselbe Epitop erkennen (Köhler und Milstein 1975, Murphy und Weaver 2017).

Diese Technik revolutionierte den Einsatz von Antikörpern in Forschung, Industrie und angewandter Medizin. Sie wird als Hybridomtechnik bezeichnet und bis heute routinemäßig angewendet (Murphy und Weaver 2017). Der grundsätzliche Ablauf hat sich seit der erstmaligen Beschreibung kaum verändert (Abb. 4).



**Abb. 4: Produktion monoklonaler Antikörper mittels Hybridomtechnik.**

Nach Gewinnung der Hybridomzellen und Identifikation der Klone, die mAb produzieren, gibt es zwei Möglichkeiten für deren Expansion. Einerseits kann die weitere Kultivierung *in vitro* stattfinden, was in etwa 90% der Fälle möglich und zu bevorzugen ist. Andererseits können

Hybridomzellen in die Bauchhöhle von Mäusen injiziert und die mAb aus deren Aszitesflüssigkeit isoliert werden. Die Aszites-Methode hat zwar diverse Vorteile, wird aber aus Tierschutzgründen nur mehr in Ausnahmefällen angewendet. Aszitesflüssigkeit enthält im Regelfall höhere Antikörperkonzentrationen als die *in vitro* gewonnenen Zellkulturüberstände. Außerdem können Glykosylierungsmuster von *in vitro* gewonnenen Antikörpern abweichen, was in einer Änderung in Affinität und Bindungskapazität resultiert. Außerdem gibt es einzelne Hybridomzelllinien – wie etwa Rattenhybridome – die *in vitro* schwer kultivierbar sind (National Research Council 1999).

Grundsätzlich wird die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern aus Zellkulturüberständen bevorzugt, da die Zahl der genutzten Tiere dadurch reduziert wird, und die *in vitro*-Kultivierung der Zellen deutlich weniger logistischen Aufwand erfordert (Campbell 1984, National Research Council 1999).

Der Zeithorizont für die Herstellung von mAb – von der Immunisierung der Spendertiere bis zur Isolation – variiert je nach Protokoll. In der Literatur wird von mindestens 40 Tagen ausgegangen, wobei eine Durchflusszytometrie-basierte Screening-Methode den Prozess beschleunigt (Akagi et al. 2018, Kuhne et al. 2014).

## **1.4. Anti-IgE**

### **1.4.1. Anwendung**

Antikörper gegen IgE haben vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der Entwicklung von diagnostischen Tests und als Therapeutika.

#### **1.4.1.1. Anti-IgE als Sekundärantikörper**

Für serologische Assays, mit denen Serum-IgE quantifiziert werden kann, werden anti-IgE Antikörper benötigt. Diese Tests können zur Charakterisierung sowie zur Diagnose allergischer Reaktionen und bei Erkrankungen wie Parasitosen genutzt werden.

Verfahren, für die monoklonale Sekundär-Antikörper routinemäßig genutzt werden sind beispielsweise ELISA, Radio-Allergo-Sorbent-Tests (RAST) und Western Blot (Wachholz et al. 2005). Eines der Hauptprobleme bei der Anwendung von anti-IgE-Antikörpern bei diesen Methoden – speziell wenn es sich bei den zu untersuchenden Proben um native Serumproben handelt – ist die potentielle Kreuzreaktivität mit IgG, dessen Serumkonzentration die von IgE um ein Vielfaches übersteigt (Wachholz et al. 2005). Dies verdeutlicht, dass in erster Linie mAb mit genau definierter Spezifität für diese Anwendungen benötigt werden.

#### **1.4.1.2. Anti-IgE als Therapeutikum**

Die therapeutische Anwendung von anti-IgE in der Allergie-Therapie basiert in erster Linie auf einer Neutralisierung von freiem IgE im Serum (Blut) (Hu et al. 2018).

Antikörper gegen menschliches IgE für therapeutische Zwecke sind vielfach verfügbar und etabliert. So wird in der Humanmedizin das zugelassene Medikament Omalizumab (Xolair®, Novartis, Basel, Schweiz) – ein rekombinanter humanisierter monoklonaler anti-IgE-Antikörper des Isotyps IgG1 – seit fast 20 Jahren vor allem in der Therapie von schwerem Asthma eingesetzt (Soler 2001). Omalizumab bindet an eine Region der schweren Kette (CH3) und blockiert damit die Interaktion von freiem IgE mit dem FcεRI-Rezeptor. Bereits an Zelloberflächen gebundenes IgE wird dadurch nicht blockiert. Die Omalizumab-Therapie resultiert auch in einer effektiven Verminderung der FcεRI-Rezeptordichte auf Mastzellen,

sodass kaum mehr IgE an Mastzellen binden kann (MacGlashan Jr et al. 1997, Stokes 2017).

Ähnliche zum Zweck der therapeutischen Verwendung generierte anti-IgE-Präparate, wie Ligelizumab oder CMAB007, befinden sich derzeit in verschiedenen Stufen der klinischen Evaluierung (Hu et al. 2018). Präparate wie Omalizumab haben das Potential, auch außerhalb der Asthmathherapie zum Einsatz zu kommen. So ist es auch für die Therapie von chronischer Urticaria zugelassen, und es gibt Hinweise darauf, dass es bei der Behandlung von allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelallergien indiziert sein könnte (Stokes 2017).

Ein ähnlicher Ansatz ist der Einsatz von rekombinantem FcεRI als Therapeutikum. Rekombinante Formen des Rezeptors – beziehungsweise seiner extrazellulären Domänen – haben, gelöst im Serum, die Kapazität, die Fc-Region von freiem IgE zu binden und somit die Mastzelldegranulation und Zytokinsekretion durch basophile Granulozyten zu verhindern (Platzer et al. 2011). In *in vivo*-Modellen von cutaner Anaphylaxie wurde dies bereits erfolgreich getestet. Auch wurde bestätigt, dass durch den Einsatz von rekombinantem FcεRI eine direkte Abnahme der IgE-Produktion bewirkt werden kann (Yanagihara et al. 1994, Platzer et al. 2011).

#### **1.4.2. Herstellung**

MAb wurden bisher nicht nur gegen menschliches IgE hergestellt, sondern auch gegen IgE unterschiedlicher Spezies, wie beispielsweise Ratten (Rup 1989) und Rinder (Thatcher und Gershwin 1988). Diese mAb wurden in erster Linie mit der Intention hergestellt, als Sekundärantikörper für die Forschung an Hypersensitivitätsreaktionen verwendet zu werden. Sie werden nicht für therapeutische Zwecke genutzt.

MAb gegen canines IgE wurden von DeBoer et al. 1993 mithilfe von murinen Hybridomzelllinien generiert – ebenfalls mit der Intention, diese für serologische Assays zur Charakterisierung allergischer Reaktionen bei Hunden zu verwenden. Zur Immunisierung der Mäuse zur B-Zell-Gewinnung wurden hier „gepoolte“ Serumproben verwendet. Diese stammten sowohl von Tieren, die experimentell mit Parasiten infiziert worden waren, als auch von Patiententieren, die klinische Anzeichen einer Atopie zeigten. Diese Serumproben

wurden jeweils in eine IgE- und eine IgG-reiche Fraktion geteilt und zur Immunisierung von Mäusen genutzt. Nach B-Zell-Gewinnung und Fusion der Hybridome, erfolgte die Kultivierung der Hybridomzellen in der Aszites-Flüssigkeit von BALB/c-Mäusen. Die Ergebnisse dieses Projekts zeigen deutlich potentielle Schwierigkeiten auf, die bei der Gewinnung von monoklonalem anti-IgE infolge einer Immunisierung mit aus Serum isoliertem IgE auftreten können. Es stellte sich als sehr schwierig heraus, bei der Präzipitation und Reinigung des Immunogens IgE von IgG zu trennen. Die IgE-reiche Fraktion für die Herstellung des IgE-Immunogens enthielt schlussendlich einen hohen IgG-Anteil (>90 %), und nur ein geringer Teil der gewonnenen mAb erkannte IgE am Ende spezifisch. Die generierten anti-IgE-Antikörper variierten deutlich in ihrer Affinität (DeBoer et al. 1993).

Der Hund hat ebenfalls großes Potential als Allergiemodell und zeigt beispielsweise in der Expression von FcεRI auf Zelloberflächen im Rahmen allergischer Immunreaktionen deutlich größere Analogie zum Menschen, als etwa Mäuse und Ratten (Hammerberg 2009).

Gegen felines IgE wurden bereits von Talbott und Strausser 1977 polyklonale Antisera hergestellt. Dafür wurden Kaninchen mit einer IgG-IgE-Fraktion aus Katzenserum immunisiert, es handelte sich bei den gewonnenen Antikörpern somit nicht um reines anti-IgE. MAb gegen felines IgE sind zwar kommerziell erhältlich, es ist jedoch keine Literatur über deren Herstellung oder intendierte Verwendung erhältlich. Bei Katzen ist anti-IgE vor allem im Kontext von Futtermittelallergien, atopischen Hauterkrankungen und respiratorischen Erkrankungen relevant, wobei es hier sowohl in der Forschung, als auch in der Diagnostik eine Rolle spielen könnte (Reinero 2009).

Antikörper gegen porcines IgE wurden ebenfalls bereits hergestellt, allerdings ist bislang nur die Gewinnung polyklonaler Antisera beschrieben (Roe et al. 1993, Rupa et al. 2008). So wurde etwa von Roe et al. 1993, nach Induktion einer allergischen Reaktion mittels *Ascaris suum*-Antigen, IgE aus dem Serum von Ferkeln isoliert. Mit dem gereinigten Serum-IgE wurden Kaninchen immunisiert, um so polyklonale Antisera zu gewinnen und zu charakterisieren. Unter anderem wurde im Rahmen der Charakterisierung dieser Antisera beobachtet, dass das so hergestellte anti-IgE menschliches IgE im Western Blot detektieren konnte.

Ein weiterer Versuch polyklonales anti-pIgE herzustellen wurde von Rupa et al. 2008 beschrieben, wobei hier Erdnuss-Antigen zur Induktion der IgE-Antwort bei Schweinen

eingesetzt wurde. Mit aus deren Serum isoliertem IgE wurden ebenfalls Kaninchen immunisiert, und diese zur Gewinnung polyklonaler Antisera verwendet. Hier wurde gezeigt, dass Antikörper gegen murines und menschliches IgE die Kapazität haben, auch porcines IgE zu erkennen.

Trotz der Verfügbarkeit dieser Daten sind Antikörper gegen porcines IgE bislang nur beschränkt kommerziell erhältlich (Rupa et al. 2009). Versuche, polyklonales anti-pIgE für die Anwendung in serologischen Assays zu reinigen und zu etablieren, waren bislang nicht erfolgreich (Vernersson et al. 1997).

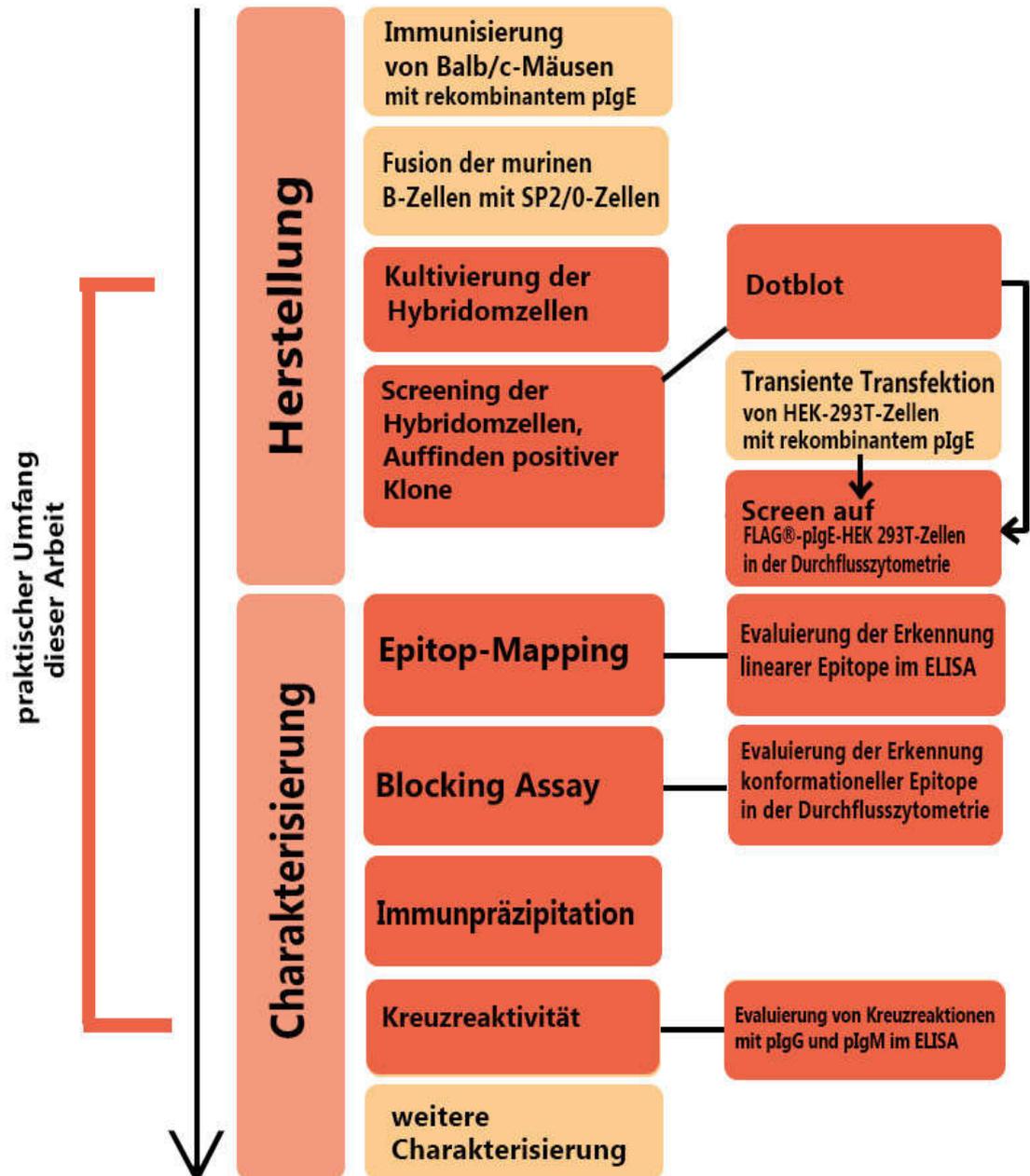
## 1.5. Workflow dieses Projekts

Für die Herstellung der mAb, die in dieser Diplomarbeit beschrieben werden, wurde ein rekombinantes pIgE-Konstrukt für die Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung der spezifischen B-Zellen verwendet.

Das für die schwere Kette des porcinen IgE-Moleküls kodierende Gen wurde von Vernersson et al. 1997 sequenziert und die Sequenz von 567 Aminosäuren veröffentlicht. Für die Gewinnung und Klonierung dieser Sequenz wurden Schweine mit *Ascaris suum*-Antigen immunisiert. cDNA aus Milz und Lymphknoten wurde isoliert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die benötigten Primer wurden auf der Basis der Nukleotidsequenzen stark konservierter Regionen der IgE  $\epsilon$ -Kette anderer Spezies generiert (Vernersson et al. 1997). Diese Herangehensweise war bereits bei der Sequenzierung des IgE-Moleküls anderer Spezies erfolgreich – beispielsweise bei equinem IgE (Navarro et al. 1995). Die Domänen 2 – 4 der konstanten Region der  $\epsilon$ -Kette des pIgE-Moleküls wurden am N-terminalen Ende mit einem sechsfachen HIS-Tag versehen (6xHIS-tagged pIgE) und mithilfe eines Bakulovektors in Insektenzellen eingebracht, die darauf das entsprechende Protein exprimierten (Vernersson et al. 1997).

