

Charakterisierung der humoralen Immunantwort
gegen das Bienengiftallergen Api m 10
bei Patienten mit Bienengiftallergie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Roßbach, Antonia Maria
aus Grevenbroich
Gießen (2023)

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie,
Universitätsklinikum des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Thilo Jakob
Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Sachs
Tag der Disputation: 23.01.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hymenoptereingiftallergie	2
1.1.1. Epidemiologie	2
1.1.2. Pathogenese	2
1.1.3. Klinisches Bild	3
1.2. Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie	4
1.2.1. Anamnese	4
1.2.2. Hauttests	5
1.2.3. In-vitro Tests	6
1.3. Therapie	7
1.3.1. Therapie der akuten Reaktion	7
1.3.2. Langfristige Therapie	8
1.4. Humorale Immunantwort der Bienengiftallergie	11
1.4.1. Immunglobulin E	12
1.4.2. Immunglobulin G	12
1.5. Molekulare Bienengiftallergiediagnostik	12
1.5.1. Bienengift- Einzelallergene	13
1.5.2. Api m 10	14
1.6. Epitopkartierung	15
1.7. Zielsetzung	17
2. Fragestellungen	18
3. Material	19
3.1. Patientenmaterial	19
3.2. Tests für die serologische Diagnostik	19
3.3. Proteinantigene	19
3.4. Chemikalien	19
3.5. Puffer und Lösungen	19
3.6. Reagenzien	20
3.7. Antikörper	20
3.8. Verbrauchsartikel	20
3.9. Geräte	21
3.10. Software	21
4. Methoden	22
4.1. Auswahl des Patientenkollektives	22
4.2. ImmunoCAP	22
4.3. Macroarray	23
4.3.1. IgE Macroarray	25
4.3.2. IgG Macroarray	26
4.3.3. Inhibitionsassay	26
4.4. IgG ELISA	27
4.5. Statistik	28

5. Ergebnisse	30
5.1. IgE-Epitopkartierung mittels Macroarray	30
5.1.1. sIgE-Reaktivität gegen Peptid 54	34
5.1.2. Inhibitionsassay	35
5.2. Bestimmung der IgG-Reaktivität gegen Api m 10 mittels ImmunoCAP	37
5.3. IgG-Epitopkartierung mittels Macroarray	38
5.4. IgG-Epitopkartierung mittels ELISA	44
6. Diskussion	47
6.1. IgE-Reaktivität gegen Api m 10-Peptide	47
6.2. IgG-Reaktivität gegen Api m 10- Peptide	50
6.2.1. Macroarray	50
6.2.2. ELISA	52
6.3. Macroarray und ELISA als Methoden zur Epitopkartierung	53
6.4. Klinische Relevanz der Ergebnisse	55
6.5. Limitationen der Arbeit	56
6.6. Ausblick	57
7. Zusammenfassung	58
8. Summary	60
9. Verzeichnisse	62
9.1. Abkürzungsverzeichnis	62
9.2. Abbildungsverzeichnis	64
9.3. Tabellenverzeichnis	66
9.4. Literaturverzeichnis	67
10. Anhang	75
10.1. Tabelle Patientenkollektiv	75
10.2. Publikationen und Preise	76
10.3. Ehrenwörtliche Erklärung	77
10.4. Danksagung	78

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen beobachtet werden. Gründe für diesen Anstieg sind nicht gänzlich geklärt, diskutiert werden Faktoren wie Umwelteinflüsse, Ernährung, psychosoziale Interaktionen und genetische Prädispositionen (Ring, 2012).

Rund 20-30% der Bevölkerung in Deutschland leiden an einer allergischen Erkrankung, sodass Allergien gerechtfertigt als „Volkskrankheit“ bezeichnet werden (Klimek et al., 2019).

Eine verbreitete Allergie ist die Hymenopteren- bzw. Insektengiftallergie. In Deutschland sind Allergien gegen die Gifte von Honigbienen (*Apis mellifera*, im Folgenden Biene genannt) und Wespen (*Vespula spp.*) am weitesten verbreitet. Eine solche allergische Reaktion gegen das Honigbienen Gift (HBG) kann sich vielseitig zeigen, von einer lokalen Reaktion auf der Haut bis hin zu einer tödlichen Anaphylaxie. Therapeutisch kann die HBG-Allergie mittels spezifischer Immuntherapie (SIT) behandelt werden.

Die SIT zeigt in 77- 84% der Fälle von behandelten Bienengiftallergikern eine positive Wirkung und ist somit weniger effektiv als die Therapie bei Wespengiftallergikern mit einer Wirksamkeit von 91- 96% (Schäfer, 2009).

Aus diesem Grund wird intensiv an den verschiedenen Einzelallergenen des Bienengiftes (BG) geforscht, um diese besser verstehen und die Therapie in der Zukunft möglichst effektiv und spezifisch gestalten zu können.

In diesem Kapitel möchte ich zu einem besseren Verständnis der Zielsetzung dieser Arbeit zunächst das Krankheitsbild und die Relevanz der Hymenopteren Giftallergie im klinischen Alltag mit Diagnostik und Therapie erläutern. Ein besonderer Fokus soll auf die Bienengiftallergie bzw. die Einzelallergene des Bienengifts, vor allem Api m 10, sowie die humorale Immunantwort mit IgE- und IgG-Antikörpern gelegt werden. Im Anschluss daran werde ich die Methode der Epitopkartierung, die in dieser Arbeit zur Charakterisierung der humoralen Immunantwort gegen Api m 10 Verwendung findet, darstellen, um abschließend die Zielsetzung der Arbeit zu beschreiben.

1.1. Hymenopterengiftallergie

Allergische Reaktionen treten größtenteils nach Stichen von Wespen, Bienen und Ameisen auf, welche der Ordnung der Hymenoptera angehören (Bilo et al., 2005).

Da der Fokus dieser Studie auf der Bienengiftallergie liegt, wird im Folgenden auf die Gattung der Biene detaillierter eingegangen. Die Biene wird gemeinsam mit der Hummel (*Bombus*) zur Familie der Apidae gezählt. Das Stichrisiko durch eine Biene ist während der gesamten Vegetationsperiode von Ende Februar bis Anfang Oktober erhöht. Bienen besitzen bei potenziellen Bedrohungen ein ausgeprägtes Abwehrverhalten, sodass es hierbei zu einem Stich kommen kann. Im Laufe der Evolution hat sich aus dem Eiablageapparat der weiblichen Biene ein Giftstachel entwickelt. Dieser kann nach dem Stich in der Epidermis verbleiben und eine letale Konsequenz für die Biene haben (Mauss, 2008).

Durch einen Bienenstich werden ungefähr $59 \pm 7 \mu\text{g}$ Proteine und Peptide in die Epidermis injiziert (Hoffman et al., 1984).

1.1.1. Epidemiologie

Laut epidemiologischen Studien liegt die Prävalenz der Sensibilisierung bei ungefähr 15% der weltweiten Bevölkerung. Systemische Reaktionen treten mit einer Häufigkeit von 0,3- 3,3% in der Allgemeinbevölkerung auf. Als Risikofaktoren für eine systemische Reaktion werden in der Literatur das männliche Geschlecht, ein Alter >40 Jahre, Vorerkrankungen und die Lokalisation des Stiches, vor allem an Kopf und Hals, angegeben (Schäfer, 2009).

Laut statistischem Bundesamt sterben in Deutschland jährlich etwa 20 Menschen in Folge eines Insektenstiches.

Eine Sensibilisierung gegen Bienen- und/oder Wespengift liegt bei ca. 42% der Allgemeinbevölkerung vor (Blank et al., 2019).

1.1.2. Pathogenese

Die Hymenopterengiftallergie ist eine Typ I-Allergie vom Soforttyp und ist somit eine IgE vermittelte Reaktion. Sie setzt voraus, dass eine Sensibilisierung in der Vergangenheit mit einem Allergen stattgefunden hat (Suerbaum et al., 2009).

Gelangt das Insektengift in die Haut wird es von Antigenpräsentierenden-Zellen (APZ), wie den Langerhans- oder dendritischen Zellen, nach Einwanderung in die drainierenden Lymphknoten naiven T- Zellen präsentiert. Daraufhin differenzieren diese T-Zellen unter dem Einfluss von Interleukin-4, 5 und 13 zu T-Helfer (Th)-2-Zellen. Durch die Interleukine 4 und 13 werden B-Zellen zur Produktion von Antikörpern aktiviert und führen schließlich

zu einem Ig (Immunglobulin)-Klassenwechsel von IgM zu spezifischen IgE-Antikörpern gegen das Allergen (Ozdemir et al., 2011).

Spezifische IgE-Antikörper werden über den IgE-Rezeptor (FcεRI) an Mastzellen sowie basophile und eosinophile Granulozyten gebunden. Bei einem erneuten Allergenkontakt mit einer mit IgE-Antikörpern beladenden Mastzelle, kommt es zu einer Quervernetzung der Antikörper. Dadurch wird eine Signalkaskade freigesetzt, welche eine Degranulation von Mediatoren wie Histamin, Serotonin, Prostaglandinen, Heparin, PAF und SRS-A bewirkt und das typische, klinische Erscheinungsbild einer allergischen Reaktion hervorruft (Suerbaum et al., 2009).

1.1.3. Klinisches Bild

Das klinische Bild kann sich mannigfaltig präsentieren. Es werden gesteigerte lokale von systemischen Reaktionen unterschieden. Gesteigerte lokale Reaktionen zeigen sich häufig als Rötung und Schwellung um die betroffene Einstichstelle, die >10 cm im Durchmesser sind, länger als 24h persistieren und eine begleitende, nichtinfektiöse Lymphanginitis hervorrufen können.

Systemische Reaktionen sind definiert als Allgemeinreaktionen ohne örtlichen Zusammenhang zur Einstichstelle. Eine Anaphylaxie stellt hierbei das fulminanteste Ausmaß dar und wird als Folge auf einen einzelnen Stich durch Reaktion der IgE-Antikörper des Patienten gewertet (Przybilla et al., 2012). Die Anaphylaxie kann nach Ring und Messmer (2021) in vier Schweregrade eingeteilt werden (Tabelle 1). In allen Schweregraden zeigen Patienten Symptome wie Juckreiz, Flush, Urtikaria oder ein Angioödem. In höheren Schweregraden kommen abdominelle, respiratorische und kardiovaskuläre Komplikationen hinzu bis hin zu einem Kreislauf- und Atemstillstand (Ring et al., 2021).

Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade einer Anaphylaxie (modifiziert nach Ring et al., 2021)

Schweregrad	Haut	Abdomen	Respirationstrakt	Herz-/Kreislauf
I	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	nicht betroffen	nicht betroffen	nicht betroffen
II	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Nausea Krämpfe	Rhinorrhoe Dysphonie Dyspnoe	Tachykardie (Anstieg>20/min) Hypotension (Abfall>20mmHg sys.) Arrhythmie
III	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Erbrechen Defäkation	Bronchospasmus Larynxödem Zyanose	Schock
IV	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Erbrechen Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

1.2. Diagnostik der Hymenopterengiftallergie

Die Diagnostik der Hymenopterengiftallergie verfolgt das Ziel dem Patienten die bestmögliche Therapie offerieren zu können. Beginnend mit einer klinischen Einteilung der Stichreaktion und der Eruiierung des individuellen Anaphylaxie-Risikos mit Hilfe von Anamnese und Hauttestung, folgt im Anschluss bei einer systemischen Reaktion die Suche nach spezifischen IgE-Antikörpern, um eine Sensibilisierung des Patienten detektieren zu können. Bei einer fehlenden systemischen Reaktion sollten allergologische Tests unterbleiben. Aufgrund einer hohen Sensibilisierungsrate innerhalb der Bevölkerung von bis zu 42%, haben positive Testergebnisse im Sinne einer klinisch stummen Sensibilisierung keine therapeutische Konsequenz und wirken lediglich verunsichernd (Blank et al., 2019; Schäfer et al., 1996)

1.2.1. Anamnese

Mit Hilfe der Anamnese sollen möglichst schnell relevante Informationen des Patienten zusammengetragen werden. Wesentliche Aspekte hierbei sind Datum und Anzahl der Stiche, aufgetretene Symptome sowie der zeitliche Ablauf des Sticheignisses. Zudem sollte die Art des reaktionsauslösenden Insekts, Risikofaktoren für das erneute Auftreten solcher Reaktionen und das individuelle Anaphylaxie-Risiko abgeklärt werden (Bilo et al., 2005). Um eine Differenzierung zwischen Biene und Wespe zu ermöglichen, kann es hilfreich sein dem Patienten Fotos vorzulegen und gemeinsam die Umstände des Sticheignisses zu besprechen. Die Biene ist im Gegensatz zur Wespe ein eher

friedliches Insekt, welches vorwiegend in der Nähe von Bienenstöcken, Blüten und Klee vorkommt und nach dem Stich den Stachel in der Haut zurücklässt (Przybilla et al., 2012). Anamnestisch sollten folgende Risikofaktoren abgeklärt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht zu Risikogruppen, die einer häufigen Exposition unterliegen und Risikofaktoren für eine Anaphylaxie (modifiziert nach Przybilla et al., 2012)

Risikogruppen für eine häufige Exposition
- Personen mit intensiver Ausübung von Aktivitäten im Freien wie Klettern, Hobbygärtnern etc.
- Imker/-in, Familienangehörige von Imker/-innen, Nachbarn von Imker/-innen
- Personen mit beruflicher Exposition wie Obst- oder Bäckereiverkäufer/-in, Förster/-in, Jäger/-in, Gärtner/-in, Feuerwehrmann/-frau, Landwirt/-in etc.
Risikofaktoren für eine Anaphylaxie
- Alter > 40 Jahre
- Vorerkrankungen: kardiovaskuläre Erkrankungen, Asthma, Mastozytose
- Anamnese: Anaphylaxie > Grad II mit Bronchokonstriktion (nach Ring u. Messmer) in der Vorgeschichte, körperliche und psychische Belastungssituation
- Serum-Tryptasekonzentration > 11,4 µg/L

1.2.2. Hauttests

Hauttests stellen nach Anamnese und Inspektion den nächsten diagnostischen Schritt dar. Es wird der Pricktest von einem Intradermaltest unterschieden. Der Intradermaltest kommt erst bei ausbleibender Pricktestreaktion zum Einsatz (Przybilla et al., 2012). Hauttests sollten mit einem Mindestabstand von zwei Wochen nach Stichereignis durchgeführt werden (Müller, 1990). Aufgrund einer gegebenenfalls längeren Refraktärphase sollte der Test bei negativem Ergebnis und positiver Anamnese einer systemischen Reaktion nach 1- 2 Monaten wiederholt werden (Bilo et al., 2005).

Der Pricktest wird mit Wespen- oder Bienengift sowie Positiv- (Histamin) und Negativkontrollen (Kochsalzlösung) durchgeführt. Es werden Giftkonzentrationen von 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml zur Ermittlung der Reaktionsschwelle auf die Haut des Patienten appliziert und die Haut mit einer Lanzette leicht angestochen. Das Ergebnis kann nach 20 Minuten abgelesen werden. Bei einem Intradermaltest wird Bienengift in einer Konzentration von 0,001/ 0,01/ 0,1 µg/ml oder 1,0 µg/ml verwendet (Przybilla et al., 2012).

1.2.3. In-vitro Tests

Im Fokus der In-Vitro Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie steht der Nachweis von spezifischen IgE- (sIgE) Antikörpern im Serum (Przybilla et al., 2012). Dieser sIgE-Nachweis kann mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen, als Beispiel sei das ImmunoCAP-Verfahren genannt. Alle Methoden erfolgen nach dem gleichen Funktionsprinzip. An spezifische Allergenkonzentrate oder rekombinante Allergene, die auf einer Matrix gebunden sind, binden Immunglobuline aus dem Serum der Patienten. Ungebundene Immunglobuline werden abgewaschen und es folgt eine Inkubation mit Fluoreszenz-markierten oder Enzym-gekoppelten Anti-IgE-Antikörpern, welche im Anschluss mittels Bestimmung der Fluoreszenzintensität oder nach Zugabe eines Substrates mittels Messung der Farbreaktion quantifiziert werden können (Renz et al., 2010). Aufgrund methodenbedingt unterschiedlicher Ergebnisse ist die Methode anzugeben, da Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit der jeweiligen optischen Auswertung variieren. Ergebnisse des IgE-Antikörpertests werden ab einer Antikörperkonzentration $>0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$ als „positiv“ gewertet (CAP-Klasse 1 oder äquivalenter Befund). Die sIgE-Konzentration kann Tage bis Wochen nach Antigenexposition deutlich ansteigen. Eine erneute Testung kann in den ersten Wochen nach dem Stichereignis hilfreich sein.

Bleibt der Nachweis einer Sensibilisierung erfolglos, kann in einem weiteren Schritt die Bestimmung der sIgE-Antikörper gegen Einzelallergene von Bedeutung sein (Jakob et al., 2017). Bei der Bienengiftallergie stehen neben dem Nachweis von sIgE-Antikörpern gegen Api (Apis) m 1, die Detektion der sIgE- Antikörper gegen die Allergene Api m 3, Api m 4 und Api m 10 zunehmend im Fokus und führen zu einer Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Testverfahren (Köhler et al., 2014).

Alternativ können bei fehlendem Nachweis einer Sensibilisierung mittels Antikörperbestimmung zelluläre Untersuchungen, wie der Basophilenaktivierungs-, der Leukotrienfreisetzungs- oder der Histaminfreisetzungstest, zielführend sein. Aufgrund ihrer Komplexität sollten diese Tests in allergologischen Zentren erfolgen (Przybilla et al., 2012).

Abbildung 1 dient als schematische Darstellung zur Übersicht der Angriffspunkte diagnostischer Tests.

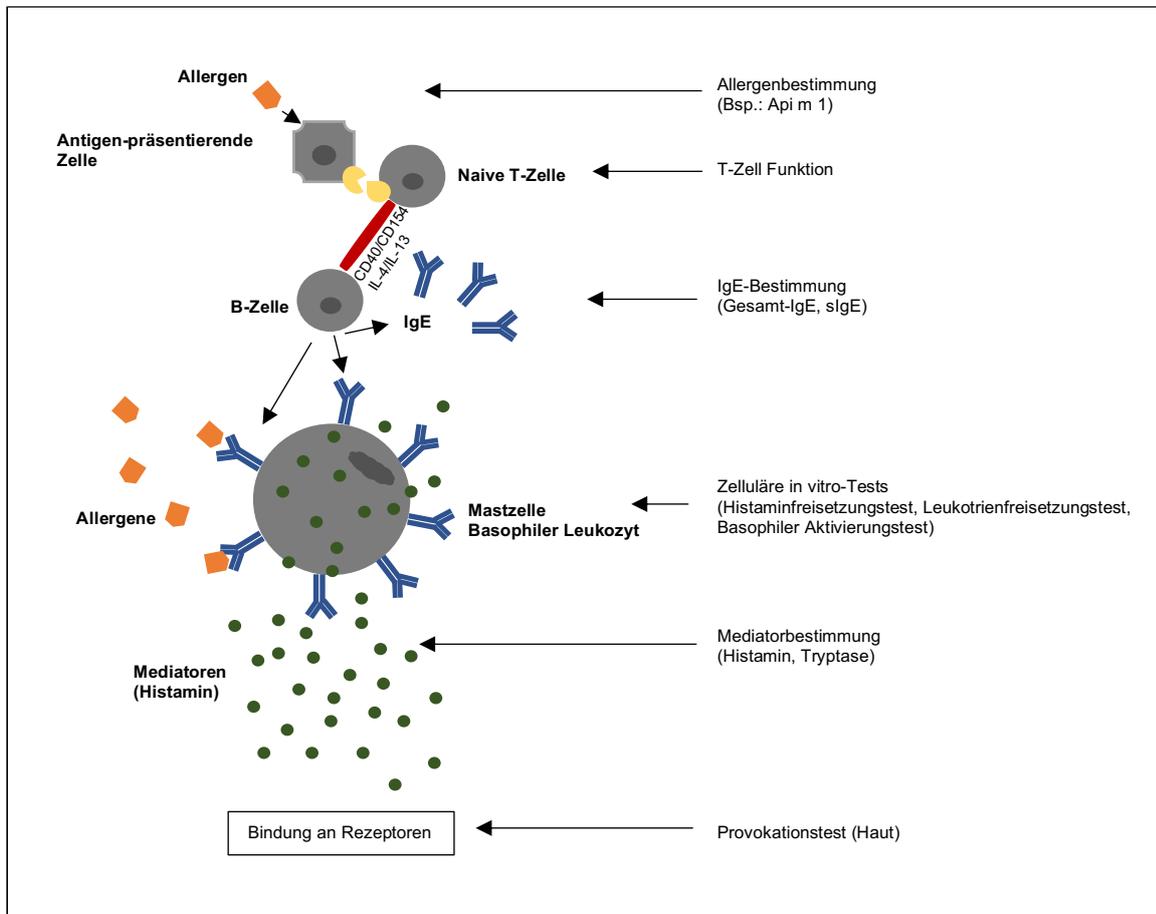


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Angriffspunkte diagnostischer Tests (modifiziert nach Renz et al., 2010)

1.3. Therapie

Die therapeutischen Möglichkeiten richten sich nach dem Ausmaß der allergischen Reaktion. Akute Reaktionen werden, je nachdem ob eine lokale oder systemische Reaktion vorliegt, differenziert behandelt. Bei einer langfristigen Therapie steht die spezifische Immuntherapie im Fokus sowie allgemeine Präventions- und Verhaltensmaßnahmen bei einem Stich.

1.3.1. Therapie der akuten Reaktion

1.3.1.1. Lokale Reaktionen

Lokale Reaktionen werden mit einem potenten topischen Glukokortikoid in Kombination mit kühlen, feuchten Umschlägen zur Symptomlinderung behandelt. Zusätzlich kann ein orales H1-Antihistaminikum gegeben werden. Kommt es zu einer gesteigerten, lokalen Reaktion kann eine kurzfristige, systemische Glukokortikoidgabe per os (0,5- 1 mg Prednisolonäquivalent/kg Körpergewicht) notwendig werden.