Für dieses Projekt fungierte diese so ermittelte Sequenz (Vernersson et al. 1997), ebenfalls versehen mit einem N-terminalen 6xHIS-Tag, als Grundlage für die Erstellung eines Plasmidvektors, durch den das Immunogen für die Gewinnung mAb gegen porcines IgE von HEK-EBNA-Zellen exprimiert werden konnte. Das rekombinante Produkt wurde ins Zellkulturmedium abgegeben und mittels Nickel IMAC (immobilized metal-chelat chromatography) gereinigt und angereichert.

Die weiteren Schritte der Herstellung entsprechen der klassischen Vorgehensweise zur Immunisierung, Fusion und Kultivierung von Hybridomzellen, wobei für das Screening der Hybridome die zuvor beschriebene Sequenz (Vernersson et al. 1997) mit einem FLAG<sup>®</sup>-Tag versehen für die transiente Transfektion von HEK-Zellen genutzt wurde (siehe: **2. Material und Methoden**). Das Screening erfolgte in zwei Stufen. Ein Dot-Blot wurde verwendet um jene Klone zu identifizieren, die in der Lage waren Immunglobuline zu bilden. Diese wurden in einem zweiten Schritt (Screen auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen mittels Durchflusszytometrie) auf Spezifität geprüft. Der praktische Teil dieser Diplomarbeit umfasste die Kultivierung und das Screening der Klone auf Produktion von mAb, sowie diverse Charakterisierungsschritte (Abb. 5).



**Abb. 5: Workflow dieses Projekts.**

MAb gegen porcines IgE wurden mittels Hybridomtechnik hergestellt, wobei ein zweistufiges Verfahren für das Screening der Klone angewendet wurde. Jene Klone, bei denen im Zellkulturüberstand im Dot-Blot eine Produktion von Immunglobulinen nachgewiesen werden konnte, wurden auf FLAG®-IgE produzierenden HEK 293T Zellen auf Spezifität für pIgE mittels Durchflusszytometrie getestet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien und Reagenzien

Die folgenden Tabellen enthalten eine vollständige Auflistung aller Materialien, Reagenzien und Kits (Tab. 1), Sekundärantikörper (Tab. 2) und Geräte (Tab. 3), die im Rahmen des praktischen Teils dieser Diplomarbeit verwendet wurden. In Tab. 4 ist die Zusammensetzung aller verwendeten Medien, Puffer und Lösungen angegeben.

<b>Tab. 1: Materialien, Reagenzien und Kits</b>	
<b>Tab. 1a: Hybridomzellkultur</b>	
Fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
Glucose	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) Media Supplement (50x) Hybri-Max™	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
HT (Hypoxanthin, Thymidin) Media Supplement (50x) Hybri-Max™	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
Murines Interleukin-6 (IL-6)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
Natrium-Pyruvat (Na-Pyruvat)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (neAS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phenolrot	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Zellkulturplatten (96-Well flat bottom, 24-Well, 12-Well, 6-Well)	Greiner Bio-one, Kremsmünster Österreich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich

<b>Tab. 1b: Dot-Blot und Western Blot</b>	
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich
Chemilumineszenzsubstratlösung Cyangen Westar ηC2.0	LabConsulting, Vösendorf, Österreich
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich
Ethanol 96%	VWR International, Wien, Österreich
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich
Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) 0,45 µm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotilab-Blottingpapier	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 5 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Scharlau, Barcelona, Spanien
Tween 20 (Polysorb)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xpress Blotting Puffer	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Tab. 1c: Durchflusszytometrie</b>	
BD Cytofix/Cytoperm™-Kit fixation/permeabilisation solution und BD Perm/Wash™ Buffer (10x stock; 1:10 in ddH <sub>2</sub> O)	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, CA, USA
CASYton	OLS-OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Falcon®-Tubes (4 ml)	VWR International, Wien, Österreich
Mikrotiterplatten mit Rundboden	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

<b>Tab. 1d: ELISA</b>	
15-mer-Peptide	EMC Microcollections, Tübingen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
Natrium-Acetat	Merck, VWR International, Wien, Österreich
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck, VWR International, Wien, Österreich
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, VWR International, Wien, Österreich
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates	Thermo-Fisher Scientific, Wien, Österreich
Phosphate buffered saline (PBS) (1 x und 10 x)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Porcines IgM	Fitzgerald; THP Medical Products, Wien, Österreich
Porcines IgG	Fitzgerald; THP Medical Products, Wien, Österreich
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-Horse radish peroxidase (SA-HRP, Roche)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
Tween 20 (Polysorb)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure 5 %	Merck, Darmstadt, Deutschland

<b>Tab. 1e: Immunpräzipitation</b>	
6x HIS-tagged plgE	eigener Bestand
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
IgG1 Isotyp Kontrollantikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphate buffered saline 1 x (PBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Protein G Surebeads™ (Magnetic beads)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA USA
Surebeads™ Magnetic Rack	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Scharlau, VWR International, Wien, Österreich
Tween 20 (Polysorb)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Tab. 1f: Elektrophorese</b>	
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bromphenolblau	Merck, VWR International, Wien, Österreich
Laufpuffer (10x Tris/Tricine/SDS Running Buffer)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Proteinmarker PeqIV	VWR International, Wien, Österreich
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	GE Health Care, Chicago, IL, USA
Trenngelpuffer (Resolving Gel Buffer)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

<b>Tab. 2: kommerzielle Antikörper und Streptavidin</b>	
<b>Tab. 2a: Dot-Blot</b>	
Goat- $\alpha$ -mouse-IgG(H+L)-alkalische Phosphatase (AP) 1: 30000 in TBS-Blocking-Puffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
<b>Tab 2b: Durchflusszytometrie</b>	
$\alpha$ -FLAG™ (mouse-IgG1)	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
$\alpha$ -mouse-IgG(H&L chain)-PE 1:150 in BD Perm/Wash™ Buffer	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
$\alpha$ -mouse-IgG1-PE 1:200 in BD Perm/Wash™ Buffer	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
$\alpha$ -mouse-IgG2a-A647 1:200 in BD Perm/Wash™ Buffer	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
$\alpha$ -mouse-IgG2b-BV421 1:300 in BD Perm/Wash™ Buffer	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
$\alpha$ -mouse-IgM-PE 1:50 in BD Perm/Wash™ Buffer	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Streptavidin-Alexa647	Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Wien, Österreich
Streptavidin-PE	Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Wien, Österreich
<b>Tab. 2c: ELISA</b>	
anti-mouse-IgG-biotin	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
anti-porcine IgM-HRP	Bethyl, Sanova, Wien, Österreich
anti-porcine IgG-HRP	Bethyl, Sanova, Wien, Österreich
<b>Tab. 2d: Immunpräzipitation</b>	
anti 6xHIS-Tag-HRP	Abcam, Cambridge, UK

<b>Tab. 3: Geräte und Auswerte-Software</b>	
<b>Blotter</b> Hofer SemiPhor™	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Durchflusszytometer</b> BD FACSCanto™ II mit FACS-Diva Software	Becton Dickinson, Franklin Lakes, CA, USA
<b>Elektrophoreseeinheit</b> Hofer SE 250 Vertical Protein Electrophoresis Unit	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>ELISA-Reader</b> Sunrise absorbance microplate reader mit Magellan® Auswerte-Software	Tecan, Gröding, Österreich
<b>Gelgießstand für vier Minigele</b> Hofer SE 250	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Inkubator</b> HeraCell™ 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Kamerasystem</b> G-Box Chemi XRQ	LabConsulting, Vösendorf, Österreich
<b>Mikrotiterplatten Schüttler</b> Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG Schwabach, Deutschland
<b>Rotationsmischer</b> Tube Rotator	VWR International, Wien, Österreich
<b>Spannungsquelle</b> PowerPac™ Universal	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
<b>Zellzählgerät</b> CASY Cell Counter & Analyzer	OLS-OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
<b>Zentrifuge</b> Heraeus™ Multifuge™ 1S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

<b>Tab. 4: Medien, Puffer und Lösungen</b>	
<b>Tab. 4a: Hybridomzellkultur</b>	
Zellkulturmedium	RPMI 1640 + Penicillin/Streptomycin 20 % (v/v) FCS 1 % (w/v) Glucose 1 % (w/v) neAS 1 % Natrium-Pyruvat $\beta$ -Mercaptoethanol 20 $\mu$ mol murines IL-6 100 U/ml 1 % (v/v) HAT/HT Media-Supplement, rekonstituiert aus Lyophilisat
Einfriermedium	50 % (v/v) FCS 40 % (v/v) RPMI 10 % (v/v) DMSO
<b>Tab. 4b: Dot-Blot</b>	
<b>5x TBS (Tris buffered saline)</b>	Tris 1 mol/l NaCl 2,5 mol/l in ddH <sub>2</sub> O pH 7,5 mit HCl (1 mol/l)
<b>1x TBS (Tris buffered saline)</b>	5x TBS 1:5 in ddH <sub>2</sub> O
<b>TBS-Blocking-Puffer</b>	100 ml 5x TBS 250 ml NaCl 1 M 5 ml Tween 20 ddH <sub>2</sub> O ad 500 ml
<b>TTBS (Tris buffered saline + Tween 20)</b>	5x TBS 1:5 in ddH <sub>2</sub> O 0,1 % (v/v) Tween 20
<b>AP-Puffer (Puffer für BCIP/NBT)</b>	NaCl 100 mmol/l MgCl <sub>2</sub> 5 mmol/l 100 mmol/l Tris in ddH <sub>2</sub> O pH 9,5 bei Raumtemperatur mit HCl 5 mol/l
<b>BCIP-Stock</b>	0.5 g BICP 10 ml DMF (Dimethylformamid)
<b>NBT-Stock</b>	0.5 g NBT 10 ml 70 % (v/v) DMF in ddH <sub>2</sub> O
<b>Substrat für AP-Reaktion</b>	15 ml AP-Puffer 100 $\mu$ l NBT-Stock 50 $\mu$ l BCIP-Stock

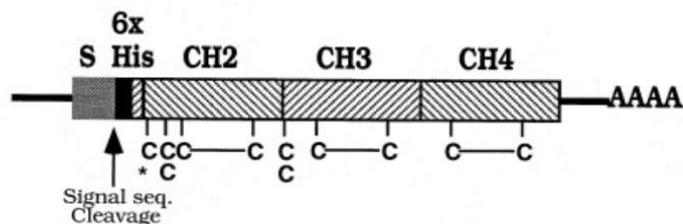
<b>Tab. 4c: ELISA</b>	
<b>Assay-Puffer</b>	PBS 1x 0,1 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween20
<b>Blocking-Puffer</b>	PBS 1x 0,1 % (w/v) BSA
<b>Coating Puffer</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 15 mmol/l NaHCO <sub>3</sub> 30 mmol/l
<b>ELISA-Waschpuffer</b>	500 ml PBS 10x 1 ml Tween 20 4500 ml ddH <sub>2</sub> O
<b>Substratlösung</b>	15 ml Substratpuffer für TMB 250 µl TMB-Stock 50 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Substratpuffer für TMB</b>	0,68 g Natrium-Acetat 500 ml ddH <sub>2</sub> O pH 5 (mit Zitronensäure 5 %)
<b>TMB-Stock (0,4 %)</b> (lichtgeschützt gelagert)	0,2 g TMB 50 ml DMSO
<b>Tab. 4d: Immunpräzipitation</b>	
<b>PBS-T</b> (Phosphate buffered saline + Tween 20)	PBS 1x 0,1 % (v/v) Tween 20
<b>RIPA-Puffer</b>	1 NaCl 0,15 mol/ EDTA 1 mmol/l Tris 10 mmol/l ddH <sub>2</sub> O ad 100 ml pH 7,4 bei Raumtemperatur mit HCl 1 mol/l
<b>Elektrophorese</b>	
<b>4x Sammelgelpuffer</b>	0,5 mol/l Tris ddH <sub>2</sub> O pH 6,8 mit HCl 5 mol/l bei Raumtemperatur
<b>Ladepuffer</b>	2,5 ml Sammelgelpuffer 4x 4 ml SDS 10 % (w/v) 2 ml Glycerin 1 ml Bromphenolblau 0,2 % (w/v) ddH <sub>2</sub> O ad 10 ml

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Herstellung des Immunogens und Immunisierung

Aufgrund der niedrigen IgE-Serumkonzentration im Blut von Schweinen ist eine direkte Isolierung von IgE aus dem Serum zur Herstellung des Immunogens problematisch (Rupa et al. 2008).

Für dieses Projekt wurde ein rekombinantes porcines IgE-Konstrukt als Immunogen verwendet. Dafür wurde ein Plasmidvektor mit dem rekombinanten Konstrukt der konstanten Region der schweren Kette (CH2-CH3-CH4) hergestellt. Die Sequenz der kodierenden Region wurde von Vernersson et al. 1997 übernommen (Abb. 6). Das rekombinante Konstrukt war mit einem sechsfachen Poly-Histidin-Tag versehen (HIS-Tag; 6xHIS-tagged pIgE) und wurde daraufhin für eine transiente Transfektion von HEK-EBNA-Zellen verwendet. Aus dem Zellkulturüberstand dieser Transfektanten wurde das Immunogen gewonnen.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der codierenden Region des rekombinanten Konstrukts (Vernersson et al. 1997).** Der Pfeil signalisiert die Stelle für die Entfernung der Signalsequenz. Cysteinreste, die Disulfidbrückenbindungen innerhalb der Kette bzw. mit anderen Ketten eingehen, werden als C dargestellt.

Als Spenderorganismen für die murinen B-Zellen zur Gewinnung der Hybridome dienten Wildtyp-BALB/c-Mäuse. Für die Gewinnung der Hybridomzellen erfolgte eine Fusion der aus der Milz gewonnenen murinen B-Zellen mit SP2/0-Zellen.

Die Immunisierung, B-Zell-Gewinnung und Fusion erfolgte bereits im Jahr 2009. Für die vorliegende Arbeit wurden die bereits fusionierten Hybridomzellen zur Verfügung gestellt. Der praktische Teil dieser Diplomarbeit begann mit deren Kultur, sowie der Testung der einzelnen Klone auf Immunglobulin-Produktion und umfasste darüber hinaus diverse Charakterisierungsschritte (Abb. 5).

### **2.2.2. Hybridomzellkultur**

Nach vorsichtigem Auftauen der kryokonservierten Hybridomzellen bis auf 0 °C, anschließendem Überführen in vorgewärmtes Kulturmedium (ohne Zusätze), Pelletieren und Zählen, erfolgte die Aussaat in 96-Well-Flachboden-Zellkulturplatten zu je 5000 Zellen pro Well (Vertiefung) in 200 µl Kulturmedium. Innerhalb der ersten Tage nach der Aussaat wurden die einzelnen Wells auf Klonalität überprüft. Für die Gewinnung der Zellkulturüberstände und die Testung einzelner Klone wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über 2-5 Wochen kultiviert, da die Vermehrungsrate der einzelnen Klone sehr unterschiedlich war. Bei den Subklonierungen war ein rascheres Wachstum zu beobachten.

Initial wurde bei jeder Aussaat ein HAT-haltiges Medium verwendet, welches nach erfolgter HAT-Selektion der Hybridomzellen durch ein HT-Supplement getauscht wurde. Die vollständige Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist in Tab. 4a angegeben.

Die Auswahl der Klone, deren Zellkulturüberstände auf das Vorhandensein von Immunglobulinen getestet wurden, erfolgte gemäß der Wachstumsrate des Klons und Farbumschlag des Indikators (Phenolrot) im Kulturmedium.