Gesteigerte, lokale Reaktionen im Kopf-/Halsbereich sollten nachbeobachtet werden, um im Falle einer Verlegung der Atemwege schnell symptomorientiert handeln zu können (Przybilla et al., 2012).

1.3.1.2. Systemische Reaktionen

Die Therapie einer anaphylaktischen Reaktion sollte leitliniengerecht erfolgen (Ring et al., 2021).

Neben einer forcierten medikamentösen Therapie haben Allgemeinmaßnahmen einen hohen Stellenwert.

Nach Unterbrechung der Allergen Zufuhr ist eine situationsgerechte Lagerung des Patienten von Bedeutung. Generell empfiehlt die Leitlinie eine flache Lagerung, bei einer eingeschränkten Bewusstseinslage und intaktem Kreislauf ist die stabile Seitenlage anzuwenden, wohingegen bei einer hämodynamisch instabilen Situation die Trendelenburg-Lagerung mit angehobenen Beinen Hilfe verschaffen kann. Ist das führende Symptom eine Atemnot, sollte die halbsitzende Lagerung bevorzugt werden. Die weitere Therapie ist abhängig vom jeweiligen Anaphylaxie Grad, wie sie unter 1.1.3. beschrieben sind.

In allen Schweregraden sollte ein intravenöser oder notfalls intraossärer Zugang gelegt und bei einer drohenden bronchialen Obstruktion die Atemwege gesichert werden. Im Notfall kann eine endotracheale Intubation oder Koniotomie erforderlich werden. Bei einer fehlenden Herz-Kreislauffunktion sollte eine umgehende kardiopulmonale Reanimation ggf. mit Defibrillation erfolgen.

Die medikamentöse Therapie sollte sich ebenfalls nach dem Schweregrad der Anaphylaxie richten. Folgende Medikamente haben sich in der Praxis bewährt: Adrenalin intramuskulär/ intravenös/ inhalativ oder andere vasoaktive Substanzen, H1-Antihistaminika, Glukokortikoide, Sauerstoff inhalativ und/oder inhalative β_2 -Sympathomimetika sowie Medikamente zur Volumensubstitution wie beispielsweise Elektrolytlösungen. Im Anschluss an die Erstmaßnahmen kann eine weitere intensivmedizinische Behandlung erforderlich werden (Ring et al., 2021).

1.3.2. Langfristige Therapie

1.3.2.1. Verhaltensmaßnahmen

Nach einer allergischen Reaktion auf einen Insektenstich soll der Patient über Verhaltensmaßnahmen aufgeklärt werden. Zu diesen zählen exemplarisch der Verzicht auf Speisen und Getränke im Freien sowie Obst- und Blumenpflücken, Barfußlaufen oder hektische Bewegungen bei einem Angriff von Bienen oder Wespen. Dem Patienten

sollte zur Selbstbehandlung bei einem erneuten Stich ein Notfallset verordnet werden. Dieses Set beinhaltet ein H1-Antihistaminikum, ein orales Glukokortikoid, einen Adrenalin-Autoinjektor zur muskulären Applikation sowie bei entsprechenden Vorerkrankungen mit obstruktiver Komponente ein β_2 -Sympathomimetikum zur Inhalation. Zudem sollte mit dem Patienten die Benutzung des Autoinjektors geübt werden.

Kommt es trotz präventiver Maßnahmen dennoch zu einem Stichereignis, gilt es zunächst Ruhe zu bewahren und Menschen in der Umgebung über den Stich und eventuelle Folgen zu informieren. Ein steckengebliebener Stachel muss unverzüglich entfernt und bei auftretenden Symptomen das verordnete Antihistaminikum sowie Glukokortikoid aus dem Notfallset nach ärztlicher Anweisung angewandt werden. Bei Dyspnoe, einer beginnenden Schwellung im laryngopharyngealen Bereich oder kardiovaskulären Beschwerden sollte die Injektion von Adrenalin erfolgen und ein inhalatives β_2 -Sympathomimetikum verwendet werden (Przybilla et al., 2012).

1.3.2.2. Spezifische Immuntherapie (SIT)

Die spezifische Immuntherapie stellt die einzige, präventive Behandlung zur Vermeidung weiterer Reaktionen nach einem Stichereignis dar (Sturm et al., 2018). Neben der protektiven Wirkung der SIT konnte eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität detektiert werden (Roesch et al., 2008)

Indikationen für eine SIT mit Bienen- oder Wespengift bei Erwachsenen sind ein Anaphylaxie Grad \geq II oder ein Schweregrad $>$ I bei Patienten mit Risikofaktoren oder einer eingeschränkten Lebensqualität durch die Insektengiftallergie. Des Weiteren muss vor Beginn der Therapie eine Sensibilisierung gegen das Insektengift mittels Hauttests, sIgE-Nachweis im Serum oder positiven Zusatzuntersuchungen (Basophilenaktivierungstest, Leukotrien- oder Histaminfreisetzungstest) nachgewiesen worden sein.

Kontraindiziert ist eine SIT temporär bei einem grippalen Infekt, bei unzureichend eingestelltem Asthma bronchiale, nach Impfung oder bei einer Non-Compliance des Patienten. Bei aktiven malignen Neoplasien sowie Autoimmunerkrankungen sollte die SIT gemeinsam mit dem Patienten unter einer Nutzen-Risiko-Abwägung diskutiert werden (Sturm et al., 2018).

Wirkmechanismus der SIT

Der Effekt der SIT basiert auf verschiedenen Mechanismen. Unter SIT kommt es zu einer erheblichen Vermehrung von regulatorischen T-Zellen, welche unter anderem durch die gesteigerte Produktion von IL-10 Th-2-Zellen inhibieren. Außerdem werden

mehr blockierende IgG1- und IgG4-Antikörper gebildet, welche die IgE-abhängige Reaktion auf Mastzellen, Basophilen und B-Zellen hemmen. Gemeinsam führen die genannten Mechanismen zu einer langfristigen Immuntoleranz und inhibieren eine überschießende Immunantwort (Kleine-Tebbe et al., 2012; Mamessier et al., 2006; Nakagawa et al., 1985).

Durchführung

Die Durchführung einer SIT erfolgt als subkutane Injektion mit wässrigen Allergenzubereitungen und an Aluminiumhydroxid adsorbierte Depotpräparate. Die Dosis wird bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis von 100 µg Gift stetig aufdosiert. Die Aufdosierung kann nach verschiedenen Protokollen erfolgen.

Eine Schnellhyposensibilisierung läuft im stationären Setting ab und kann nach dem Rush-Protokoll, bei dem die Erhaltungsdosis nach wenigen Tagen erreicht wird, oder dem Ultra-Rush Protokoll, bei dem die Erhaltungsdosis innerhalb von Stunden erreicht wird, erfolgen. Eine konventionelle SIT erfolgt im ambulanten Setting, die Erhaltungsdosis wird hierbei nach Wochen bis Monaten erreicht. Die Wirksamkeit der SIT ist primär von der Erhaltungsdosis und weniger von dem jeweilig befolgten Protokoll abhängig. In der Klinik ist die Dosissteigerung nach der Schnellhyposensibilisierung die Therapie der Wahl und ist bei Patienten nach Anaphylaxie zwingend durchzuführen.

Die Standarderhaltungsdosis liegt bei 100 µg des Giftes (Przybilla et al., 2012). An die Steigerungsphase schließt sich die Erhaltungsphase an, in der alle vier bis sechs Wochen ambulant Allergenzubereitungen injiziert werden. Die Erhaltungstherapie sollte bei Insektengiftallergikern mit hohem Risiko fünf Jahre bis lebenslang fortgeführt werden, da gezeigt wurde, dass bei Abbruch der Therapie bei bis zu 15% der Patienten die protektive Wirkung innerhalb von fünf bis zehn Jahren verloren gegangen ist (Kleine-Tebbe et al., 2012; Golden et al., 2000).

Zur SIT können therapeutische Giftpräparate verschiedener Firmen und unterschiedlicher Zusammensetzung angewandt werden (Blank et al., 2017), eine Übersicht der geläufigsten Präparate ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der weltweit zur spezifischen Immuntherapie zugelassenen, therapeutischen BG-Präparate. Gekennzeichnet ist zudem, ob ein Api m 10 Nachweis in den Präparaten erfolgt ist (nach Blank et al., 2017).

Präparat	Hersteller	Api m 10 Nachweis
Venomil	Allergy Therapeutics, Worthing, United Kingdom	✓
Reless (Pharmalgen)	ALK- Abelló, Hamburg, Deutschland	✓
ALK lyophilisiert SQ (Aquagen SQ)	ALK- Abelló, Hamburg, Deutschland	✗
Venomenhal	HAL Allergy, Leiden, Niederlande	✓

Therapiekontrolle

Eine Verlaufskontrolle der Therapie mit Hilfe von laborchemischen Parametern ist derzeit nicht möglich (Przybilla et al., 2012). In der Literatur wird beschrieben, dass ein Anstieg der IgG-Antikörper im Serum unter Therapie stattfindet (Kleine-Tebbe et al., 2012). Die Wirksamkeit der SIT kann nur mittels Stichprovokation überprüft werden. Stichprovokationen sollten sechs bis acht Monate nach Erreichen der Erhaltungsdosis im stationären Rahmen erfolgen und von einem intensivmedizinischen Team begleitet werden. Kommt es zum Auftreten einer systemischen Reaktion, gilt die Therapie als misslungen (Przybilla et al., 2012).

1.4. Humorale Immunantwort der Bienengiftallergie

Die humorale Immunantwort definiert die Produktion von Antikörpern (Immunglobuline) durch B-Lymphozyten und die anschließende Sekretion in das Blut. Antikörper bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die mit Disulfidbrücken verbunden sind. Es werden fünf verschiedene Antikörperklassen unterschieden: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Antikörper werden in ein Fc (*constant fragment*) und ein Fab (*fragment of antigen binding*) eingeteilt. Das Fc-Stück kann bei IgG und IgM das Komplementsystem aktivieren oder bei IgE-Antikörpern eine Bindung mit Mastzellen eingehen. Das Fab-Stück ist für die Antigenpezifität eines Antikörpers verantwortlich und kann eine Bindung mit dem Antigen eingehen. Antigenbindungsstellen sind sehr variable Bereiche und sind entscheidend für die Spezifität des Antikörpers. Nach einem Erstkontakt mit einem Antigen, steigen die Antikörper nach einer Latenz von etwa 10 Tagen im Serum an, anschließend kommt es zu einem Abfall des Antikörpertiters. Primäre Antikörper gehören der IgM-Klasse an. Bei einem Zweitkontakt mit dem Antigen steigt der Serumantikörpertiter rapide an, es überwiegen dann Antikörper der IgG-Klasse

(Kaufmann, 2014). Aufgrund der Relevanz der Immunglobuline IgE und IgG für diese Arbeit werden diese im Folgenden weiter erläutert.

1.4.1. Immunglobulin E

IgE-Antikörper machen einen sehr geringen Teil im Serum aus, da sie größtenteils gebunden über den Fcε-Rezeptor auf Mastzellen oder eosinophilen Granulozyten vorliegen. Sie verleihen den Zellen dadurch eine gewisse Antigenspezifität. IgE-Antikörper spielen neben der Abwehr von Parasiten und Würmern bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp eine entscheidende Rolle (Bröker et al., 2019).

1.4.2. Immunglobulin G

IgG-Antikörper stellen die biologisch wichtigste Antikörperklasse dar und machen einen Anteil von 75% des Gesamt-Ig aus. Sie kommen neben dem Serum auch in anderen Körperflüssigkeiten vor. IgG-Antikörper lassen sich beim Menschen in die Subklassen IgG1 bis IgG4 weiter unterteilen (Kaufmann, 2014). Mit etwa drei Wochen hat IgG die längste Halbwertszeit der Immunglobuline. Die zentrale Funktion der IgG-Antikörper ist die Neutralisierung von Antigenen, durch sie wird die Bindung des Antigens an seine Zielstruktur blockiert, sodass toxische Wirkungen verhindert werden (Bröker et al., 2019). Sie hemmen die IgE-vermittelte Degranulation von Basophilen und Mastzellen sowie die Allergenpräsentation an T-Zellen. Diese Funktion ist bei der Abwehr des Bienengiftes von Bedeutung.

Im Rahmen der Therapie spielt IgG4 eine wichtige Rolle. In der Literatur wird beschrieben, dass eine klinisch wirksame spezifische Immuntherapie mit einem Anstieg allergenspezifischer IgG4-Antikörper einhergeht (Hofmaier et al., 2014). Die Verwendung dieser Antikörper als Biomarker für eine Vorhersage des klinischen Ansprechens auf die SIT wird jedoch bislang nicht empfohlen (Shamji et al., 2011).

1.5. Molekulare Bienengiftallergiediagnostik

Aufgrund der in den letzten Jahren erfolgten Fortschritte der Charakterisierung des Bienengifts und des allergischen Sensibilisierungspotentiales einzelner Giftkomponenten, konnten zunehmend individuelle Sensibilisierungsprofile erstellt, therapeutische Interventionen angepasst sowie Therapieverläufe verfolgt werden. Mit Hilfe der Forschung konnte in der Vergangenheit neben den Majorallergenen ein molekulares Verständnis des gesamten Bienengiftes entwickelt und somit zusätzliche Allergene identifiziert werden (Köhler et al., 2014; Spillner et al., 2014)

Die Diagnostik einer Bienengiftallergie mittels Gesamtextrakten ist aufgrund von IgE-Kreuzreaktivitäten zwischen Hymenoptereingiften erschwert. Es zeigt sich oftmals eine

doppelte Positivität gegenüber Biene und Wespe, sodass eine Unterscheidung zwischen einer echten Doppelsensibilisierung und einer IgE-Kreuzreaktivität schwerfällt. In einer Studie im Südwesten Deutschlands zeigten 45-50% der Patienten eine doppelte Positivität. Ursächlich für eine Kreuzreaktivität können gemeinsame Proteinepitope homologer Allergene beider Gifte sein, wie sie für Hyaluronidasen, Dipeptidylpeptidasen und Vitellogenin-Allergene beschrieben wurden (Spillner et al., 2014). Ein weiterer Grund können kreuzreagierende Kohlenhydratseitenketten (kurz: CCD, *cross-reactive carbohydrate determinants*) sein, da IgE-Antikörper gegen den alpha-1,3-Fucose Rest des N-Glykan-Kerns gerichtet sein können (Jappe et al., 2006). Solche CCD-Epitope sind hoch immunogen und können zu einer IgE und IgG Induktion führen. Patienten mit CCD-spezifischem IgE zeigen keine klinisch relevanten allergischen Reaktionen, erschweren allerdings die Allergiediagnostik (Spillner et al., 2014). Rekombinante Allergene (*r*), denen entweder das gesamte Kernglykan oder der 1,3-Fucose-Rest fehlt, zeigen eine hohe Zuverlässigkeit beim Nachweis einer Sensibilisierung gegenüber ihrer natürlichen Allergene (*n*) und genießen daher einen hohen Stellenwert in der Diagnostik der Bienengiftallergie (Seismann et al., 2010).

1.5.1. Bienengift- Einzelallergene

Mehr als 100 verschiedene Komponenten des Bienengiftes sind mittlerweile beschrieben (Van Vaerenbergh et al., 2014). Zu den bekanntesten Allergenen des Bienengiftes gehören die Phospholipase A₂, die Hyaluronidase und Melittin mit einem Trockengewicht von 12%, 2% und 50% (Spillner et al., 2014).

Eine IgE-Reaktivität gegen rApi m 1 und rApi m 2 konnte bei 72,9% bzw. 47,9% der Bienengift-Allergiker nachgewiesen werden. Bei rApi m 3, rApi m 4, rApi m 5 und r Api m 10 konnte eine Reaktivität von 50%, 22,9%, 58,3%, 61,8% der Bienengift- Allergiker detektiert werden (Köhler et al., 2014).

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Einzelallergene nach der WHO/IUIS Allergen Nomenklatur.

Tabelle 4: Übersicht der Einzelallergene des Bienengiftes *Apis mellifera* nach der WHO/IUIS Allergen Nomenklatur („WHO/IUIS Allergen Nomenclature Homepage“) mit Angaben des Trockengewichtes der Allergene (Burzyńska et al., 2021).

Allergen	biochemischer Name	Molekulargewicht (kDa)	Trockengewicht (%)
Api m 1	Phospholipase A ₂	16	12
Api m 2	Hyaluronidase	44	2
Api m 3	Saure Phosphatase	43	1-2
Api m 4	Melittin	3	50
Api m 5	Dipeptidylpeptidase IV	100	>1
Api m 6	Proteaseinhibitor	8	1-2
Api m 7	Serinprotease	39	>1
Api m 8	Carboxylesterase	70	>1
Api m 9	Carboxypeptidase	60	>1
Api m 10	Icarapin	50-55	>1
Api m 11	Major royal jelly protein	60 (1)	-
(1 und 2)	(MRJP 8/9)	65 (2)	-
Api m 12	Vitellogenin	200	-

1.5.2. Api m 10

Im Fokus der Arbeit steht das Einzelallergen Api m 10, das in dem folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

Das Majorallergen Api m 10, Icarapin, wurde erstmals 2005 identifiziert und als 204 Aminosäuren langes, kohlenhydratreiches Protein mit IgE-Bindung beschrieben (Peiren et al., 2005; Schmidt et al., 2005). 2009 erfolgte die Aufnahme in die WHO/IUIS Allergen Nomenklatur und kurze Zeit später der Nachweis einer hohen IgE-Reaktivität gegen das Protein, unabhängig einer CCD-Reaktivität, in einer größeren Kohorte von Imkern und Bienengift-Allergikern (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2023; Blank et al., 2011).

Es sind 11 verschiedene Api m 10-Varianten identifiziert worden, welche von einem Gen bestehend aus vier Exons codiert werden. Die Varianten Api m 10_1 und Api m 10_2 entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich um 12 Basenpaare. Eine Vielzahl der Isoformen zeigten keine IgE-Reaktivität, während die Varianten Api m 10_1 und Api m 10_2 die höchste IgE-Reaktivität aufwiesen.

Api m 10 wird in der Literatur als instabiles Protein beschrieben. Prognosen über die Sekundärstruktur für Api m 10_1 und Api m 10_2 zeigen große unstrukturierte Bereiche, sodass Tertiärstrukturen variabel dargestellt werden können und die dreidimensionale Struktur des Api m 10 bisher nicht bekannt ist (Jakob et al., 2020).

Trotz seines Anteils von weniger als 1% des Trockengewichtes des Bienengiftes stellt Api m 10 ein wichtiges BG-Allergen für diagnostische Tests und verbesserte

therapeutische Ansätze dar. Die Tatsache, dass bei Wespengift-Allergikern keine IgE-Reaktivität gegen Api m 10 festgestellt wurde, hat dazu geführt, dass Api m 10 in das Panel der speziesspezifischen Majorallergene des BG aufgenommen wurde (Blank et al., 2011; Jakob et al., 2020).

In einer weiteren Studie wurde die klinische Relevanz beschrieben. Bei einer fehlenden Präsenz von Api m 10 in SIT-Therapeutika ist eine dominante Sensibilisierung gegen Api m 10 mit einem erhöhten Risiko für ein Therapieversagen assoziiert. Eine Api m 10 Sensibilisierung konnte bei 72% der Patienten (83/115) detektiert werden (Frick et al., 2016). Andere Studien zeigten eine Sensibilisierungsrate von 35% (66/189) und 55% (60/110) der Bienengift-Allergikern (Arzt et al., 2017; Vachová et al., 2018).

1.6. Epitopkartierung

Ein Epitop ist als die Struktur eines Antigens definiert, an die Antikörper binden. Es kann aus verschiedenen Stoffgruppen bestehen, zum Beispiel einfache Zucker, organische Ringstrukturen, sechs bis acht Aminosäuren oder Peptide (Kaufmann, 2014). Die Bindung von Epitop und Antikörper beruht auf physikochemischen Wechselwirkungen und ist reversibel. Die Antikörperbindung ist hochspezifisch, sodass schon kleinere Veränderungen des Epitops eine starke Abnahme der Affinität bedeuten können (Bröker et al., 2019). Die Epitopkartierung verfolgt das Ziel die relevantesten Epitope eines Antigens zu identifizieren, um sie für die Entwicklung einer Epitop-basierten Diagnostik und der Produktion von Impfstoffen verwenden zu können (Gershoni et al., 2007).

In dieser Arbeit geht es um die Epitopkartierung der B-Zellen, die von der T-Zell-Epitopkartierung unterschieden wird. B-Zell-Epitope lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: lineare und konformationelle Epitope. Lineare Epitope bestehen aus aufeinanderfolgenden Peptiden, während konformationelle Epitope aufgrund der Faltung des Proteins diskontinuierlich sind (Van Regenmortel, 2009). Die überwiegende Mehrheit der B-Zell-Epitope ist konformationell und deutlich schwieriger zu kartieren, da hierfür eine dreidimensionale Darstellung der Proteine erforderlich ist und die Isolation der Epitope aus dem Protein eine große Herausforderung darstellt.

Lineare B-Zell-Epitope bestehen aus Peptiden, die als Ersatz für Antigene bei Immunisierungen dienen können oder in der Antikörperproduktion Verwendung finden. Aus diesem Grund sind sie zunehmend in den Fokus der Wissenschaft gelangt (Sanchez-Trincado et al., 2017).

Es gibt verschiedene Methoden lineare B-Zell-Epitope detektieren zu können. Physikalische Methoden, wie die Kryo-Elektronenmikroskopie, oder computerbasierte Methoden wurden lange Zeit zur Epitopkartierung genutzt. Parallel dazu fanden bindungsspezifische Assays, wie der ELISA oder Western Blot, zunehmend

Verwendung sowie eine ortsgerichtete Mutagenese. Der Einsatz der jeweiligen Methode ist abhängig von den zu untersuchenden Daten (Ahmad et al., 2016).