Bei Bedarf wurden einzelne Wells subkloniert, um Monoklonalität sicher zu stellen oder um zu verhindern, dass immunglobulinproduzierende Zellen von unproduktiven Zellen überwachsen wurden. Bei einer Subklonierung wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 0,5 Zellen pro Einheit (= pro Well) hergestellt. Für jede Subklonierung wurden 3-4 96-Well Mikrotiterplatten verwendet. Die restlichen Zellen wurden kryokonserviert. Die Subklone wurden kultiviert und dem nachfolgend beschriebenen zweistufigen Verfahren zufolge einzeln getestet.

Geerntete Zellkulturüberstände wurden bei 4 °C gelagert.

### 2.2.3. Screening der Hybridome

Die Klone, die tatsächlich einen mAb gegen porcines IgE herstellten, wurden mithilfe eines zweistufigen Verfahrens identifiziert.

Zuerst wurde in einem Dot-Blot ermittelt, ob Immunglobuline im Zellkulturüberstand eines Klons nachweisbar waren. Dafür wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Maus-Antikörper zur Detektion eingesetzt (siehe **2.2.3.1. Dot-Blot**).

Klone, die im Dot-Blot ein positives Ergebnis zeigten und somit Antikörper produzierten, wurden im nächsten Schritt in der Durchflusszytometrie auf HEK 293T-Zellen getestet, welche porcines IgE intrazellulär exprimierten (FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T). Somit konnte ermittelt werden, ob der mAb, den ein bestimmter Klon produzierte, tatsächlich in der Lage war, ein Epitop auf dem Immunogen zu erkennen.

Positive Klone wurden hochgesetzt und weiterkultiviert, beziehungsweise in Gefriermedium überführt und in Aliquots zu 1 ml bei -150 °C kryokonserviert.

#### 2.2.3.1. Dot-Blot

Für den Dot-Blot wurde eine PVDF-Membran in Ethanol vorkonstituiert, anschließend zehn Minuten in ddH<sub>2</sub>O equilibriert und blasenfrei auf angefeuchtetes Filterpapier gelegt.

Dann erfolgte das Auftragen der Zellkulturüberstände auf die Membran (je 20 µl).

Anschließend folgte ein 30-minütiger Blocking-Schritt, für den die Membran in TBS-basierten Blocking-Puffer überführt wurde. Wie bei anderen Immunoblot-Verfahren, dient das Blocken dazu, Bindungsstellen abzusättigen und somit unerwünschte Hintergrundsignale zu reduzieren, beziehungsweise zu verhindern, dass der Detektionsantikörper unspezifisch bindet (Mahmood und Yang 2012).

Nach dem Blocken folgte der Detektionsschritt durch den mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper, der die leichte und schwere Kette muriner Immunglobuline erkennt (Goat- $\alpha$ -mouse-IgG(H+L)-AP) und somit direkt nachwies, ob ein Zellkulturüberstand Immunglobuline enthielt oder nicht. Nach 90-minütiger Inkubation und drei Waschschr

mit TTBS erfolgte die Substratreaktion mit BCIP und NBT. Dabei wurde das Substrat durch die alkalische Phosphatase umgesetzt. Die Stärke der Farbreaktion auf der Membran korreliert mit dem Ausmaß der Antikörperproduktion des jeweiligen Klons.

Anhand der Präsenz und Stärke der Farbreaktion wurden die Klone ausgewählt, die im nächsten Nachweisschritt weiter analysiert wurden.

### **2.2.3.2. Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen**

Für die nächste Stufe des Screening-Verfahrens – um die Klone zu identifizieren, die Anti-pIgE-Antikörper erzeugten – wurden zunächst HEK 293T-Zellen transient mit dem Immunogen transfiziert.

Für die Erstellung des Plasmids wurde dieselbe Sequenz (pIgE, CH2-CH3-CH4) verwendet, die bereits zur Herstellung des Immunogens genutzt wurde (Vernersson et al. 1997). Für die Transfektion der HEK 293T-Zellen wurde jedoch der 6xHIS-Tag durch einen FLAG<sup>®</sup>-Tag ersetzt. Dabei handelt es sich um ein Polypeptid-Tag mit der Sequenz DYKDDDDK und einer Größe von 1012 Da (Einhauer und Jungbauer 2001). Durch Detektion des FLAG<sup>®</sup>-Tag mittels eines mAb konnte bei durchflusszytometrischer Analyse die erfolgreiche Transfektion der HEK-Zellen bestätigt werden. Es wurde eine Transfektionsrate von etwa 30 % ermittelt.

Nach erfolgter Transfektion wurden die FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen in Aliquots zu je  $2 \times 10^7$  ml in Einfrierröhrchen (Kryo-Tubes) mit Einfriermedium überführt und bei -150 °C gelagert.

Für den praktischen Teil dieser Diplomarbeit wurden die Transfektanten in dieser Form zur Verfügung gestellt. Die Transfektion selbst war in der praktischen Arbeit nicht enthalten.

### 2.2.3.3. Screening der Klone auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen

Für die Analyse der im Dot-Blot positiv getesteten Klone an den FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen wurden Transfektanten vorsichtig bis auf 0 °C aufgetaut (ein kleiner Eisklumpen soll noch sichtbar sein) und anschließend in je 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes PBS pro Kryotube überführt. Danach wurden die Zellen bei 1300 rpm und 4 °C pelletiert, in 3 ml PBS resuspendiert und mithilfe eines Zellzählgeräts (Casy) gezählt. Die erwünschte Zellzahl für jede Probe lag bei  $3,5 \times 10^5$  Zellen, konnte aber bei Bedarf auf bis zu  $1 \times 10^5$  Zellen reduziert werden. Danach wurde wieder pelletiert und – gemäß der ermittelten Zellzahl und der Anzahl der Proben – in PBS resuspendiert.

Die Markierung der Proben für die Durchflusszytometrie erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten mit Rundboden. Pro Well wurden 25 µl der Zellsuspension verteilt. Das Protokoll für die Markierung umfasste drei Schritte.

#### a) Fixierung und Permeabilisierung

Da die FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen das Epitop intrazellulär exprimieren, mussten sie fixiert und permeabilisiert werden, um das pIgE-Konstrukt und den FLAG<sup>®</sup>-Tag den Antikörpern zugänglich zu machen.

Dafür wurde ein Fixierungs- und Permeabilisierungskit (BD Cytotfix/Cytoperm™) verwendet. Nach Zugabe der Fixationslösung (100 µl/Well) wurde 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit Waschpuffer (BD Perm/Wash™ Buffer). Für jeden Waschschrte wurden 200 µl Waschpuffer pro Well verwendet, es wurde bei 1500 rpm für vier Minuten zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zellen resuspendiert.

Für alle weiteren Waschschrte in diesem Protokoll wurde derselbe Waschpuffer verwendet, um die Zellen im fixierten und permeabilisierten Zustand zu erhalten.

#### b) Primärantikörper

Die Zellkulturüberstände der einzelnen Klone der Hybridomzellkultur – beziehungsweise die potentiell darin enthaltenen mAb gegen pIgE – entsprachen in diesem Protokoll dem Primärantikörper. Es wurden 20 µl Probe (Zellkulturüberstand) pro Well zu den Zellen hinzugefügt. Danach folgten ein Inkubationsschrte (20 Minuten bei 4 °C) und erneut zwei Waschschrte, wie oben beschrieben.

Als Kontrolle auf positive Transfektion wurde der FLAG<sup>®</sup>-Tag bei jeder Messung ebenfalls detektiert. Dafür wurde ein spezifischer Anti-FLAG<sup>®</sup>-Antikörper als Primärantikörper verwendet.

### c) Sekundärantikörper

Im nächsten Schritt wurden die fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper hinzugefügt. Diese wurden in der zuvor ermittelten Arbeitsverdünnung verwendet (Tab. 2b). Die Verdünnung erfolgte in Waschpuffer und es wurden 10 µl der Verdünnung pro Well hinzugefügt.

Für das Screening wurde in erster Linie ein Phycoerythrin (PE)-konjugierter Antikörper verwendet, der die leichte und schwere Kette muriner IgG-Moleküle erkennt (Anti-IgG(H&L chain)-PE). Dieser Sekundärantikörper war auch für die Detektion des Anti-FLAG<sup>®</sup>-Antikörpers einsetzbar.

Wurde ein positiver Klon aufgefunden, wurde der Zellkulturüberstand erneut auf den transfizierten HEK-Zellen analysiert. Als Sekundärantikörper wurden jedoch mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelte, isotypenspezifische Antikörper verwendet (Tab. 2b), somit eine Isotypenbestimmung durchgeführt und der mAb einer Antikörperklasse (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM) zugeordnet.

Nach Hinzufügen der jeweiligen Sekundärantikörper folgte ein weiterer Inkubationsschritt (20 Minuten bei 4 °C), und zwei Waschschriffe, wie oben beschrieben.

Danach wurden die Zellen in 250 µl Waschpuffer resuspendiert, in Rundboden-Röhrchen (Falcon<sup>®</sup>-Tubes) überführt, auf Eis und vor Licht geschützt auf die Messung vorbereitet.

Die Erhebung der Daten erfolgte an einem Durchflusszytometer des Modells BD FACSCanto<sup>™</sup> II. Für die Erhebung der Daten wurde die FACSDiva<sup>™</sup>-Software verwendet. Die weitere Darstellung der Daten erfolgte mittels FlowJo<sup>™</sup>-Software (FlowJo LLC, USA).

#### **2.2.4. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper**

Die identifizierten anti-pIgE-mAb wurden in einem Epitop-Mapping mithilfe von jeweils mit fünf Aminosäuren überlappenden 15-mer-Peptiden auf das Bindungsmotiv getestet. Zuerst wurde mithilfe dieser Peptide die Fähigkeit der mAb, lineare Epitope zu erkennen, im ELISA evaluiert. Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde ein Blocking-Assay in der Durchflusszytometrie durchgeführt.

##### **2.2.4.1. 15-mer-Peptide**

Die Sequenz der 32 überlappenden 15-mer-Peptide entspricht der des Immunogens (Vernersson et al. 1997). Die Peptide wurden in lyophilisierter Form von EMC microcollections (Tübingen, Deutschland) bezogen, zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, um eine Konzentration von 5 mg/ml jedes Peptids zu erhalten (Die Menge jedes Peptids war auf dem jeweiligen Gefäß vermerkt). Diese Peptid-Stocks wurden bei -80 °C gelagert. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide sind in Tab. 5 aufgelistet. Die Peptide wurden von 1-32 durchnummeriert und die Nummerierung für alle nachfolgenden Anwendungen übernommen.

<b>Tab. 5: Aminosäuresequenzen der überlappenden 15-mer-Peptide</b>	
<b>Nummer</b>	<b>Sequenz</b>
1	CTKNFTDPSLRFFYS
2	RFFYSSCDPHGDAQA
3	GDAQATIHLRCYISG
4	CYISGYTPGKMKVTW
5	MKVTWLVDGQEDRNL
6	EDRNLFSTAPDQLE
7	PDQLEGKLASTYSEV
8	TYSEVNITQGQWASQ
9	QWASQITYTCQVSYY
10	QVSYYGFIYEKHALR
11	KHALRCTAESEPRGV
12	EPRGVSAYLSPTPL
13	PPTPLDLYVHKSPKL
14	KSPKLTCLVVDLASS
15	DLASSENVNLLWSRE
16	LWSRENKGGVILPPP
17	ILPPPGLPPVIKQFN
18	KPQFNGTFSATSTLP
19	TSTLPVNVSDWIEGE
20	WIEGETYYCNVTHPD
21	VTHPDLPKILRSIS
22	LRSISKGGKRVTPPE
23	RVTPEVYVLWSPDEL
24	SPDELKKGRLTLTCL
25	TLTCLIQNFFPADIS
26	PADISVLWLRNDAPV
27	NDAPVQADRHSTTRP
28	STTRPHKASDSLPSF
29	SLPSFFVYSRLVVSQ
30	LVVSQSDWEQNKFAC
31	NKFACEVIHEALPGS
32	ALPGSRTLQKEVSKNPGK

#### 2.2.4.2. Lineares Epitop-Mapping im ELISA

Die Erkennung linearer Epitope durch die entsprechenden mAb wurde mithilfe der 15-mer-Peptide im ELISA evaluiert.

Dafür wurden ELISA-Platten mit je 1 µg Peptid pro Well/50 µl ddH<sub>2</sub>O beschichtet (Coating). Es wurden Doppelproben für jedes Peptid angesetzt. Als Positivkontrolle diente das ursprüngliche Immunogen (6xHIS-tagged plgE), als Negativkontrolle ddH<sub>2</sub>O. Für das Coating wurde die Peptidlösung in den Wells bei 37 °C eingetrocknet. Nach erfolgtem Coating folgten ein Blocking-Schritt mit 250 µl Blocking-Puffer pro Well und zwei Waschschriffe mit ELISA-Waschpuffer, danach wurden die Proben (Zellkulturüberstände) aufgetragen.

Die in den zuvor positiv getesteten Zellkulturüberständen vorhandenen mAb fungierten als Primärantikörper. Diese erkannten entsprechend ihrer Spezifität unterschiedliche Abschnitte der Aminosäuresequenz des Immunogens – und damit unterschiedliche 15-mer-Peptide – in unterschiedlichem Ausmaß.

Nach Auftragen der Proben (Zellkulturüberstände der Klone 16B1, 23C9, 38D3 und 18A5; 100 µl/Well) erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur, danach vier Waschschriffe.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (α-ms-IgG-biot) in der Verdünnung 1:50.000 verwendet. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und vier weiteren Waschschriffen erfolgte die Detektion des Biotins durch ein Streptavidin-HRP-Konjugat (100 µl pro Well, 1:5.000 in Assay Puffer). Nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten vier weitere Waschschriffe.

Für die HRP-Substratreaktion mit Tetramethylbenzidin (TMB) wurde die Substratlösung vorbereitet (siehe Tab. 4) und 200 µl pro Well hinzugefügt. Danach folgte eine lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur für etwa 20 Minuten. Daraufhin wurde die Farbreaktion mit 25 µl Schwefelsäure (1 mol/l) pro Well abgestoppt.

Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm mithilfe eines ELISA-Readers (Sunrise absorbance microplate reader). Die optische Dichte in den einzelnen Wells war proportional zur Anzahl der mAb, die die Sequenz des jeweiligen Peptids als Epitop erkannten. Somit konnten für jeden mAb diejenigen Peptide ermittelt werden, deren Sequenz die größte Übereinstimmung mit dem Epitop hatten.

#### 2.2.4.3. Blocking Assay

Dieser basiert auf dem Prinzip, dass die Bindungsstelle des mAb durch das Peptid, das das Epitop repräsentiert, maskiert wird und der mAb somit das von den FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen exprimierte Immunogen nicht mehr erkennt.

Dafür wurde zuerst die ideale Konzentration der Zellkulturüberstände einzelner (bereits positiv getesteter) Klone zur Evaluierung der Epitoperkennung ermittelt. Dies erfolgte durch Titration positiver Proben und Ermittlung der Minimalkonzentration, bei der in der Durchflusszytometrie noch ein deutlich positives Ergebnis zu sehen war.

Die entsprechend verdünnten mAb Proben wurden für den Blocking Assay, gemäß dem zuvor erfolgten Epitop-Mapping, mit im ELISA ermittelten 15-mer-Peptiden vorinkubiert. Dafür wurden jeweils ansteigende Peptidkonzentrationen verwendet (0,04 mg/ml, 0,2 mg/ml und 1 mg/ml). Die Markierung und Messung der Proben auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen erfolgte nach Vorinkubation mit den Peptiden für eine Stunde bei Raumtemperatur nach demselben Protokoll wie unter **2.2.3.3. Screening der Klone auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen** beschrieben.

Als Sekundärantikörper wurde für den Blocking Assay ein PE-konjugierter anti-Maus-IgG1-Antikörper ( $\alpha$ -ms-IgG1-PE) verwendet.