Vorherige Studien haben Epitope des Wespen- und Bienengiftes analysiert. 2007 wurde erstmals ein B-Zell-Epitop für Api m 2 anhand der Kristallstruktur von Api m 2 im Komplex mit dem spezifischen Fab-Fragment eines monoklonalen murinen Anti-Hyaluronidase-IgG1-Antikörper identifiziert (Padavattan et al., 2007). Ein brasilianisches Forschungsteam untersuchte potenzielle B-Zell-Epitope für das Antigen 5 aus dem Gift von *Polybia paulista* und beschrieb jeweils ein Epitop für IgE und eines für IgG Antikörper. Methodisch wurden zunächst mit Hilfe der SPOT-Methode 66 Peptide, die eine Überlappung von 11 Aminosäuren aufwiesen, synthetisiert und gegen fünf Serumproben von Ves v 5-sensibilisierten Patienten auf ihre IgE- und IgG-Reaktivität getestet. Die Bestätigung der Ergebnisse erfolgte mittels indirektem ELISA (Aparecido dos Santos-Pinto et al., 2015). In einer weiteren Studie wurden zwei Epitope für Api m 1 detektiert. Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung von 46 Peptiden mittels Biopanning. Die IgE-Reaktivität gegen die verschiedenen Peptide wurde mittels eines Immunoblot-Assay untersucht (Zahirović et al., 2019). Alle Studien haben die Verwendung eines bindungsspezifischen Assay zum Nachweis der Antikörperbindung an B-Zell Epitope gemeinsam.

Weitaus häufiger wurde die Epitopkartierung bereits im Bereich der Nahrungsmittelallergien angewandt. Für verschiedene Nussallergien beispielsweise konnten ähnliche Epitope identifiziert werden. Die detektierten Epitope von Pin p 1, einem Allergen der Pinienkernallergie, scheinen bedeutende Ähnlichkeiten mit den Epitopen von Ara h 2 und 6 der Erdnussallergie zu haben (Crespo et al., 2021). Aus diesem Grund wurden bereits viele Versuche unternommen, um die Methode der Epitopkartierung möglichst zu vereinfachen und zu optimieren. Im Rahmen dessen wurde ein Peptid-Microarray entwickelt, welcher bereits die Epitope der Allergene aus Erdnüssen, Milch, Eiern, Linsen, Garnelen und weiteren Lebensmitteln identifizieren konnte. Im Fokus steht hierbei die Möglichkeit mit geringem Probenaufkommen parallel viele Moleküle gleichzeitig untersuchen zu können. In einem ersten Schritt werden Peptid-Microarray-Objekträger gedruckt. Im Anschluss daran durchlaufen diese verschiedene Schritte zur Immunmarkierung und werden mit Hilfe einer Scanner-Software, welche die fluoreszierenden Signale misst, analysiert (Lin et al., 2017). Für die Allergene des Bienengiftes wurde eine solche Methode zuvor noch nicht angewandt. In der vorliegenden Studie konnte erstmals ein Macroarray zur Epitopkartierung eines BG-Allergens entwickelt und angewendet werden.

1.7. Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist es, die IgE und IgG Antwort auf das Einzelallergen Api m 10 näher zu untersuchen und damit ein besseres Verständnis zur Rolle dieses Allergens in der Bienengiftallergie zu erlangen.

Bisherige Studien haben Api m 10 als ein weiteres Majorallergen identifizieren können. In einer Kohorte von 144 Patienten konnte eine Sensibilisierung gegen Api m 10 bei 62% der Bienengift-allergischen Patienten nachgewiesen werden (Köhler et al., 2014). Api m 10 sensibilisierte Patienten haben aufgrund der Unterrepräsentation in vielen Giftpräparaten, welche bei der SIT Verwendung finden, ein höheres Risiko für ein Therapieversagen. Eine Induktion des Api m 10 spezifischen IgG4 unter Therapie konnte nur bei den Patienten gezeigt werden, die mit einem Giftpräparat therapiert wurden, in dem der Nachweis von Api m 10 erfolgte (Frick et al., 2016).

Mit Hilfe der B-Zell-Epitopkartierung soll in dieser Studie die humorale Immunantwort gegen Api m 10 charakterisiert werden. Im Fokus stehen hierbei die Immunglobuline IgE und IgG. Die Arbeit verfolgt das Ziel, dominante Epitope sowohl für das spezifische IgE als auch IgG gegenüber Api m 10 zu detektieren. Eine erfolgreiche Identifikation einzelner Epitope kann dazu führen, dass langfristig die Diagnostik und Therapie bei Bienengiftallergikern einfacher und effizienter gestaltet werden kann. Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich eine Induktion des spezifischen IgG gegen Api m 10 in der untersuchten Kohorte während der Immuntherapie zeigen lässt.

2. Fragestellungen

Die folgenden Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Lassen sich für Api m 10 dominante Epitope identifizieren, die für die humorale Immunantwort mit IgE- und IgG- Antikörpern bei Bienengift-Allergikern von Bedeutung sind? Wie viele Epitope lassen sich detektieren?
- Können Ähnlichkeiten der Epitope für IgE- und IgG-Antikörper festgestellt werden oder gibt es Überschneidungen der Epitope?
- In der Literatur wird beschrieben, dass es unter SIT zu einem Anstieg von IgG-Antikörper kommt. Frick et al. (2016) konnten diesen vermuteten Anstieg bei ihrem untersuchten Kollektiv nicht bestätigen aufgrund einer Unterrepräsentanz von Api m 10 in SIT- Therapeutika. Lässt sich in dieser Studie eine Induktion der IgG-Antikörper unter spezifischer Immuntherapie zeigen?
- Eignet sich der bisher zu diagnostischen Zwecken genutzte Macroarray der Firma *Macroarray Diagnostics GmbH* zur Epitopkartierung?

3. Material

3.1. Patientenmaterial

Serum	von Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Gießen Patienten der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Freiburg
CPDA-Plasma	von Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Gießen

3.2. Tests für die serologische Diagnostik

ALEX® Allergy Explorer-Kit	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien (Österreich)
----------------------------	--

3.3. Proteinantigene

Api m 10 (c=1,6 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala (Schweden)
------------------------	---

3.4. Chemikalien

Di-Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe (#8563.1)
DPBS Pulver	Applichem, (#A0964,9100)
Milchpulver	Carl Roth GmbH&Co.KG (#T145.2)
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt (#6329.100)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 95-97%	Carl Roth GmbH&Co.KG(#X944.1)
Tween 20	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe (#91271)

3.5. Puffer für den ELISA

Puffer	Zusammensetzung
Beschichtungspuffer	4,2 g NaHCO ₃ + 1,78 g Na ₂ CO ₃ + 500 ml H ₂ O → Lagerung bei 4°C; pH= 9,6
Blockierungspuffer	Milchpulver 4% (w:v) in DPBS (DPBS Pulver + voll entsalztes Wasser) → Lagerung bei 4°C; pH=6,5
Probenpuffer	Milchpulver 4% (w:v) in DPBS → Lagerung bei 4°C; pH=6,5

Konjugatpuffer	Milchpulver 4% (w:v) in DPBS → Lagerung bei 4°C; pH=6,5
Stopppuffer	2M H ₂ SO ₄ : 180 ml aqua dest. + 30 ml 96%ige H ₂ SO ₄
Waschpuffer	DPBS-T (DPBS + 0,05 % Tween 20) pH= 7,4

3.6. Reagenzien

ALEX® Sample Diluent (Alex Kit)	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich
ALEX® Substrate Solution (ALEX Kit)	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich
ALEX® Stop Solution (ALEX Kit)	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich
ALEX® Washing Solution (ALEX Kit)	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich
TMB Substrat Set (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	BioLegend, San Diego, CA, USA

3.7. Antikörper

Antikörper für Macroarray:

ALEX® Detection Antibody IgE (ALEX Kit)	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich
ALEX® Detection Antibody IgG (ALEX Kit)	Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich

Antikörper für ELISA:

Spezifität	Isotyp	Konjugat	Hersteller
IgG	Polyklonal	Goat	Thermo Fisher Scientific, USA (# 62-8420)

3.8. Verbrauchsartikel

384-Well (Kavernen)-Platten, Maxi Sorp	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Abdeckfolien für 384-Well-Platten	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Einmalzentrifugenröhrchen 15 ml	greiner Bio-One, Frickenhausen
Finntip Pipettenspitzen 50 µl	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Einmalreaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht

Pipettenspitzen
0,5- 5 ml Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Pipettenspitzen
20- 200 µl, 0,5- 10 µl VWR, Darmstadt

3.9. Geräte

-20°C Gefrierschrank Robert Bosch GmbH, Stuttgart

+4°C Kühlschrank Liebherr, Biberach an der Riß

ELISA-Reader Infinite M 200 TECAN Trading AG, Männedorf, Schweiz

Feinwaage SI-234 Denver Instrument, Göttingen

Finnpipette Mehrkanal
5- 50 µl Thermo Fisher Scientific, MA, USA

MADx ImageXplorer Macro Array Diagnostics GmbH (MADx),
Wien, Österreich

Magnetrührer Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schwabach

Magnetrührstäbe VWR, Darmstadt

Einkanalpipetten
2,5 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml Eppendorf, Hamburg

Shaker DOS-20S neoLab, Heidelberg

Vortexmixer Heidolph Reax 2000 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schwabach

Reservoir, unsteril Thermo Fisher Scientific, MA, USA

3.10. Software

GraphPad PRISM GraphPad Software, San Diego, CA, USA

Magellan™ Data Analysis Software TECAN Trading AG, Männedorf, Schweiz

Microsoft® Excel Microsoft, WA, USA

Microsoft® PowerPoint Microsoft, WA, USA

Microsoft® Word Microsoft, WA, USA
Raptor Analyse Software Macro Array Diagnostics GmbH (MADx),
Wien, Österreich

4. Methoden

4.1. Auswahl des Patientenkollektives

In die vorliegende Studie wurde ein Patientenkollektiv von 41 Patienten mit Bienengiftallergie aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Gießen und der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Freiburg eingeschlossen. Die Diagnose einer Bienengiftallergie basierte auf einer Kombination aus einer systemischen Stichreaktion in der Anamnese des Patienten, einem positiven Hauttest und dem Nachweis von spezifischem IgE gegen BG ($> 0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$ gemessen mittels ImmunoCAP).

Als Inklusionskriterium in dieser Studie galt neben einer Bienengiftallergie eine Konzentration des sIgE gegen Api m 10 gemessen im ImmunoCAP $\geq 0,35 \text{ kU}_A/\text{L}$.

Von dem untersuchten Kollektiv waren 16 Patienten weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 37 Jahre, die Altersspanne lag bei 9- 64 Jahren. Das spezifische IgE gegen Bienengift lag im Mittel bei $20,28 \text{ kU}_A/\text{l}$ gemessen mit Hilfe des ImmunoCAP.

Aus dem Universitätsklinikum Gießen wurden 9 Patienten mit Genehmigung der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen (Beschluss 218/16) in die Studie eingeschlossen. 32 Patienten der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Freiburg konnten mit Genehmigung der Ethikkommission der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Beschluss 390/12) untersucht werden. Es konnten Seren zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während SIT analysiert werden. Der Zeitraum zwischen erstem und letzterem Zeitpunkt lag zwischen einem bis vier Jahren. Nach erfolgter Einwilligung durch die Patienten zur Teilnahme an der Studie verliefen die weiteren Untersuchungen anonymisiert.

4.2. ImmunoCAP

Die Bestimmung der Gesamtmenge des sIgE gegen Api m 10 sowie des sIgG4 gegen Api m 10 im Serum der Patienten erfolgte mit Hilfe der Messgeräte Phadia 250 und Phadia 100 nach Herstellerangaben.

Die ermittelte Signalstärke wird als Aktivität in kU_A/l (IgE) bzw. mg_A/l (IgG4) angegeben. Die ermittelten Werte liegen hierbei zwischen $0,1 \text{ kU}_A/\text{l}$ und $100 \text{ kU}_A/\text{l}$ (IgE) bzw. $0 \text{ mg}_A/\text{l}$ und $30 \text{ mg}_A/\text{l}$ (IgG4). Werte, die über dem Cut-Off von $0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$ liegen, werden als positiv bezeichnet (IgE). Die Nachweisgrenze für antigenspezifische IgG4-Antikörper liegt laut Herstellerangaben bei $0,07 \text{ mg}_A/\text{l}$.

4.3. Macroarray

In einem ersten Schritt wurden das vorliegende Patientenkollektiv mit Hilfe eines Macroarray analysiert mit dem Ziel dominante Epitope für IgE und IgG zu identifizieren.

Tabelle 5: Demographische und klinische Daten des Patientenkollektivs für den Macroarray

IgE Macroarray	n=40
Alter Ø (Spannweite)	37 J. (9- 64 J.)
Geschlecht: weiblich (♀) / männlich (♂)	♀: 15 ♂: 25
Anaphylaxiegrad (I- IV) (Klassifikation nach Ring und Messmer)	I: 14 II: 19 III: 7 IV: 0
slgE Bienengift Ø (Spannweite)	19,37 kU _A /l (0,61-100,0 kU _A /l)
IgG Macroarray	n=12 <i>[12 Patienten à 2 Zeiträume]</i>
Alter Ø (Spannweite)	36 J. (15-64 J.)
Geschlecht: weiblich (♀) / männlich (♂)	♀: 3 ♂: 9
Anaphylaxiegrad (I-IV) (Klassifikation nach Ring und Messmer)	I: 5 II: 6 III: 1 IV: 0
slgG4 Bienengift Ø (Spannweite)	2,21 mg _A /l (0,04-10,7 mg _A /l)

Bei dem hier verwendeten Macroarray handelt es sich um eine modifizierte Variante, die in Kooperation mit dem Hersteller Macro Array Diagnostics GmbH (Wien, Österreich) entwickelt wurde. Im klinischen Alltag wird das Array System der Firma dazu verwendet die Konzentration von IgE gegen bestimmte Allergene, wie zum Beispiel von Nahrungsmitteln oder Insekten, zu quantifizieren, um somit Sensibilisierungen diagnostizieren zu können. Die Membran der Chips ist so konzipiert, dass Biotin-markierte Allergene auf der Oberfläche der Membran haften und Antikörper im jeweiligen Patientenserum an diese Allergene binden können. Mit Hilfe eines Enzym-markierten Detektionsantikörpers kommt es zu einem Farbumschlag des Substrates direkt an der Membran. Die Intensität der Färbung kann anschließend mit Hilfe des MADx ImageXplorers gemessen und mittels Raptor Analyse Software ausgewertet werden.

Zur Charakterisierung der linearen Api m 10 Epitope wurden zunächst synthetische 15-mer Peptide durch die Firma CASLO ApS (Lyngby, Dänemark) mit einer Überlappung von je 12 Aminosäuren hergestellt. Die Peptide decken die gesamte Aminosäuresequenz von Api m 10 ab (Tabelle 6). In einem weiteren Schritt erfolgte die Übersendung der Peptide an die Firma Macro Array Diagnostics GmbH zur Generierung eines speziell für diese Studie hergestellten Chips, auf dem die Api m 10-Peptide gekoppelt sind (Abbildung 2).



Abbildung 2: *Api m 10 Peptid Array (Firma Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Wien, Österreich. (1) Individueller Barcode des Chips, der mit Hilfe des MADx ImageXplorers gelesen und anschließend in der Raptor Analyse Software einem Patienten zugeordnet werden kann. (2) Auf der dargestellten Membran befinden sich gebunden Api m 10-Peptide und die rekombinanten Bienengift-Einzelallergene Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 10. Hier erfolgt die Zugabe der jeweiligen Patientenseren, des ALEX® Sample Diluents, der ALEX® Washing Solution, des ALEX® Detection Antibody sowie der ALEX® Stop Solution. (*) Exemplarisch markierter farblicher Punkt, welcher die Antikörperreaktivität mit dem jeweiligen Antigen anzeigt.*

Tabelle 6: Aminosäuresequenzen der 64 15-mer Peptide des Api m 10 mit einer Überlappung von je 12 Aminosäuren

PeptidNr.	Aminosäuresequenz	Peptid Nr.	Aminosäuresequenz
1	FPGAHDSDSKEERKN	33	VNWNKIPEGANTTST
2	AHDSDSKEERKNVDT	34	NKIPEGANTTSTTKI
3	EDSKEERKNVDTVLV	35	PEGANTTSTTKIIDG
4	KEERKNVDTVLVLPS	36	ANTTSTTKIIDGHVV
5	RKNVDTVLVLPSIER	37	TSTTKIIDGHVVTIN
6	VDTVLVLPSIERDQM	38	TKIIDGHVVTINETT
7	VLVLPSIERDQMMAA	39	IDGHVVTINETTYTD
8	LPSIERDQMMAATFD	40	HVVTINETTYTDGSD
9	IERDQMMAATFDFPS	41	TINETTYTDGSDDYS
10	DQMMAATFDFPSLSF	42	ETTYTDGSDDYSTLI
11	MAATFDFPSLSFEDS	43	YTDGSDDYSTLIRVR
12	TFDFPSLSFEDSDEG	44	GSDDYSTLIRVRVID
13	FPSLSFEDSDEGSNW	45	DYSTLIRVRVIDVRP
14	LSFEDSDEGSNWNWN	46	TLIRVRVIDVRPQNE
15	EDSDEGSNWNWNTLL	47	RVRVIDVRPQNETIL
16	DEGSNWNWNTLLRPN	48	VIDVRPQNETILTTV
17	SNWNWNTLLRPNFLD	49	VRPQNETILTTSVSE
18	NWNTLLRPNFLDGWY	50	QNETILTTSVSEADS
19	TLLRPNFLDGWYQTL	51	TILTTSVSEADSDVT
20	RPNFLDGWYQTLQSA	52	TTVSSEADSDVTTLPTL
21	FLDGWYQTLQSAISA	53	SSEADSDVTTLPTLI
22	GWYQTLQSAISAHMK	54	ADSDVTTLPTLIGKN
23	QTLQSAISAHMKKVR	55	DVTTLPTLIGKNETS
24	QSAISAHMKKVRREQM	56	TLPTLIGKNETSTQS
25	ISAHMKKVRREQMAGI	57	TLIGKNETSTQSSRS
26	HMKKVRREQMAGILSR	58	GKNETSTQSSRSVES
27	KVREQMAGILSRIPE	59	ETSTQSSRSVESVED
28	EQMAGILSRIPEQGV	60	TQSSRSVESVEDFDN
29	AGILSRIPEQGVVNW	61	SRSVESVEDFDNEIP
30	LSRIPEQGVVWNWNI	62	VESVEDFDNEIPKNQ
31	IPEQGVVWNWNIPEG	63	VEDFDNEIPKNQGDV
32	QGVVWNWNIPEGANT	64	FDNEIPKNQGDVLTATA

4.3.1. IgE Macroarray

Die Durchführung des Macroarray erfolgte unter Verwendung des ALEX® Kits und nach Anleitung des Herstellers. Zunächst wurde jedem Patienten ein Chip zugeordnet. Anschließend wurden je 400 µl des ALEX® *Sample Diluents* aus dem ALEX®-Kit in die Kassetten pipettiert und 100 µl des jeweiligen Patientenserums hinzugefügt. Es folgte die Inkubation der Kassetten auf dem Schüttler (zwei Stunden, 8 rpm) bei verschlossener, feuchter Inkubationskammer und bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde der erste Waschschrift durchgeführt mit 500 µl der ALEX® *Washing Solution* pro Kassette (5 min., 8 rpm), welcher zwei weitere Male wiederholt wurde. Im nächsten Schritt wurden je 500 µl ALEX® *Detection Antibody* in die Kassetten pipettiert und für 30 Minuten bei 8 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der nächste

Waschschrift, welcher weitere vier Mal wiederholt wurde. Für die Substratreaktion wurden je 500 µl der ALEX® *Substrate Solution* in die Kassetten pipettiert und für exakt 8 Minuten inkubiert, woraufhin die Zugabe von 100 µl der ALEX® *Stop Solution* folgte. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Arrays bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Am folgenden Tag wurden die Kassetten mit dem ImageXplorer aufgenommen und mit Hilfe der Raptor Analyse Software analysiert.

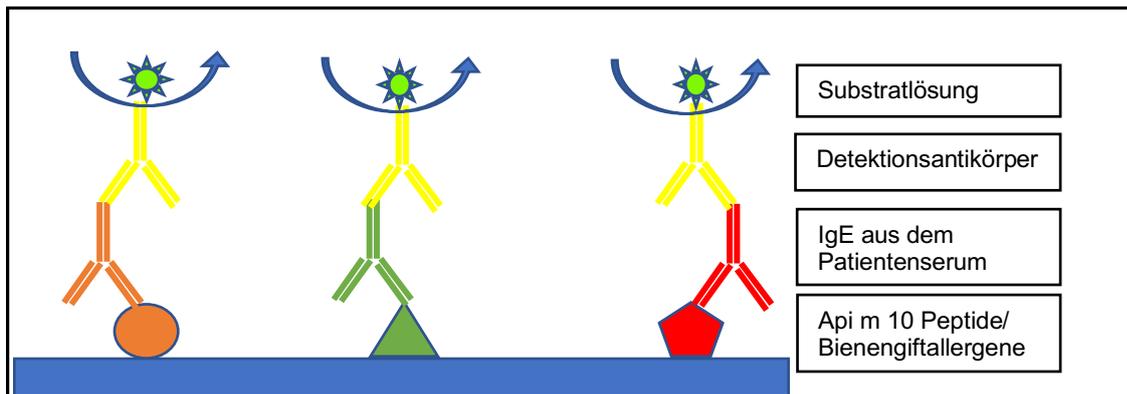


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Macroarray. Das blaue Rechteck stellt schematisch die Membran des Arraychips dar. Auf der Membran haften die verschiedenen Api m 10-Peptide sowie Bienengiftallergene. An diese binden die jeweiligen IgE Antikörper, welche sich im Patientenserum befinden. Mit Hilfe des Detektionsantikörper, welcher die gebundenen Antigen-Antikörper Komplexe markiert, können diese nach Zugabe der Substratlösung farblich visualisiert werden.

4.3.2. IgG Macroarray

Der Macroarray zur Untersuchung der Epitope für IgG erfolgte ebenfalls wie unter 4.3.1 beschrieben. Als Detektionsantikörper wurde ein Anti-IgG Antikörper verwendet, der von der Firma Macro Array Diagnostics GmbH (Wien, Österreich) für diese Arbeit optimiert wurde.