#### 2.2.4.4. Kompetitions-Assay

Um zu evaluieren, wie die vorliegenden mAb am Epitop interagieren, beziehungsweise ob sie in der Lage sind, sich gegenseitig zu blockieren, wurde ein Kompetitions-Assay in der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Dafür mussten die mAb gereinigt, konzentriert und biotinyliert werden. Diese Arbeiten, sowie die Ermittlung der idealen Verdünnung der biotinylierten Antikörper durch Titration, war nicht im praktischen Umfang dieser Arbeit enthalten und die so vorbereiteten Antikörper wurden für diese Anwendung zu Verfügung gestellt (siehe auch: **3.2.3. Biotinylierung**).

Für den Kompetitions-Assay wurden zunächst die nicht-biotinylierten mAb (Klone 16B1, 23C9 und 38D3) in vier Konzentrationen vorbereitet (50 ng, 500 ng, 5.000 ng, 50.000 ng).

Alle drei mAb wurden untersucht, ob sie sich selbst, beziehungsweise die mAb der anderen beiden Klone, an der Bindung an FLAG<sup>®</sup>-pIgE blockieren konnten.

Damit biotinylierte- und nicht-biotinylierte Antikörper am intrazellulär von den FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen exprimierte Epitop konkurrieren konnten, wurden beide mAb (biotinyliert und nicht-biotinyliert) als Primärantikörper zeitgleich hinzugefügt.

Die Detektion basierte auf der Erkennung des intrazellulär am Epitop gebundenen biotinylierten mAb durch Streptavidin-PE.

Abgesehen davon erfolgte die Markierung der Proben für die Durchflusszytometrie nach demselben Protokoll und mithilfe derselben Reagenzien und Geräte, wie unter **2.2.3.3. Screening der Klone auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen** beschrieben.

#### **2.2.4.5. Test auf Kreuzreaktivität (ELISA)**

Der Test auf Kreuzreaktivität mit porcinem IgM und IgG wurde im ELISA durchgeführt. Dafür erfolgte das Coating mit Verdünnungsreihen (1:2,5) von porcinem IgM und IgG, beginnend mit 10 µg/ml, jeweils 100 µl/Well in Duplikaten bei 4° C über Nacht. Verglichen wurde die Bindung mit 6x-HIS-tagged-pIgE, das in denselben Verdünnungsstufen zum Coaten verwendet wurde.

Nach dem Coating folgten ein Blocking-Schritt und vier Waschschrte. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände der Klone, sowie jeweils spezifisches anti-pIgM beziehungsweise anti-pIgG als Referenz hinzugefügt.

Alle weiteren Wasch- und Detektionsschritte wurden, wie bereits unter **2.2.4.2. Lineares Epitop-Mapping** im ELISA beschrieben, durchgeführt.

#### **2.2.4.6. Immunpräzipitation**

Um festzustellen, ob das Immunogen (6x HIS-tagged pIgE) mithilfe der gewonnenen mAb darstellbar ist, wurde es unter deren Verwendung präzipitiert.

Dafür wurden je 100 µl Protein G-Surebeads™ – Magnetic Beads pro Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße (RG) vorgelegt und zweimal mit PBS-T, das auch für alle folgenden Waschschriffe verwendet wurde, gewaschen. Dann erfolgte die Anlagerung der mAb, aus den Zellkulturüberständen der positiv getesteten Klone. Für diesen Schritt wurden je 150 µl konzentrierter Zellkulturüberstand der Klone 16B1, 23C9 und 38D3 hinzugefügt. Parallel wurde eine IgG1-Isotypenkontrolle mitgeführt.

Nach 45-minütiger Inkubation auf dem Rotationsmischer, Entfernen des Überstandes und zwei weiteren Waschschriffen wurde zu allen RG 150 µl des in PBS-T auf 0,5 µg/ml 1:20 verdünnten 6x-HIS-tagged pIgE zugegeben und 45 Minuten lang auf dem Rotationsmischer inkubiert. Nach zwei Waschschriffen folgte die Elution des präzipitierten Antigens. Dafür wurden die Beads für fünf Minuten bei 95 °C mit SDS-Ladepuffer inkubiert.

Danach wurde der Überstand abgenommen und in frische RG transferiert.

Die Darstellung und Analyse des präzipitierten Antigens erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.

### 2.2.4.7. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zunächst wurde der Gelgießstand für Minigele vorbereitet und das Trenn- und Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 6 aufgeführt.

<b>Tab. 6: SDS-PAGE: Gelzusammensetzung</b>		
	<b>Trenngel (10%)</b>	<b>Sammelgel (4%)</b>
	Menge in ml für vier Gele	
40% AA/BA (29:1)	6,25	0,5
4x Trenngelpuffer bzw. 4x Sammelgelpuffer	6,25	1,25
10% SDS	0,25	0,05
ddH <sub>2</sub> O	12,11	3,15
Ammoniumpersulfat	0,13	0,05
TEMED	0,01	0,005
Gesamtvolumen	25	5

Die fertigen Gele wurden in einer Elektrophoreseeinheit (SE 250 Vertical Protein Electrophoresis Unit) platziert und 10 µl der zuvor gewonnenen Proben wurden in die entsprechenden Taschen des Gels pipettiert. In die erste Tasche des Gels wurden 3 µl Proteinmarker (PeqIV) appliziert, um das Präzipitat nach der Auftrennung anhand seiner Größe einordnen zu können.

Das Auftrennen der Proben im elektrischen Feld erfolgte bei 20 mA pro Gel über einen Zeitraum von 45 Minuten.

Anschließend wurden die Gele zur Vorbereitung auf den Blot in Xpress Blotting Puffer 10 Minuten equilibriert.

#### **2.2.4.8. Western Blot**

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen und das Präzipitat zu analysieren, wurden die Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen (Western Blot).

Dafür wurden zuerst PVDF-Membran und Filterpapier auf die Größe des Gels zugeschnitten, die Membran mit Ethanol befeuchtet und 10 Minuten in Blotting Puffer inkubiert. Anschließend wurde auch das Filterpapier in diesem Puffer getränkt und die Transfer-Stacks vorbereitet. Auf Seite der Anode wurden zwei Filterpapiere in den Blotter gelegt, darauf folgte die Membran, das Gel, und zwei weitere Filterpapiere. Die Übertragung vom Gel auf die Membran (das Blotting) erfolgte bei 35 V über einen Zeitraum von 18 Minuten. Danach wurde ein Blocking-Schritt mit TBS-Blocking-Puffer durchgeführt und im Anschluss mit einem gegen den 6x-HIS-Tag (1.500 in Blocking puffer) gerichteten, mit HRP markiertem Antikörper und nachfolgender Chemilumineszenzreaktion das präzipitierte 6x-HIS-pIgE mittels Kamerasystem (G-Box) sichtbar gemacht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Screening der Hybridomzellen

##### 3.1.1. Dot-Blot

Sämtliche Klone, deren Zellkulturüberstände im Dot-Blot eine deutlichere Farbreaktion zeigten als die Negativkontrolle, wurden für die Analyse in der Durchflusszytometrie übernommen. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit etwa 2880 individuelle Klone auf deren anti-pIgE-Produktion getestet. Dazu kamen die Subklone einiger „Mother-Wells“, die ebenfalls einzeln getestet wurden (nochmals ca. 300 wells).

Von Klonen, welche im Dot-Blot ein negatives oder ein nur in geringem Maße positives Signal zeigten, wurde ein neuer Zellkulturüberstand gewonnen und noch einmal getestet, da davon auszugehen war, dass bei manchen Klonen das volle Ausmaß der Antikörperproduktion erst während der Kultivierung erreicht wurde. Bei wiederholtem negativem Ergebnis wurden die Klone eliminiert und nicht in den weiteren Screening-Vorgang aufgenommen. Abb. 7 steht beispielhaft für den ersten Schritt im Screening sämtlicher Klone auf Immunglobulinproduktion im Dot-Blot.

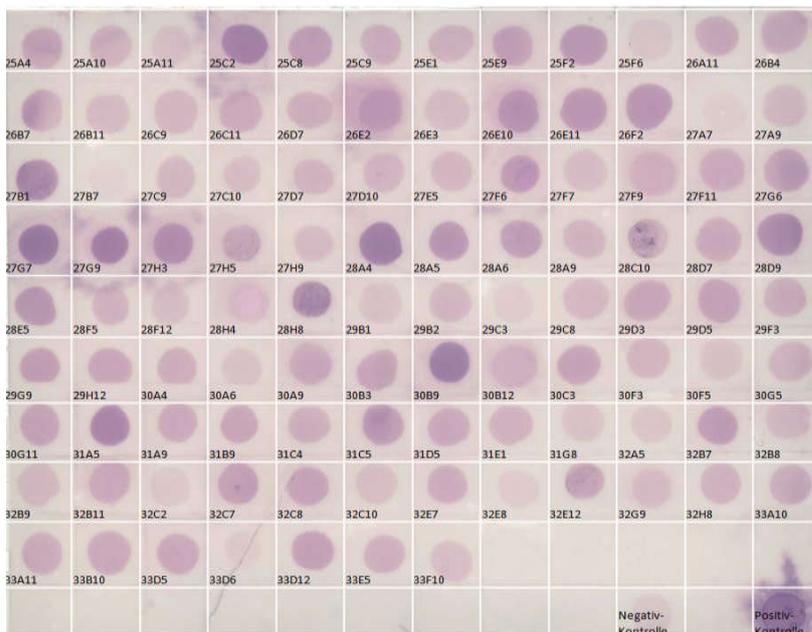


Abb. 7: Dot-Blot; Beispielabbildung.

### 3.1.2. Screening der Klone auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen

Das Screening in der Durchflusszytometrie basiert darauf, dass das intrazellulär exprimierte Epitop des transfizierten Anteils der HEK-Zellen (FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T) von mAb gegen das Immunogen erkannt werden kann. Diese gebundenen mAb können wiederum durch den PE-konjugierten Sekundärantikörper detektiert werden.

Ein positives Signal für PE beim Screen auf FLAG<sup>®</sup>-pIgE-HEK 293T-Zellen deutet also auf die erfolgreiche Erkennung des Epitops hin. Somit enthalten Zellkulturüberstände der Klone, die ein solches Signal zeigen, die gesuchten mAb.

Es konnten vier Klone identifiziert werden, die mAb gegen porcines IgE herstellten. Dabei handelte es sich um die Klone 16B1, 18A5, 23C9 und 38D3. Darüber hinaus wurden einige schwach, beziehungsweise fraglich positive Klone identifiziert, deren Fähigkeit, spezifisches anti-IgE herzustellen noch nicht sicher bestätigt ist. Diese wurden kryokonserviert und bei -150 ° gelagert und können bei Bedarf aufgetaut und weiter untersucht werden.

Zellkulturüberstände sicher positiver Klone wurden titriert und erneut analysiert, um die optimale Verdünnung für weitere Charakterisierungsschritte zu ermitteln. Eine bildliche Darstellung des positiven Ergebnisses der Klone 16B1, 23C9 und 38D3, beziehungsweise der Titration, ist in den Abbildungen 12, 13 und 14 unter **3.2.2. Blocking Assay** enthalten.

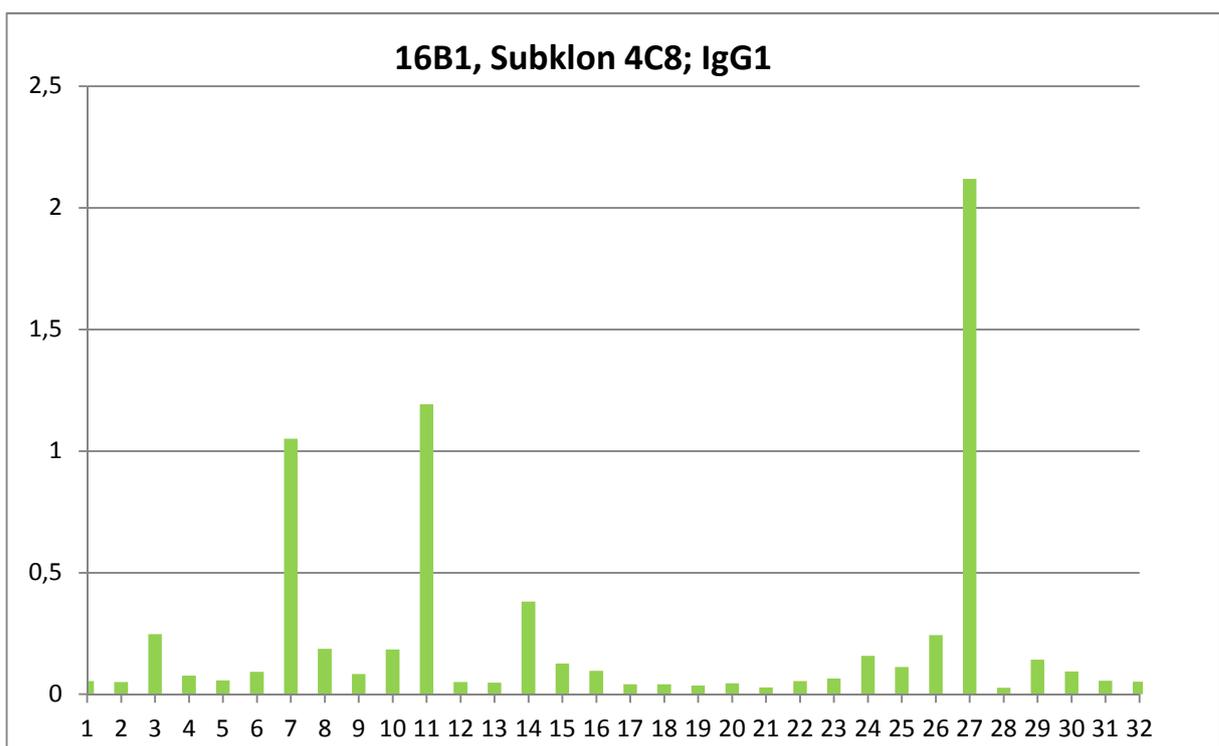
Die Isotypen-Bestimmung ergab, dass es sich bei drei der monoklonalen Antikörper (Klone 16B1, 23C9 und 38D3) um die Immunglobulinklasse IgG1 handelt. Der Klon 18A5 produzierte hingegen IgM.