4.3.3. Inhibitionsassay

Für den Inhibitionsassay wurde das Serum eines Patienten vor Beginn der SIT ausgewählt (Patient 10). Es wurden zwei Kassetten parallel untersucht. Hierfür erfolgte die Herstellung zwei verschiedener Lösungen. Die erste Lösung wurde mit 20 µg Api m 10 (Konzentration 1,6 mg/ml) in 100 µl des Patientenserum für zwei Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die andere Lösung beinhaltete 100 µl des Patientenserums. Nach Ablauf der zwei Stunden wurden die beiden Lösungen auf jeweils eine Kassette aufgetragen. Im Anschluss daran wurde der Versuch wie unter 4.3.1 beschrieben fortgesetzt.

Zudem wurde ein Peptidinhibitionsassay mittels ImmunoCAP durchgeführt. Hierbei wurden die Seren von drei Patienten (Patient 10, 12, 13) jeweils mit steigenden Peptidkonzentrationen der Peptide 12 und 54 vorinkubiert.

Es wurden Peptidkonzentrationen von 1 µg/ml bis 100 µg/ml verwendet. Anschließend wurden die IgE-Reaktivitäten gegen Api m 10 mittels ImmunoCAP gemessen.

4.4. IgG ELISA

Zur Kartierung der IgG Epitope wurde im Anschluss an den Macroarray ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Der erste Schritt beinhaltete das Beschichten der 16x24 Kavernen (Well) ELISA Platten mit 100 µl des jeweiligen Peptides pro Kaverne. Die Peptide lagen in einer Konzentration von 5 µg/ml vor. Die Verdünnung erfolgte mittels Beschichtungspuffer. Als Positivkontrolle diente Api m 10 in einer Konzentration von 3,15 [ng/ml] ebenfalls verdünnt mit dem Beschichtungspuffer. Ebenso wurde eine Pufferkontrolle bestehend aus einer beschichteten Kaverne mit einem Peptid ohne Zugabe von Plasma untersucht. Die Platten wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde zu Beginn ein erster Waschschrift mit 100 µl Waschpuffer pro Kaverne durchgeführt, welcher weitere zwei Mal wiederholt wurde. Im Anschluss daran wurde die Platte mit 100 µl des Blockierungspuffers für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift für drei Minuten wurden je 50 µl des mit dem Probenpuffer verdünnten Plasmas (1:30, v:v) in jede Kaverne hinzugegeben und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, welcher dreimal für je zwei Minuten durchgeführt wurde. Anschließend wurden 100 µl des mit dem Konjugatpuffer in 1:2000 (v:v) verdünnten Sekundärantikörpers (Goat Anti-Human-IgG, Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben und die Platte wurde für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde die Platte erneut dreimal für je zwei Minuten gewaschen. 50 µl des TMB Substrates wurden in jede Kaverne pipettiert und die Reaktion mit 50 µl 2-molarer (M) Schwefelsäure abgestoppt. Mit Hilfe des ELISA Readers konnte im Anschluss die optische Dichte (OD) bei 450 nm bestimmt werden. Um eine Vergleichbarkeit der Platten generieren zu können, wurde jeweils eine Standardkurve aus der OD von Api m 10 in den Konzentrationen 1:3, 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, 1:10000, 1:30000 mit Plasma des Patienten 10 (jeweils v:v) hergestellt.

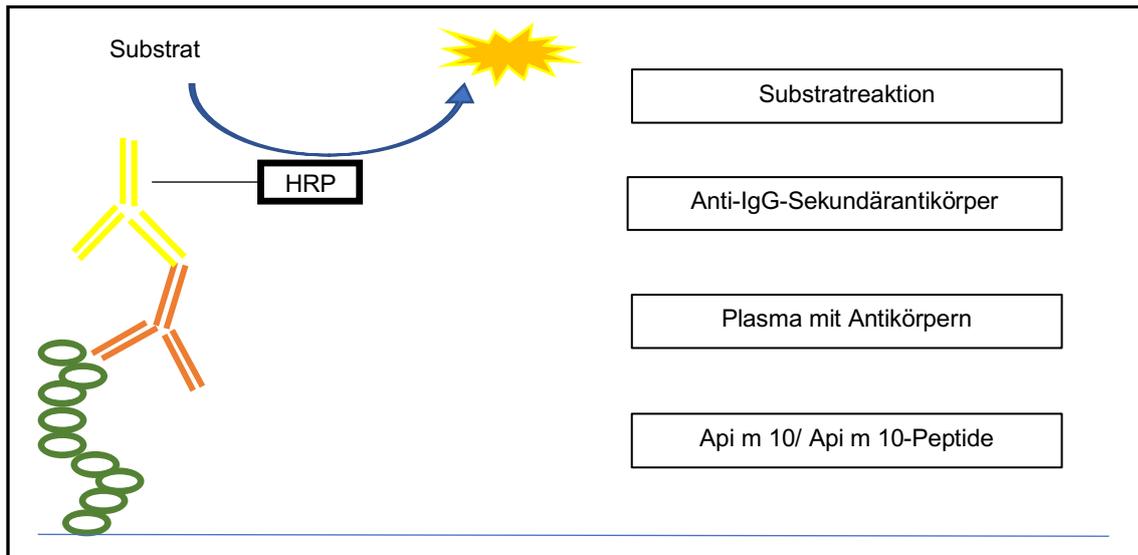


Abbildung 4: Schematische Darstellung des IgG ELISA. Die ELISA Platten werden zunächst mit einem Peptid oder Api m 10 beschichtet. An dieses Antigen binden spezifische IgG Antikörper aus dem Plasma der Patienten. Der Anti-IgG-Sekundärantikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, bindet an den Antigen-Antikörperkomplex. Nach Zugabe des Substrats TMB und des Stopppuffers kommt es zur schnellen Bildung eines gelben Endproduktes, dessen optische Dichte bei 450nm gemessen wird.

4.5. Statistik

Die graphische Darstellung und statistische Analyse erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 8. Für unabhängige Stichproben erfolgte die Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Gepaarte Stichproben wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert. Zur statistischen Überprüfung von Zusammenhängen wurde die Pearson-Korrelation angewandt und der Korrelationskoeffizient r berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Das Signifikanzniveau wurde graphisch in Form von Sternen dargestellt. Ein Stern beschreibt eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p <0,05$, zwei Sterne $p <0,01$, drei Sterne $p <0,001$ sowie vier Sterne $p <0,0001$.

Die graphische Darstellung der Korrelationen erfolgte als Punktdiagramm mit Ausgleichsgeraden. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse der IgE-Epitopkartierung mittels Macroarray wurden Balken- und Kreisdiagramme sowie Box-Whisker-Plots verwendet. Bei der graphischen Darstellung mit Hilfe des Box-Whisker-Plots stellt die Box die 25. und 75. Perzentile dar. Der durchgezogene Strich innerhalb der Box zeigt den Median, die vertikalen Linien die 5. und 95. Perzentile. Ausreißer werden als Punkte dargestellt.

Bei der Analyse der Daten zur IgG-Epitopkartierung mithilfe des Macroarray wurde zur graphischen Darstellung ebenfalls ein Box-Whisker-Plot angewandt. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Zeitpunkte wurde eine farbliche Kennzeichnung verwendet. Die

Farbe *orange* symbolisiert hierbei den Zeitpunkt vor Beginn der SIT, die Farbe *blau* einen Zeitpunkt während oder nach abgeschlossener SIT.

Direkte Vergleiche der IgG-Reaktivitäten gegen Api m 10-Peptide zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während SIT wurden als Punkte mit Verbindungslinien visualisiert. Die Punkte stellen den jeweiligen Zeitpunkt dar.

Zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse des IgG-ELISA wurden die jeweiligen Mittelwerte der IgG-Reaktivitäten gegen die einzelnen Api m 10-Peptide mit einer Linie verbunden. Die Farben *orange* und *blau* verdeutlichen hierbei ebenfalls die unterschiedlichen Zeitpunkte während SIT.

5. Ergebnisse

5.1. IgE-Epitopkartierung mittels Macroarray

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Macroarray für die Kartierung von IgE-Epitopen bei Api m 10 sensibilisierten Patienten verwendet. Es wurde das Bindungsprofil eines Kollektives von 40 Patienten gegen die 64 Api m 10-Peptide untersucht.

Alle Patienten zeigten eine positive IgE Reaktivität gegen rApi m 10. Im Mittel konnte eine sIgE-Reaktivität gegen Api m 10 von 5,37 kU_A/l bestimmt werden, die Spannweite lag zwischen 0,17 kU_A/l- 24 kU_A/l.

Um die Funktion des Macroarray verifizieren zu können, wurden die ermittelten Array-Werte des sIgE gegen Api m 10 mit den ermittelten ImmunoCAP Werten des sIgE gegen Api m 10 korreliert. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der Ergebnisse (Abbildung 5, $r = 0,4792$, $p < 0,01$).

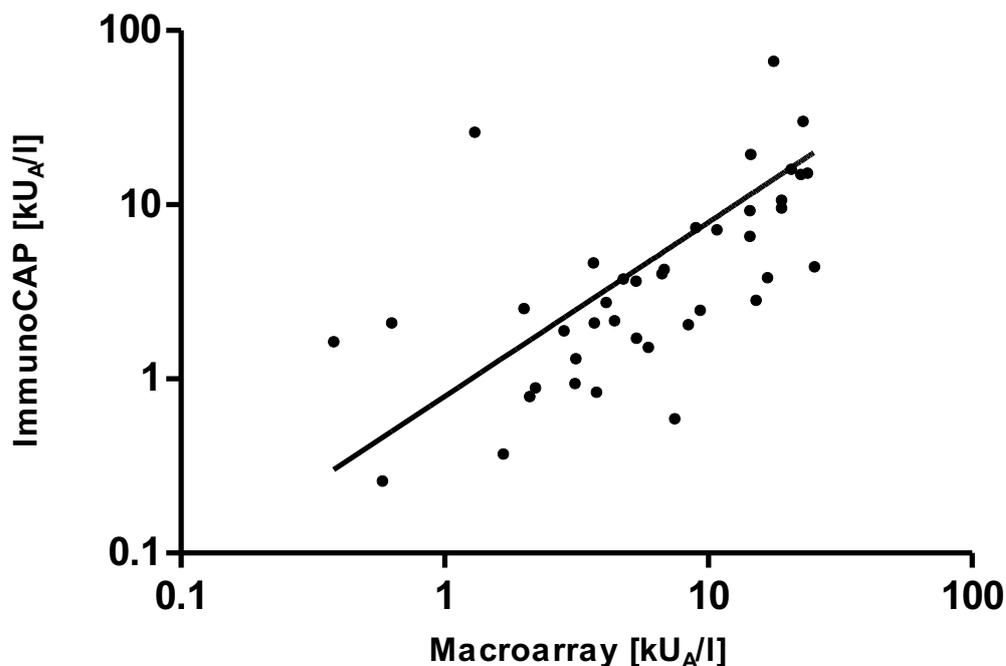


Abbildung 5: Korrelation des spezifischen IgE gegen Api m 10 gemessen mittels ImmunoCAP oder Macroarray ($n=40$). Die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichsgerade dar. Die IgE-Reaktivitäten gegen Api m 10 von ImmunoCAP und Macroarray zeigen eine signifikante Korrelation an ($r = 0,4792$, $p < 0,01$).