### 3.2. Charakterisierung

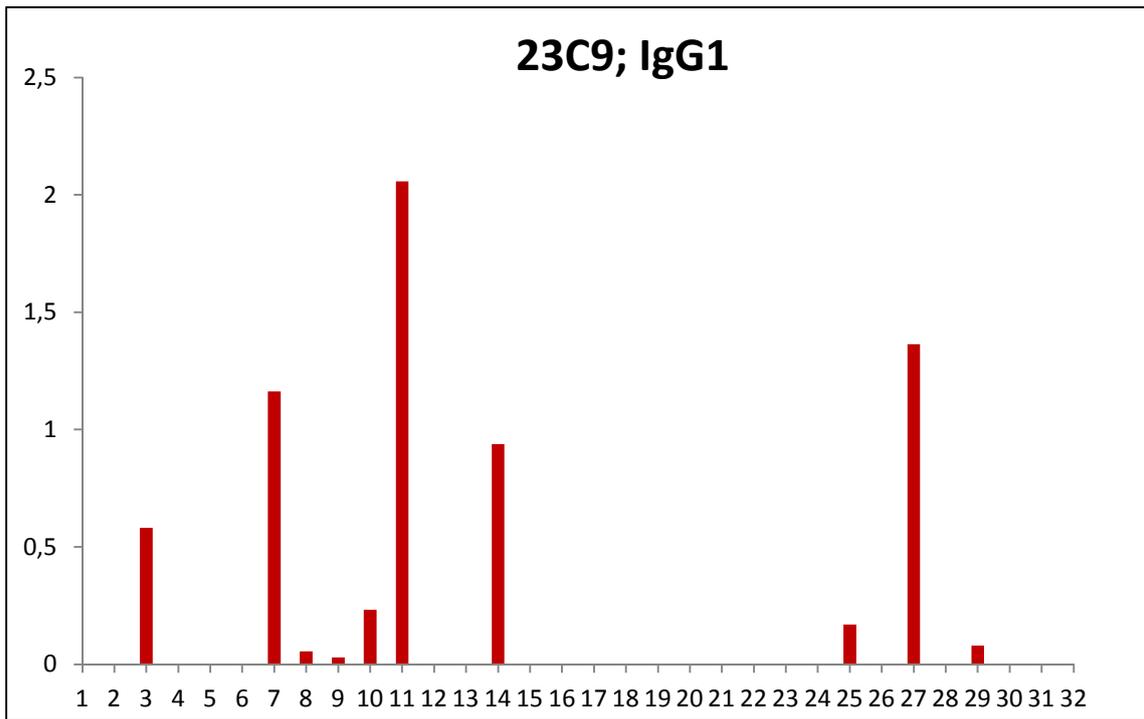
#### 3.2.1. Lineares Epitop-Mapping (ELISA)

Das lineare Epitop-Mapping anhand der 15-mer-Peptide ergab bei den Klonen 16B1 und 23C9 ein sehr ähnliches Muster. Sie erkennen in erster Linie die Peptide 3, 7, 14 und 27 (Abb. 8, Abb. 9). Daraus kann geschlossen werden, dass diese beiden Klone dasselbe lineare Epitop erkennen. Der Klon 38D3 zeigte ein abweichendes Muster und erkennt somit ein anderes Epitop (Abb. 10). Auch für den Klon 18A5, der den Isotyp IgM produziert, wurde ein lineares Epitop-Mapping durchgeführt (Abb. 11). Hier ergab sich ebenfalls ein spezifisches, individuelles Peptiderkennungsmuster.

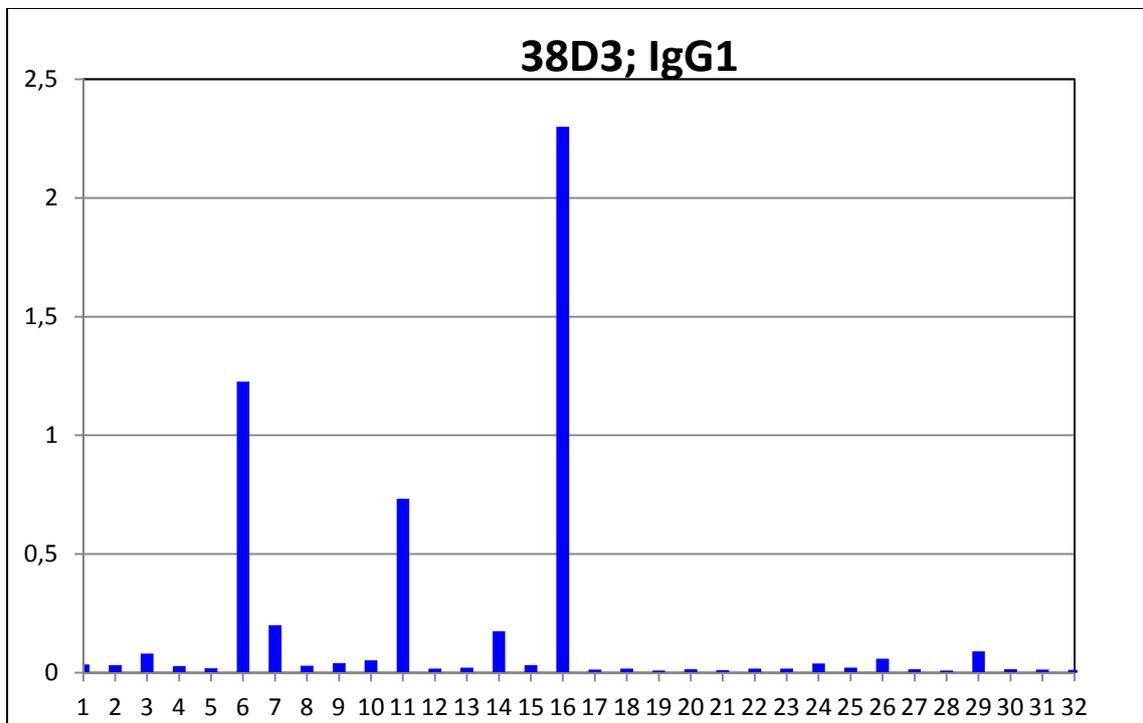
Die nachfolgenden Diagramme zeigen die optische Dichte, die bei der Erkennung einzelner Peptide im ELISA ermittelt wurde. Eine hohe optische Dichte bedeutet, dass die entsprechende Aminosäuresequenz in hohem Maße erkannt wurde.



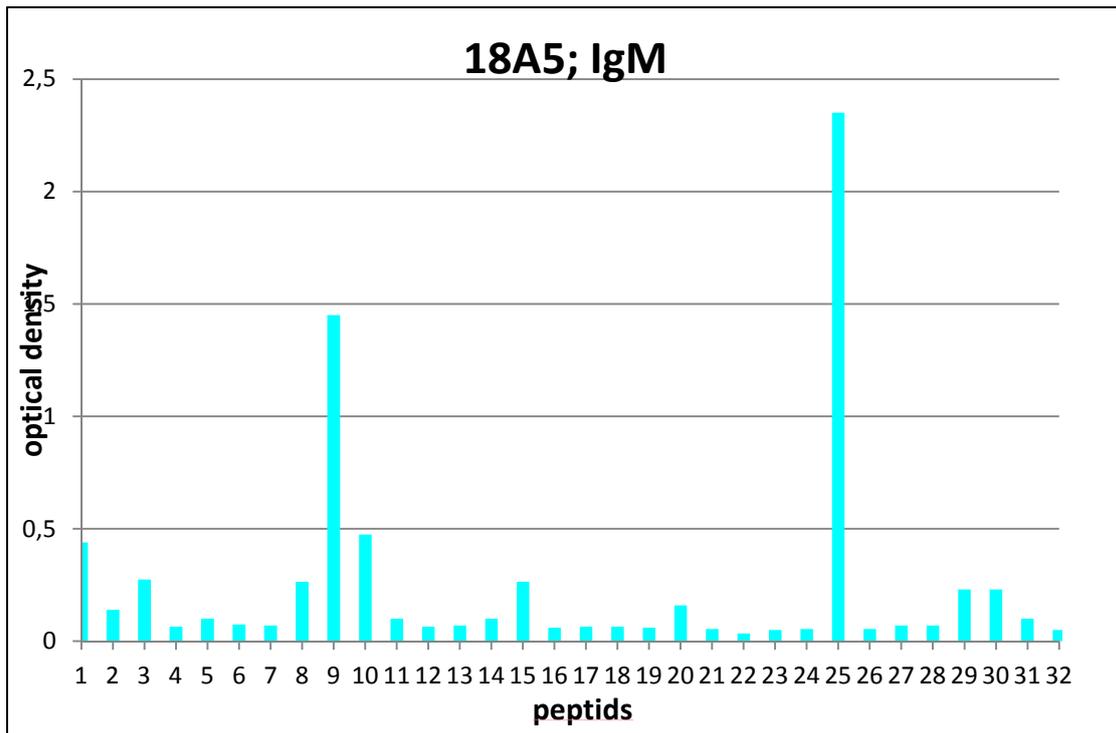
**Abb. 8: Klon 16B1: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings.** Die 32 Peptide sind auf der x-Achse dargestellt, die y-Achse zeigt die optische Dichte (optical density; OD), die im ELISA ermittelt wurde.



**Abb. 9: Klon 23C9: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings.** Die 32 Peptide sind auf der x-Achse dargestellt, die y-Achse zeigt die optische Dichte (optical density, OD), die im ELISA ermittelt wurde.



**Abb. 10: Klon 38D3: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings.** Die 32 Peptide sind auf der x-Achse dargestellt, die y-Achse zeigt die optische Dichte (optical density, OD), die im ELISA ermittelt wurde.



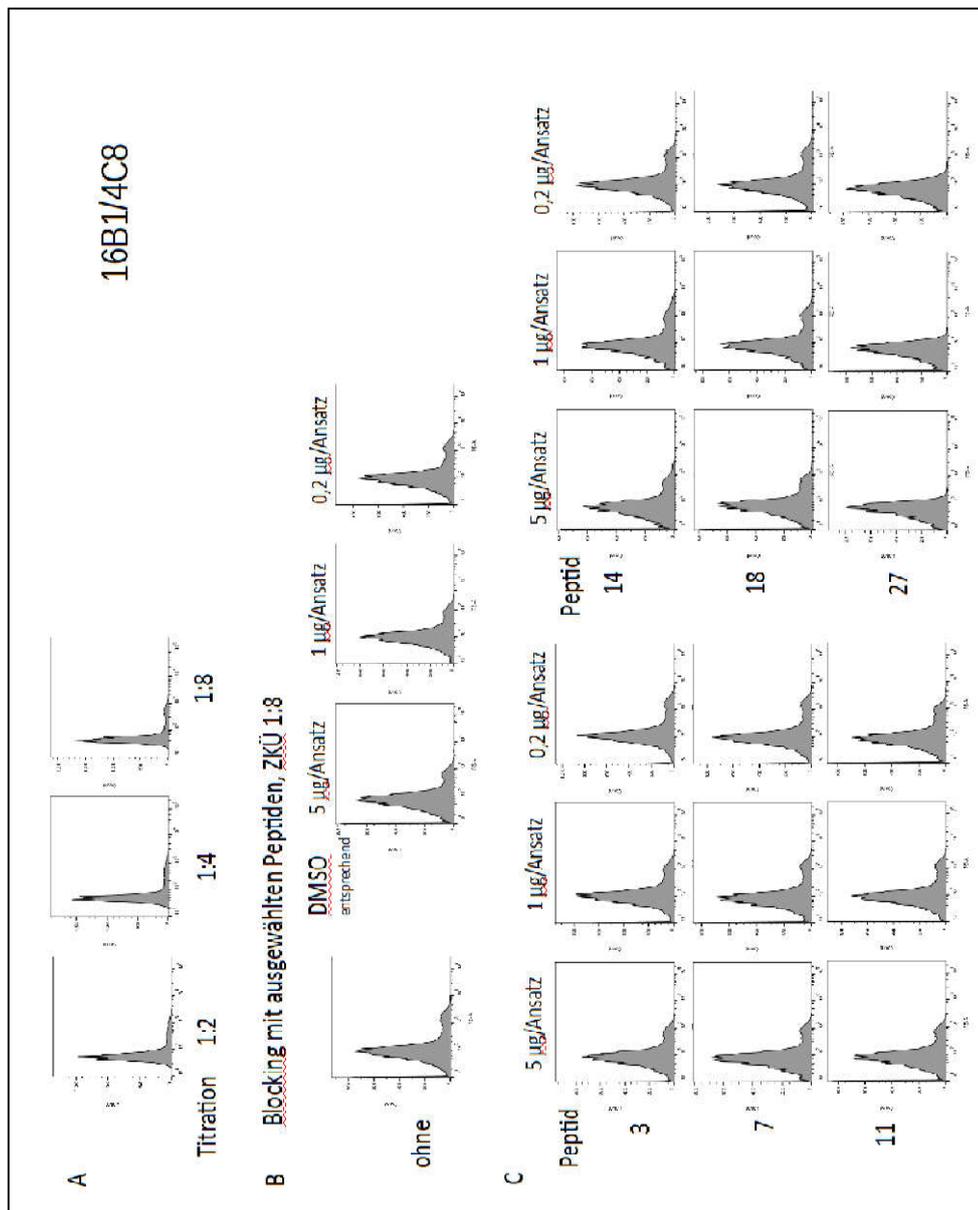
**Abb. 11: Klon 18A5: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings.** Die 32 Peptide sind auf der x-Achse dargestellt, die y-Achse zeigt die optische Dichte (optical density, OD), die im ELISA ermittelt wurde.

Das positive Ergebnis für einige Peptide (3, 7, 11), das bei allen Klonen des Isotyps IgG1 erhalten wurde, stellte sich in nachfolgenden Versuchen, bei denen der primär-Antikörper (mAb) weggelassen wurde, als unspezifische Bindung des sekundär-Antikörpers oder des Streptavidin-Konjugats heraus.

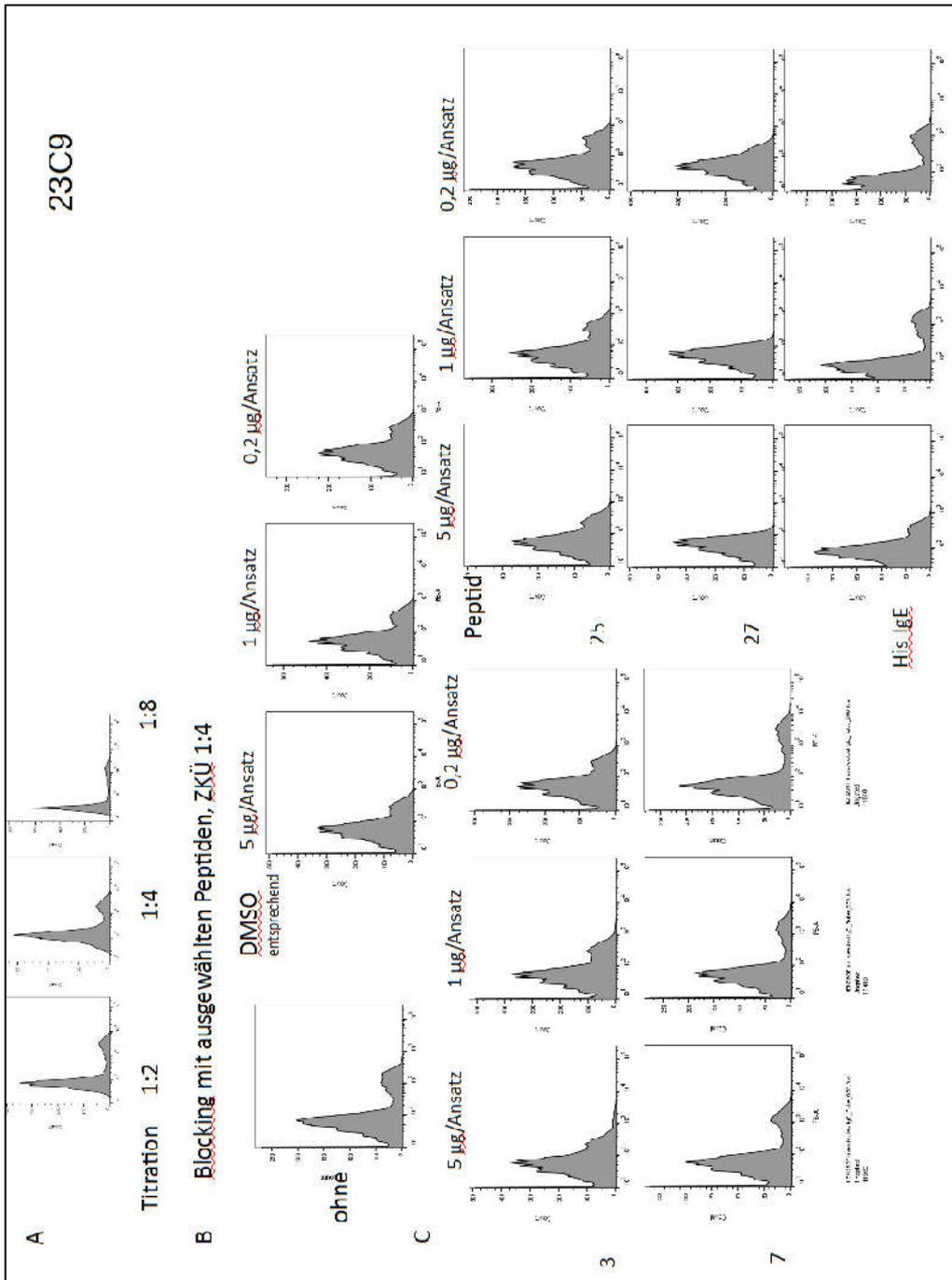
### 3.2.2. Blocking Assay

Die Erkennung spezifischer Epitope wurde für die drei gefundenen mAb mit dem Isotyp IgG1 auf der Basis der Ergebnisse des linearen Epitop-Mappings im ELISA mittels Blocking-Assay in der Durchflusszytometrie evaluiert. Wenn ein Peptid dem Epitop entspricht, blockiert es die Bindungsstelle des mAb und dieser kann nicht mehr an das von den HEK-Zellen intrazellulär exprimierte 6x-HIS-pIgE binden. Wurde der Antikörper vor der Färbung von transfizierten HEK-Zellen mit dem entsprechenden Peptid inkubiert, entspricht somit das Fehlen eines Peaks mit hoher Fluoreszenzintensität im Histogramm einem positiven Ergebnis für ein bestimmtes Peptid.

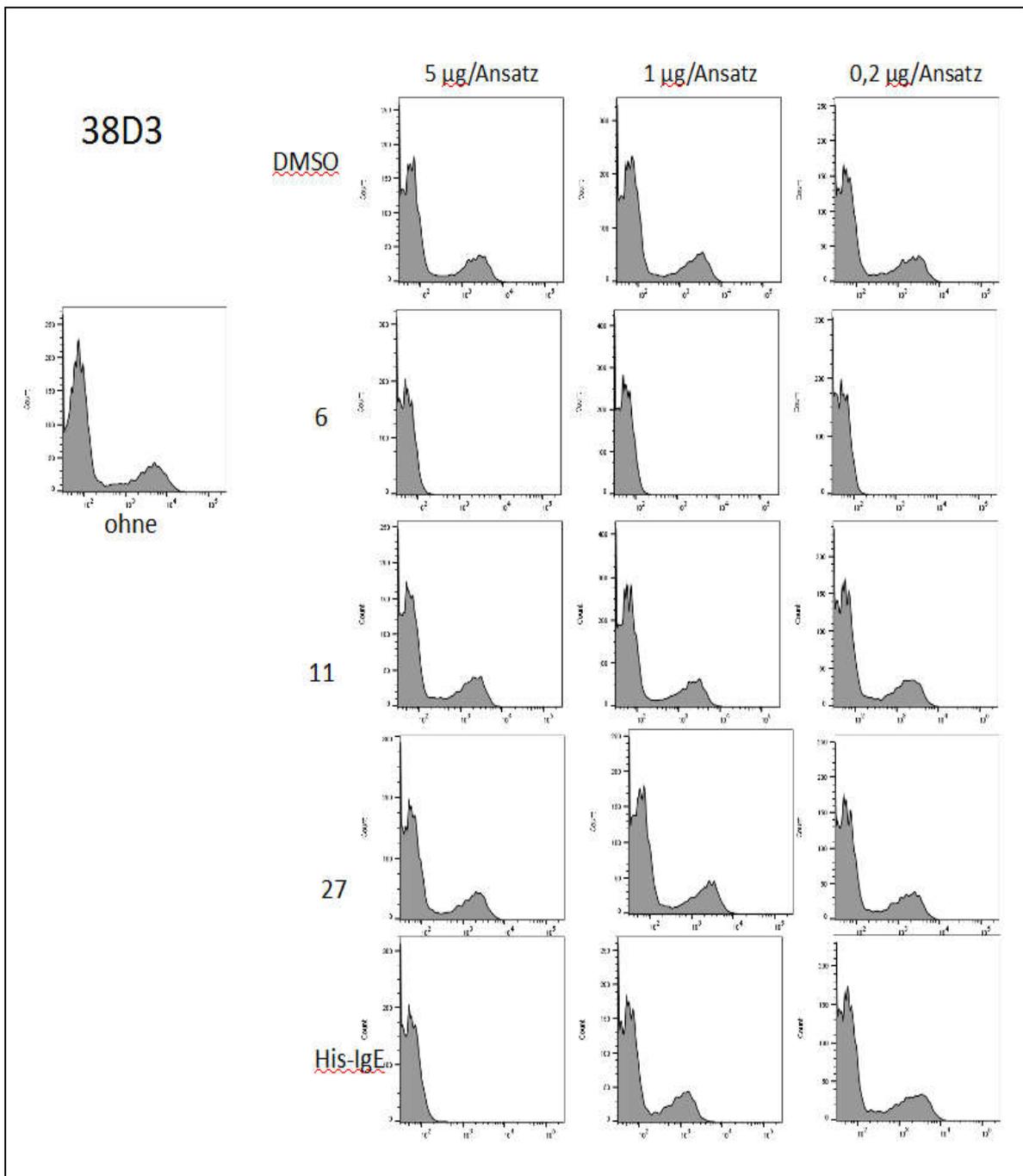
Dabei ergab sich für die Klone 16B1 und 23C9 – wie bereits im ELISA – ein vergleichbares Muster, was darauf hindeutete, dass diese dasselbe Epitop, nämlich Peptid 27, erkannten (Abb. 12 und Abb. 13). Der Klon 38D3 zeigte, ebenfalls entsprechend den Ergebnissen des linearen Epitop-Mappings, ein davon abweichendes Ergebnis, wobei sich im Blocking-Assay eine deutliche Bindung an Peptid 6 herausstellte (Abb. 14).



**Abb. 12: Blocking Assay auf transfizierten HEK T293 Zellen von Klon 16B1/Subklon 4C8.** Titration des Zellkulturüberstandes, um die geringst mögliche Verdünnung herauszufinden (A). Kontrollen für das Blocking: Zellkulturüberstand ohne Zugaben und Einfluss des Lösungsmittels (Dimethylsulfoxid, DMSO) für die Peptide in denselben Konzentrationen wie bei der Verdünnung der Peptide (B). Blocking der mAb-Bindung durch drei Konzentrationen ausgewählter Peptide (C)



**Abb. 13: Blocking Assay auf transfizierten HEK T293 Zellen von Klon 23C9.** Titration des Zellkulturüberstandes, um die geringst mögliche Verdünnung herauszufinden (A). Kontrollen für das Blocking: Zellkulturüberstand ohne Zugaben und Einfluss des Lösungsmittels (Dimethylsulfoxid, DMSO) für die Peptide in denselben Konzentrationen wie bei der Verdünnung der Peptide (B). Blocking der mAb-Bindung durch drei Konzentrationen ausgewählter Peptide (C).

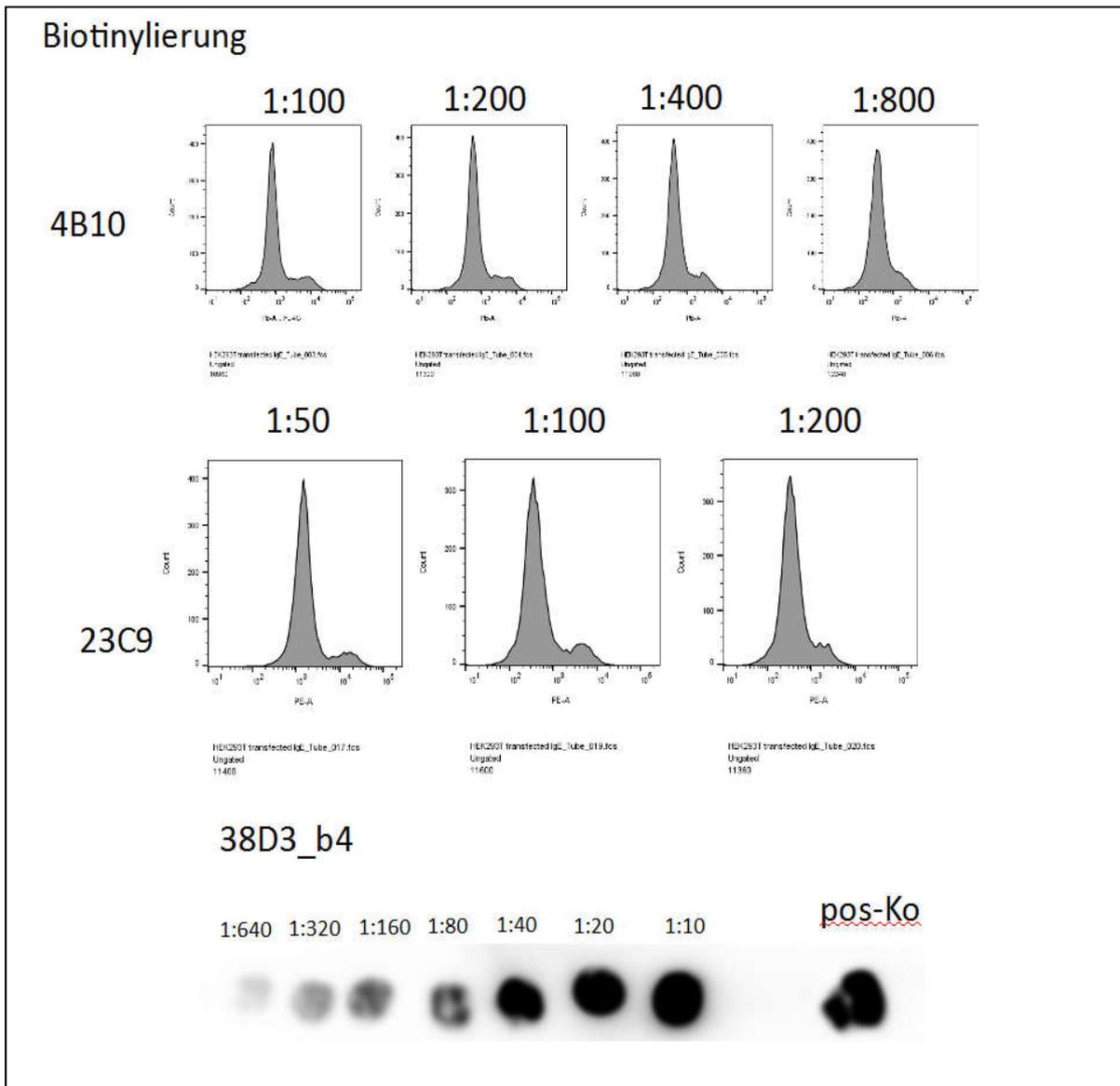


**Abb. 14: Blocking Assay auf transfizierten HEK T293 Zellen von Klon 38D3.** Blocking der mAb-Bindung durch drei Konzentrationen ausgewählter Peptide. Dieser Klon zeigte ein deutlich positives Ergebnis für das Peptid 6.

### 3.2.3. Biotinylierung

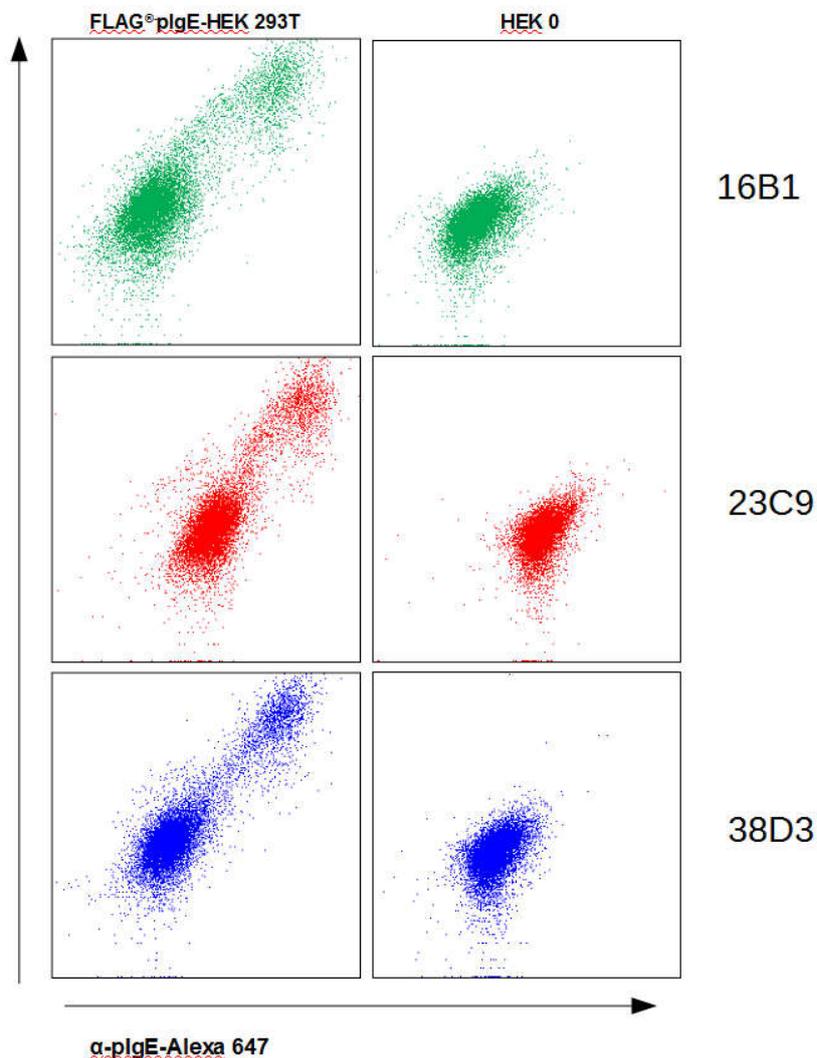
Für den nachfolgend beschriebenen Kompetitions-Assay und weitere Etablierungsschritte wurden die mAb biotinyliert (Abb. 15).

Die Biotinylierung selbst war nicht im praktischen Teil dieser Arbeit enthalten und die fertigen Produkte wurden zur Verfügung gestellt.



**Abb. 15: Biotinylierung.** Positives Signal für Biotin in der Durchflusszytometrie mit Streptavidin-PE und im Dot-Blot bei Detektion mit Streptavidin-HRP und nachfolgender Chemilumineszenzreaktion.

Mittels der biotinylierten Antikörper konnte eine weitere Evaluierung der anti-plgE-mAB durchgeführt werden (Abb. 16). Das intrazellulär exprimierte, rekombinante plgE ist das einzige Molekül der transfizierten HEK-Zellen, das auch FLAG<sup>®</sup> beinhaltet. Wenn nun mit zwei unterschiedlichen – mit verschiedenen Fluorochromen markierten – Antikörpern ein und dasselbe Molekül gebunden wird, ergibt dies nach Analyse im Durchflusszytometer in der Dot-Blot Darstellung eine Zellpopulation, die genau in der 45°- Diagonale liegt. Wie in Abb. 16 dargestellt, traf das für alle drei untersuchten mAb zu. Daher kann mit Sicherheit angenommen werden, dass die entsprechenden mAb tatsächlich plgE erkennen.

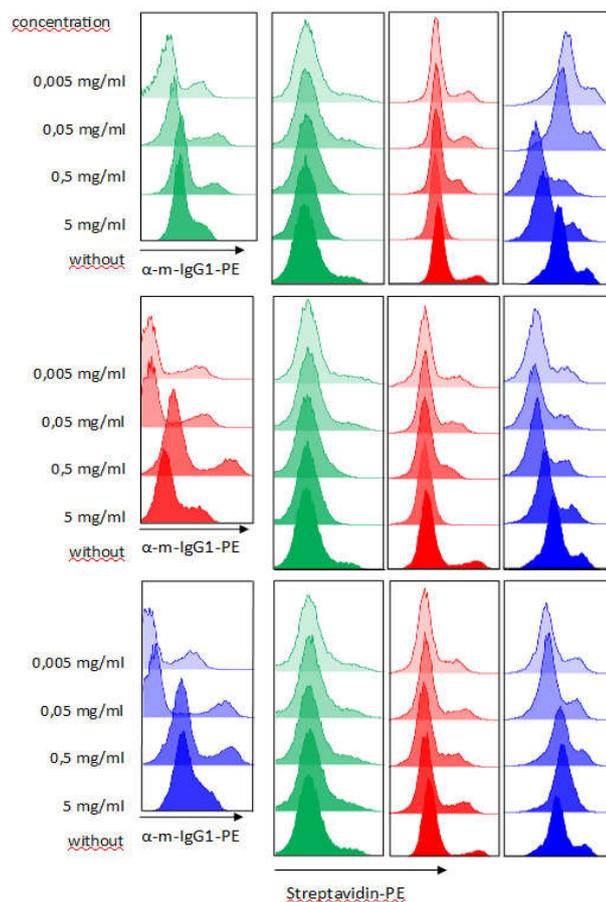


**Abb. 16: Gleichzeitige Detektion von FLAG<sup>®</sup>-Tag und Biotin auf transfizierten (FLAG<sup>®</sup>-plgE-HEK 293T) und nicht transfizierten HEK-293T-Zellen (HEK 0).** Es wurden simultan mit α-FLAG<sup>®</sup>-PE, und den biotinylierten mAb (Klone 16B1, 23C9 und 38D3) in Verbindung mit Streptavidin-Alexa 647 markiert.

### 3.2.4. Kompetitions-Assay

Beim Kompetitions-Assay bedeutet ein positives Signal für PE – beziehungsweise das am intrazellulären Epitop gebundene Biotin – dass der biotinylierte mAb den konkurrierenden nicht-biotinylierten Antikörper am Epitop verdrängen konnte (Abb. 17).

Alle drei monoklonalen Antikörper (Klone 16B1, 23C9 und 38D3) waren in der Lage, sich mit zunehmender Konzentration am Epitop selbst zu blockieren. Erwartungsgemäß konnten sich auch die Klone 16B1 und 23C9 in höheren Konzentrationen gegenseitig blockieren – diese erkennen dasselbe Epitop, was auch schon die beiden Methoden des Epitop-Mappings zeigten.

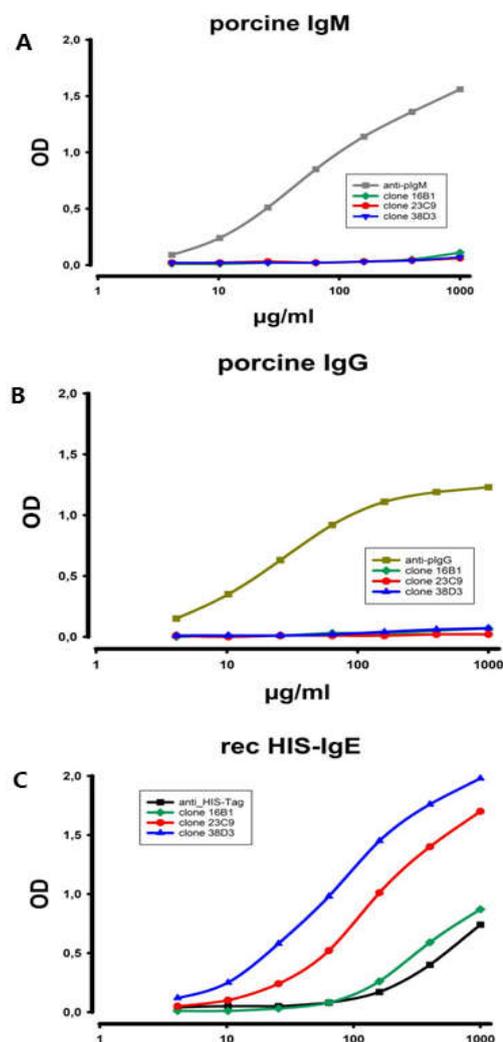


**Abb. 17: Ergebnis des Kompetitions-Assays.** FLAG®-pIgE-HEK 293T-Zellen wurden gleichzeitig mit biotinylierten und 3 unterschiedlichen Konzentrationen der nicht-biotinylierten mAb (Klone 16B1, 23C9, 38D3) inkubiert und konkurrierten somit um die Bindungsstelle. Die am intrazellulär exprimierten Epitop gebundenen biotinylierten Antikörper wurden mit Streptavidin-PE detektiert. Die Farbcodierung der Klone entspricht der in vorangegangenen Abbildungen (Grün = 16B1; Rot = 23C9; Blau = 38D3).

### 3.2.5. Test auf Kreuzreaktivität

Im ELISA wurde getestet, ob die mAb der Klone 16B1, 23C9 und 38D3 mit porcinem IgG oder IgM kreuzreagierten. Abb. 18 zeigt die ermittelte optische Dichte in Abhängigkeit von der Konzentration der porcinen Antikörper IgM und IgG sowie das zum Vergleich mitgeführte 6xHIS-pIgE. Als Referenz wurde jeweils auch mit anti-pIgG beziehungsweise anti-pIgM detektiert.

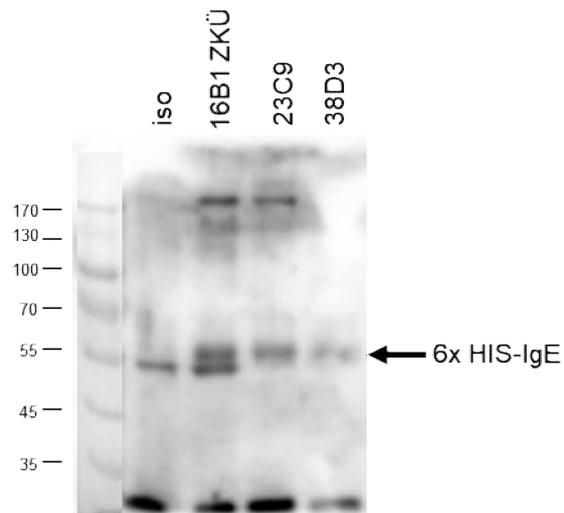
Bei keinem der getesteten Klone konnte eine Kreuzreaktivität mit porcinen Immunglobulinen der Klassen IgG oder IgM festgestellt werden.



**Abb. 18: Ergebnisse des Tests auf Kreuzreaktivität.** Evaluierung der Kreuzreaktivität mit porcinem IgM (A). Evaluierung der Kreuzreaktivität mit porcinem IgG (B). Reaktion der Klone auf HIS-IgE (Immunogen) im ELISA (C).

### 3.2.6. Immunpräzipitation

Das 6x HIS-pIgE-Konstrukt, das für die Immunisierung der Mäuse verwendet wurde, konnte von allen drei Klonen erkannt werden und war mithilfe der hergestellten mAb präzipitierbar und darstellbar (Abb. 19).



**Abb. 19: Ergebnis der Präzipitation des Immunogens (6x HIS-tagged pIgE): Immunoblot nach SDS-PAGE auf PVDF-Membran.** Das 6x HIS-IgE wurde unter Verwendung der Zellkulturüberstände der Klone 16B1, 23C9 und 38D3 präzipitiert. Parallel wurde eine IgG1-Isotypenkontrolle mitgeführt.

## 4. Diskussion

Bisher wurde nur die Herstellung polyklonaler Antisera gegen porcines IgE beschrieben (Roe et al. 1993, Rupa et al. 2008). MAb haben gegenüber polyklonalen Antikörpern den Vorteil, dass Affinität und Spezifität genau bekannt sind, und sie sich damit besser für standardisierte Verfahren eignen. Dazu kommt, dass diese Antikörper mit relativ einfachen Methoden vervielfältigt werden können, da Hybridomzellen eingefroren und archiviert, und zu jedem Zeitpunkt in beliebigem Ausmaß kultiviert werden können (Murphy und Weaver 2017).

Für die Herstellung von monoklonalem anti-IgE diverser Spezies wurde der Literatur zufolge meist auf eine gereinigte IgE-Fraktion aus dem Serum von Tieren zurückgegriffen, bei denen zuvor eine allergische Reaktion induziert worden war. Die Herstellung von anti-IgE im Speziellen wird aber durch gewisse Faktoren erschwert, wie beispielsweise die niedrige Serum-IgE-Konzentration und die Schwierigkeit, die IgE-Serumfraktion von der IgG-Serumfraktion zu trennen (DeBoer et al. 1993, Rupa et al. 2008).

Für das Projekt, das diese Diplomarbeit behandelt, wurde eine alternative Methode zur Herstellung des Immunogens verwendet.

Es wurde ein rekombinantes Konstrukt der konstanten Region der schweren Kette (Vernersson et al. 1997) mit einem 6x-HIS-Tag als Immunogen hergestellt. Die Erstellung eines rekombinanten Konstrukts bei bekannter Sequenz des Antigens ist also geeignet, die limitierenden Faktoren anderer Methoden zur Immunogengewinnung zu umgehen. Jedoch wurde das Immunogen von den verwendeten Zellen (HEK-EBNA) in den Zellkulturüberstand abgegeben und musste angereichert und gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Nickel-basierte immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) verwendet, was zu einer guten Anreicherung führte. Allerdings enthielt die Präparation noch zu einem gewissen Grad Begleitproteine, die zwar bei der Immunisierung eher von Vorteil waren, sich aber beim Screening der Zellkulturüberstände nachteilig auswirkten (Patzl pers. Mitteilung).

Daher wurde im Workflow dieses Projekts das Screening der Hybridome auf HEK-Zellen, die jene Sequenz der schweren Kette des pIgE-Moleküls intrazellulär exprimieren, die auch als Immunogen verwendet wurde, bevorzugt. Ein zweites rekombinantes Konstrukt wurde hergestellt, bei dem dieselbe Sequenz des pIgE (CH2-CH3-CH4) jedoch mit einem FLAG<sup>®</sup>-Tag versehen war und die Signalsequenz zur Ausschleusung entfernt wurde. Damit wurden

HEK 293 T-Zellen transfiziert und für das Screening der positiven Klone verwendet. Auch in diversen Charakterisierungsschritten fanden diese Transfektanten Verwendung.

Zu einem früheren Zeitpunkt im Projektablauf, also vor Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten Methode, wurde für den Screening-Prozess das Immunogen selbst, also 6x-HIS-tagged pIgE eingesetzt und im ELISA zum Auffinden positiver Klone herangezogen. Diese Herangehensweise erwies sich als ineffizient, da viele der von den Hybridomen produzierten mAb im Immunogen enthaltene Begleitproteine, beziehungsweise den 6x-HIS-Tag erkannten. Sehr viele Klone reagierten also positiv, ohne dass die so aufgefundenen mAb für pIgE spezifisch gewesen wären (Patzl pers. Mitteilung).

Die Transfektion der HEK-Zellen und die darauf basierende Screening-Methode erwies sich als rasche und effiziente Methode, Klone aufzufinden, die spezifische Antikörper produzierten.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit etwa 2880 individuelle Klone auf anti-IgE-Produktion getestet, dazu kamen noch diverse Subklonierungen einzelner „Motherwells“, die auch in das Screening-Verfahren aufgenommen wurden. Dass diese vergleichsweise hohe Zahl an Klonen in der Auffindung von nur vier spezifischen mAb resultierte, ist aber erfahrungsgemäß nicht ungewöhnlich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mAb herzustellen, die ein Epitop auf der schweren Kette des porcinen IgE-Moleküls erkennen. Mittels des Durchflusszytometrie-basierten Screenings konnten vier Klone identifiziert werden, die entsprechende Antikörper produzieren, dabei handelt es sich um drei Antikörper des Isotyps IgG1 und einen Antikörper des Isotyps IgM.

Mithilfe von überlappenden 15-mer-Peptiden, deren Sequenz dem Immunogen entspricht, konnten die Epitope der drei IgG1 Antikörper erfolgreich ermittelt werden. Interessant war, dass zwei der drei Antikörper im ELISA zum Epitop-Mapping eine Spezifität für dasselbe Epitop zeigten, das in der Domain CH4 lokalisiert ist, was dann im Durchflusszytometrie-basierten Blocking Assay bestätigt wurde. Der dritte Klon wies eine andere Spezifität auf und erkannte ein Peptid der Domain CH2. Die Bindung der mAb an weitere Peptide im ELISA-basierten Epitop-Mapping konnten in der Durchflußzytometrie nicht bestätigt werden. Diese erwiesen sich in nachfolgenden ELISA-Experimenten als unspezifische Bindungen des Sekundär-Antikörpers bzw. des Streptavidin-Konjugats.

Dass drei der Antikörper dem Isotyp IgG1 zuzuordnen sind, ist zumindest teilweise darauf zurückzuführen, dass IgG1 die Immunglobulinsubklasse mit der höchsten Serumkonzentration ist (Murphy und Weaver 2017), und folglich der Großteil der murinen B-Lymphozyten, die als Basis für die Hybridomfusion dienen, diesen Subtyp produzieren.

Außerdem ist bekannt, dass bei der Herstellung von mAb mittels Hybridomtechnik IgG1 der am häufigsten erhaltene Isotyp ist – besonders wenn es sich beim zu erkennenden Antigen um ein Protein handelt. Weiters ist beschrieben, dass, auch wenn vorwiegend der Isotyp IgG1 aus einer Hybridomkultur isoliert wird, auch vereinzelt IgM-Antikörper „dazwischen“ vorkommen (Apiratmateekul et al. 2009). Diese Aussagen korrelieren in hohem Maße mit den Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden.

Der gefundene und identifizierte Antikörper des Isotyps IgM ist, bedingt durch das Vorliegen als Pentamer, eher ungeeignet, als Sekundärantikörper für verschiedene Methoden eingesetzt zu werden. Er wurde daher auch nicht allen Charakterisierungsschritten unterzogen. Dieser spezifische monoklonale Antikörper hat als IgM höchstens als Coating-Antikörper in einem ELISA zur Detektion von IgE Molekülen Potential. Um dies zu bestätigen, beziehungsweise ihn für erste Anwendungen zu etablieren, müssen noch weitere Charakterisierungs- und Etablierungsschritte folgen.

Eine Hypothese dieser Arbeit lautete, dass mithilfe der hergestellten Antikörper das Immunogen (6x HIS-tagged pIgE) darstellbar ist. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Das Immunogen war mithilfe der mAb präzipitierbar, und auch im ELISA konnte HIS-IgE problemlos durch die hergestellten Antikörper detektiert werden. Darüber hinaus wurde eine Kreuzreaktion mit porcinem IgG und IgM ausgeschlossen, wodurch bestätigt wurde, dass die mAb porcines IgE spezifisch erkennen und nicht auch gegen andere porcine Immunglobulinklassen gerichtet sind.

Alles weist darauf hin, dass die hergestellten mAb nach weiteren Charakterisierungs- und Etablierungsschritten für die Verwendung in diversen Standardverfahren geeignet sind. Die Charakterisierung und Etablierung ist zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Es kann aber zusammenfassend gesagt werden, dass die erfolgreiche Herstellung dieser mAb gegen porcines IgE einen wichtigen Schritt darstellt, das Schwein als Großtiermodell für weitere Anwendungen in Pathogenese, Diagnostik und Therapie von Allergien und Parasitosen zu etablieren.

## 5. Zusammenfassung

Immunglobulin E (IgE) mediiert Typ I-Hypersensitivitätsreaktionen und spielt eine Rolle in der initialen Immunantwort auf Parasiten. Speziell für die Untersuchung und Charakterisierung von Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ I werden spezifische Antikörper gegen porcines IgE (pIgE) benötigt. Das Schwein ist für solche Fragestellungen ein gefragter Modellorganismus, was jedoch durch die geringe Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper (mAb) gegen pIgE erschwert wird. Sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärimmunologie besteht schon lange das Bestreben, monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies, mAb) gegen pIgE herzustellen und verfügbar zu machen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden monoklonale Antikörper gegen pIgE hergestellt und charakterisiert. Dafür wurden BALB/c-Mäuse mit einem rekombinanten Konstrukt der schweren Kette des pIgE-Moleküls (CH<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>) in der Größe von etwa 50 kDa, versehen mit einem 6xHIS-Tag (HIS-IgE), immunisiert. Milz-Lymphozyten dieser Mäuse wurden mit murinen Myelomzellen fusioniert und die Hybridome kultiviert. Die Klone, die anti-pIgE produzierten, wurden durch ein Durchflusszytometrie-basiertes Screeningverfahren ermittelt, wobei die mAb bei einem Screen auf HEK 293T-Zellen, die intrazellulär die mit einem FLAG<sup>®</sup>-Tag versehene schwere Kette (CH<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>) exprimierten (FLAG<sup>®</sup>-pIgE), auf ihre Spezifität untersucht wurden. Die gewonnenen Antikörper wurden mithilfe von in je fünf Aminosäuren überlappenden 15-mer-Peptiden (entsprechend der pIgE-Sequenz) im ELISA weiter charakterisiert, um das von den mAb erkannte Epitop genau definieren zu können. Dieselben 15-mer-Peptide wurden auch in einem Blocking-Assay in der Durchflusszytometrie auf FLAG<sup>®</sup>-IgE HEK 293T-Zellen verwendet. Eine etwaige Kreuzreaktivität mit anderen porcinen Immunglobulinen wurde im ELISA überprüft.

Es wurden vier monoklonale Antikörper gewonnen, die pIgE spezifisch erkannten. Bei drei Antikörpern handelte es sich um den Isotyp IgG1, bei einem weiteren um IgM. Zwei der IgG1-mAb erkannten dasselbe Epitop. Es konnte keine Kreuzreaktivität mit porcinem IgG oder IgM festgestellt werden, und das Immunogen ist mittels der drei hergestellten mAb des Isotyps IgG1 präzipitierbar. Die so hergestellten monoklonalen Antikörper haben das Potential, für diverse immunologische Standardverfahren Verwendung zu finden und könnten somit dazu beitragen, dass das Schwein als Großtiermodell in der Allergieforschung etabliert und genutzt wird.

## 6. Summary

Immunoglobuline E is the primary mediator of type I hypersensitivity and is involved in the initial immune response to parasites. In order to examine and further characterize type I hypersensitivity reactions, monoclonal antibodies against porcine IgE (pIgE) are an essential tool in research and diagnostics. There is huge interest in using pigs as large animal models for allergic diseases. The lack of specific antibodies against pIgE, however, limits their application currently. Generating monoclonal antibodies (mAb) directed against pIgE has been a long lasting effort in veterinary as well as human immunology and allergology.

The subject of this thesis was the production and characterization of mAb against pIgE. For this purpose, BALB/c mice were immunized with 6xHIS-tagged recombinant porcine IgE heavy chain (CH2-CH4; HIS-IgE) of about 50 kDa. Splenic lymphocytes of immunized mice were fused with murine myeloma cells. Clones producing mAb were screened on HEK 293T cells expressing intracellular FLAG<sup>®</sup>-tagged pIgE heavy chain (CH2-CH4; FLAG<sup>®</sup>-IgE) by flow cytometry (FCM) for specificity. Specific mAb were further characterized by ELISA with 32 15-mer peptides, overlapping in five amino acids created of the respective pIgE sequence in order to figure out the recognized epitope. The same peptides were also used in blocking assays on FLAG<sup>®</sup>-IgE expressing HEK 293T cells by FCM. Cross-reactivity with other porcine immunoglobulins was tested by ELISA.

This attempt resulted in the generation of four monoclonal antibodies, three of which were classified as IgG1, the fourth as IgM. Two of the IgG1 antibodies recognized the same epitope.

No cross reactivity with porcine IgG or IgM was detected. The three IgG1-mAb are capable of precipitating the immunogen.

These monoclonal antibodies have potential to be used for various immunological methods and could prove as a valuable tool for research in allergy and atopy. They might constitute an important factor in the establishment and use of swine as a large animal model for hypersensitivity reactions.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgE-Moleküls.....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des vollständigen FcεRI-Rezeptors (Sutton et al. 2019)...	7
Abb. 3: Schematische Darstellung einer allergischen Immunreaktion (Hellman et al. 2017).	10
Abb. 4: Produktion monoklonaler Antikörper mittels Hybridomtechnik.....	14
Abb. 5: Workflow dieses Projekts. ....	21
Abb. 6: Schematische Darstellung der codierenden Region des rekombinanten Konstrukts (Vernersson et al. 1997).....	30
Abb. 7: Dot-Blot; Beispielabbildung.....	44
Abb. 8: Klon 16B1: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings.....	46
Abb. 9: Klon 23C9: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings. ....	47
Abb.10: Klon 38D3: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings. ....	47
Abb. 11: Klon 18A5: Ergebnis des linearen Epitop-Mappings. ....	48
Abb. 12: Blocking Assay auf transfizierten HEK T293 Zellen von Klon 16B1/Subklon 4C8...	49
Abb. 13: Blocking Assay auf transfizierten HEK T293 Zellen von Klon 23C9.....	50
Abb. 14: Blocking Assay auf transfizierten HEK T293 Zellen von Klon 38D3.....	51
Abb. 15: Biotinylierung.....	52
Abb. 16: Gleichzeitige Detektion von FLAG <sup>®</sup> -Tag und Biotin auf transfizierten (FLAG <sup>®</sup> -pIgE-HEK 293T) und nicht transfizierten HEK-293T-Zellen (HEK 0). ....	53
Abb. 17: Ergebnis des Kompetitions-Assays.....	54
Abb. 18: Ergebnisse des Tests auf Kreuzreaktivität.....	55
Abb. 19: Ergebnis der Präzipitation des Immunogens (6x HIS-tagged pIgE): Immunoblot nach SDS-PAGE auf PVDF-Membran.....	56

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Materialien, Reagenzien und Kits.....	22
Tab. 2: kommerzielle Antikörper und Streptavidin.....	26
Tab. 3: Geräte und Auswerte-Software .....	27
Tab. 4: Medien, Puffer und Lösungen.....	28
Tab. 5: Aminosäuresequenzen der überlappenden 15-mer-Peptide .....	37
Tab. 6: SDS-PAGE: Gelzusammensetzung.....	42

## 9. Literaturverzeichnis

Akagi S, Nakajima C, Tanaka Y, Kurihara Y (2018): Flow cytometry-based method for rapid and high-throughput screening of hybridoma cells secreting monoclonal antibody. *Journal of bioscience and bioengineering* **125** (4), 464–469.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC (2007): Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology* **7** (12), 975–987.

Apiratmateekul N, Phunpae P, Kasinrerak W (2009): A modified hybridoma technique for production of monoclonal antibodies having desired isotypes. *Cytotechnology* **60** (1-3), 45.

Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SGO, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD (1968): Immunoglobulin E. A new class of human Immunoglobulin. *Immunochemistry* **5** (4), 327–328.

Campbell AM (1984): Monoclonal Antibody Technology. The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, v.13).

DeBoer DJ, Ewing KM, Schultz KT (1993): Production and characterization of mouse monoclonal antibodies directed against canine IgE and IgG. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **37**, 183–199.

Einhauer A, Jungbauer A (2001): The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **49** (1-3), 455–465.

Faith RE, Clem LW (1973): Passive Cutaneous Anaphylaxis in the Chicken. Biological Fractionation of the mediating Antibody Population. *Immunology* **25**, 151–164.

Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR (2003): The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Reviews Immunology* **3**, 721–732.

Gould HJ, Sutton BJ (2008): IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology* **8**, 205–217.

Hammerberg B (2009): Canine immunoglobulin E. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **132** (1).

- Hellman L (1993): Characterization of four novel e chain mRNA and a comparative analysis of genes for the e chain of immunoglobulin E in rodents and man. *European Journal of Immunology* **23**, 159–167.
- Hellman LT, Akula S, Thorpe M, Fu Z (2017): Tracing the Origins of IgE, Mast Cells, and Allergies by Studies of Wild Animals. *Frontiers in immunology* **8**:1749.
- Hine BC, Hunt PW, Beasley AM, Windon RG, Glover SA, Colditz IG (2010): Selective transport of IgE into ovine mammary secretions. *Research in veterinary science* **89** (2), 184–190.
- Hu J, Chen J, Ye L, Cai Z, Sun J, Ji K (2018): Anti-IgE therapy for IgE-mediated allergic diseases: from neutralizing IgE antibodies to eliminating IgE+ B cells. *Clinical and translational allergy* **8**, 27.
- Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM (1966): Physicochemical Properties of Reaginic Antibody V. Correlation of Reaginic Activity with  $\gamma$ E-Globulin Antibody. *The Journal of Immunology* **97** (6), 840–853.
- Köhler G, Milstein C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497.
- Kuhne M, Dippong M, Flemig S, Hoffmann K, Petsch K, Schenk JA et al. (2014): Comparative characterization of mAb producing hapten-specific hybridoma cells by flow cytometric analysis and ELISA. *Journal of immunological methods* **413**, 45–56.
- Lawrence MG, Woodfolk JA, Schuyler AJ, Stillman LC, Chapman MD, Platts-Mills TA (2017): Half-life of IgE in serum and skin: Consequences for anti-IgE therapy in patients with allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* **139** (2), 422-428.e4.
- Lundqvist ML, Middleton DL, Radford C, Warr GW, Magor KE (2006): Immunoglobulins of the non-galliform birds: Antibody expression and repertoire in the duck. *Developmental & Comparative Immunology* **30** (1-2), 93–100.
- MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM (1997): Down-regulation of Fc $\epsilon$ R1 expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *Journal of Immunology* **158** (3), 1438–1445.
- Mahmood T, Yang PC (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4** (9), 429–434.

- Mair KH, Sedlak C, Käser T, Pasternak A, Levast B, Gerner W, Saalmüller A, Summerfield A, Gerdtts V, Wilson HL, Meurens F (2014): The porcine innate immune system: An update. *Developmental & Comparative Immunology* **45** (2).
- Marichal T, Starkl P, Reber LL, Kalesnikoff J, Oettgen HC, Tsai M, Metz M, Galli SJ (2013): A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity* **39** (5), 963–975.
- Mondoulet L, Kalach N, Dhelft V, Larcher T, Delayre-Orthez C, Benhamou P, Spergel J, Sampson H, Dupont C (2017): Treatment of gastric eosinophilia by epicutaneous immunotherapy in piglets sensitized to peanuts. *Clinical and Experimental Allergy* **47** (12), 1640-1647.
- Mukai K, Tsai M, Starkl P, Marichal T, Galli SJ (2016): IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms. *Seminars in immunopathology* **38** (5), 581–603.
- Murphy K, Weaver C (2017): Janeway's immunobiology. 9. Aufl. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- National Research Council (1999): Monoclonal Antibody Production. Washington, DC: The National Academies Press.
- Navarro P, Barbis DP, Antczak D, Butler JE (1995): The complete cDNA and deduced amino acid sequence of equine IgE. *Molecular Immunology* **32**, 1–8.
- Oettgen, HC, Geha RS (2001): IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* **107** (3), 429–440.
- Platts-Mills TAE, Heymann PW, Commins S, Woodfolk JA (2016): The discovery of IgE 50 years later. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* **116** (3), 179–182.
- Platzer B, Rüter F, van der Mee J, Fiebiger E (2011): Soluble IgE receptors--elements of the IgE network. *Immunology letters* **141** (1), 36–44.
- Pritchard DI (1993): Immunity to helminths: is too much IgE parasite- rather than host-protective? *Parasite Immunology* **15**, 5–9.
- Reinero CR (2009): Feline Immunoglobulin E: Historical perspective, diagnostics and clinical relevance. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **132** (1), 13–20.

- Roe JM, Patel D, Morgan KL (1993): Isolation of porcine IgE, and preparation of polyclonal antisera. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **37** (2), 83–97.
- Romagnani S (2004): The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* **112** (3), 352–363.
- Rup BJ (1989): Production of large numbers of hybridomas producing monoclonal antibodies against rat IgE using mast cell-deficient w/wv and sl/sld strains of mice. *Journal of immunological methods* **122** (1), 137–142.
- Rupa P, Schmied J, Wilkie BN (2009): Porcine allergy and IgE. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **132** (1), 41–45.
- Rupa P, Hamilton K, Cirinna M, Wilkie BN (2008): Porcine IgE in the context of experimental food allergy: Purification and isotype-specific antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **125** (3-4), 303–314.
- Schmied J, Rupa P, Garvie S, Wilkie B (2013): Immune response phenotype of allergic versus clinically tolerant pigs in a neonatal swine model of allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **154** (1-2), 17–24.
- Soler M (2001): Omalizumab, a monoclonal antibody against IgE for the treatment of allergic diseases. *International Journal of Clinical Practice* **55** (7), 480–483.
- Stokes J (2017): Anti-IgE Treatment for Disorders Other Than Asthma. *Frontiers in medicine* **4**, 152.
- Sutton BJ, Davies AM (2015): Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunological Reviews* **268** (1), 222–235.
- Sutton BJ, Davies AM, Bax HJ, Karagiannis SN (2019): IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies* **8** (1), 19.
- Talay O, Yan D, Brightbill HD, Straney EE, Zhou M, Ladi E, Lee WP, Egen JG, Austin CD, Xu M, Wu LC (2012): IgE<sup>+</sup> memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nature Immunology* **13** (4), 396–404.
- Talbott MW, Strausser HR (1977): Increase in serum IgE levels of ovalbumin-sensitized cats and the detection of elastase and collagenase activities in secretions of sensitized feline alveolar macrophages challenged in vitro. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **54** (3), 198–204.

Thatcher EF, Gershwin LJ (1988): Generation and characterization of murine monoclonal antibodies specific for bovine immunoglobulin E. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **18** (1), 53–66.

Van Gramberg JL, de Veer MJ, O'Hehir RE, Meeusen EN, Bischof RJ (2013): Use of animal models to investigate major allergens associated with food allergy. *Journal of allergy* **2013**, 635695.

Vernersson M, Aveskogh M, Hellman L (2004): Cloning of IgE from the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and a comparative analysis of  $\epsilon$  chains from all three extant mammalian lineages. *Developmental & Comparative Immunology* **28** (1), 61–75.

Vernersson M, Pejler G, Kristersson T, Alving K, Hellman L (1997): Cloning, structural analysis, and expression of the pig IgE  $\epsilon$  chain. *Immunogenetics* **46**, 461–468.

Wachholz PA, Dearman RJ, Kimber I (2005): Detection of Allergen-Specific IgE Antibody Responses. *Journal of immunotoxicology* **1** (3), 189–199.

Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995): IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* **16** (8), 392–398.

Yanagihara Y, Kajiwara K, Ikizawa K, Koshio T, Okamura K, Ra C (1994): Recombinant Soluble Form of the Human High-affinity Immunoglobulin E (IgE) Receptor Inhibits IgE Production through Its Specific Binding to IgE-bearing B Cells. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 2162–2165.

## 10. Abkürzungsverzeichnis

AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
C4BP	Komplementbindendes Protein 4
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCM	flow cytometry/Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HEK	human embryonic kidney
HIS-Tag	Polyhistidin-Tag
HIS-IgE	6x HIS-tagged pIgE
HT	Hypoxanthin, Thymidin
Ig	Immunglobulin
IL-4	Interleukin-4
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography
ITAM	tyrosine-based activation motif
mAb	monoclonal antibody/monoklonaler Antikörper
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
neAS	nicht-essentielle Aminosäuren
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline + Tween20

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pIgE	porcines Immunglobulin E
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RG	Reaktionsgefäß
SA-HRP	streptavidin horse radish peroxidase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTBS	Tris buffered saline + Tween20