Weitere Übereinstimmungen zwischen ImmunoCAP und Macroarray Daten zeigten sich für die Einzelallergene Api m 2, Api m 3 und Api m 4 (Api m 2: $r = 0,534$, ns; Api m 3: $r = 0,544$, $p < 0,01$; Api m 4: $r = 0,539$, $p < 0,05$). Interessanterweise konnte keine Korrelation der Ergebnisse aus Macroarray und ImmunoCAP für Api m 1 ($r = 0,127$, ns) beobachtet werden. Die Api m 1 Daten wurden daraufhin aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Je nach individuellem Patientenserum konnte eine IgE Reaktivität gegen bis zu 29 Api m 10 Peptide beobachtet werden, eine tabellarische Auflistung der Seren mit den gemessenen IgE-Reaktivitäten gegen Api m 10 und der Anzahl der erkannten Peptide wurde im Anhang beigefügt (Tabelle A-1).

Je mehr Peptide erkannt wurden, desto höher war auch die gemessene IgE-Reaktivität gegen Api m 10, sodass sich eine signifikante Korrelation zeigte (Abbildung 6, $r = 0,6500$, $p > 0,0001$).

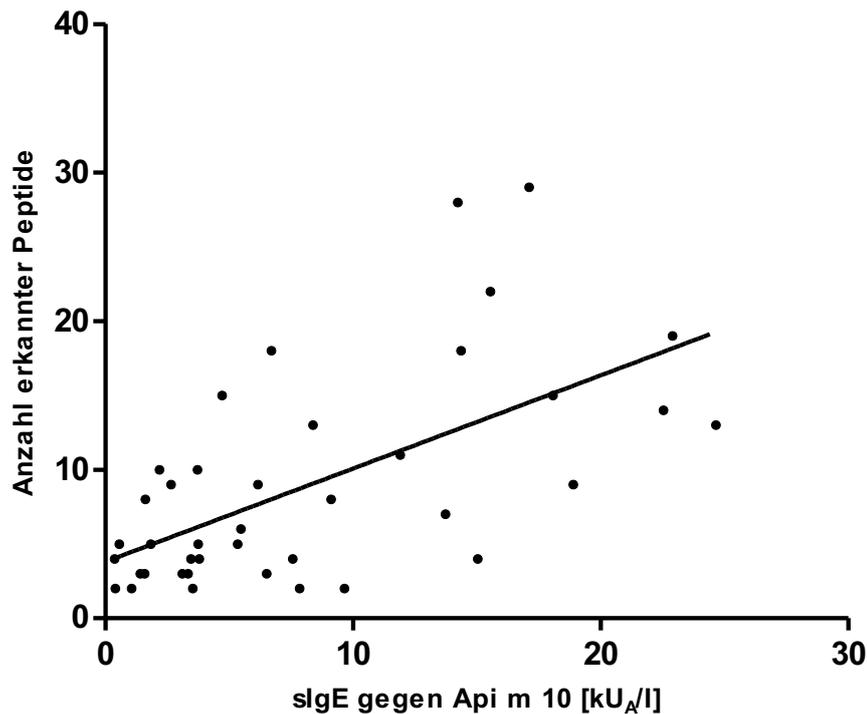


Abbildung 6: Korrelation der sIgE-Reaktivität gegen Api m 10 mit der Anzahl der Peptide, die mittels Macroarray detektiert wurden ($n=40$). Der Pearson-Korrelationskoeffizient r zeigt mit $r=0,6132$ eine positive Korrelation an. Die Korrelation ist signifikant ($p < 0,0001$).

Jedes Patientenserum hat mindestens zwei Peptide gebunden. Insgesamt wurden 43 der 64 getesteten Peptide von Api m 10 sensibilisierten Patienten durch IgE erkannt (Abbildung 7). Auffällig war die Bindung von 100% der Patientenseren an das Peptid 54 mit der Aminosäuresequenz ADSDVTTLPTLIGKN (Abbildung 7). Peptid 3, sowie die flankierenden Peptide 53 und 55 wurden ebenfalls von mehr als 40% der Patientenseren durch IgE-Antikörper gebunden. Das Peptid 3 zeigte eine Bindungshäufigkeit von 75% der gesamten Patientenseren auf, Peptid 53 eine Häufigkeit von 58% und an das Peptid 55 haben 78% der Patientenseren gebunden. Die übrigen Peptide wurden von 0 bis maximal 40% der Patientenseren erkannt und gebunden (Abbildung 7).

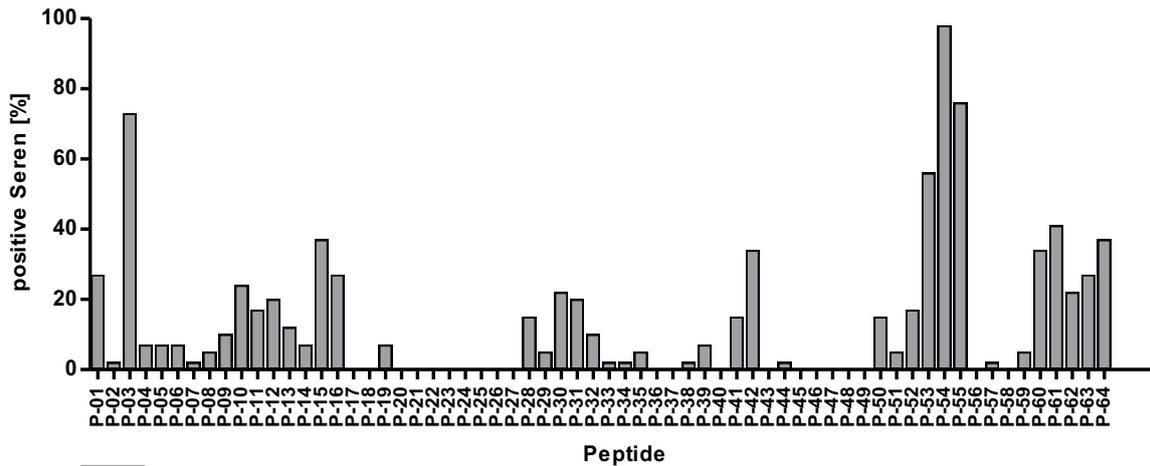


Abbildung 7: Prozentualer Anteil der Seren von Bienengift (BG)-allergischen Patienten, die das jeweilige Api m 10-Peptid gebunden haben (n=40). 100% der Patientenserum binden das Peptid-54. Daneben binden ein Großteil der Patientenserum die flankierenden Peptide Peptid-53 und Peptid-55 sowie das Peptid-3.

Nachdem die Bindungshäufigkeit der IgE-Antikörper an die verschiedenen Peptide untersucht wurde, erfolgte in einem folgenden Schritt die Betrachtung der spezifisch gemessenen Reaktivitäten gegen die einzelnen Peptide.

Die sIgE-Reaktivität gegen das Peptid 54 war signifikant höher als die sIgE Reaktivität gegen die anderen Api m 10 Peptide (Abbildung 8, $p < 0,0001$). Die sIgE-Reaktivitäten gegen das Peptid 3 sowie die flankierenden Peptide 53 und 55 zeigen im Mittel höhere Intensitäten als die übrigen Peptide, ausgenommen des Peptides 54.

An der Gesamtintensität des IgE gegen Api m 10 machte die sIgE-Reaktivität gegen das Peptid 54 einen Anteil von 40% aus und stellt somit gemeinsam mit den Peptiden 3, 53 und 55 ein dominantes Peptid dar. Die spezifische IgE-Reaktivität gegen das Peptid 3 macht einen Anteil von 7%, die sIgE-Reaktivität gegen das Peptid 53 13% und die sIgE-Reaktivität gegen Peptid 55 einen Anteil von 8% an der Gesamtintensität aus. Gemeinsam machen die dominanten Peptide folglich einen Anteil von 68% an der Gesamt-sIgE-Reaktivität aus (Abbildung 9).

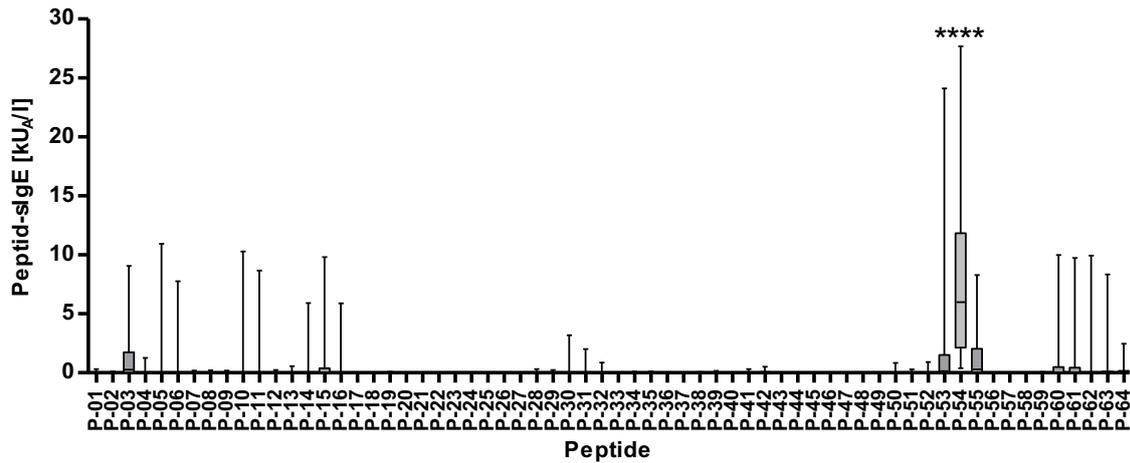


Abbildung 8: Spezifisches IgE gegen die Api m 10-Peptide bei Bienengift-allergischen Patienten gemessen mittels Macroarray (n=40). Die IgE-Reaktivität gegen das Peptid-54 ist signifikant höher als die Reaktivität gegen die anderen Peptide (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,0001$).

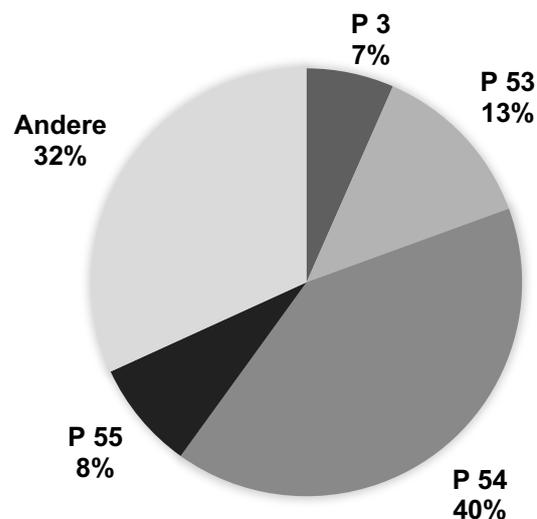


Abbildung 9: Anteil des spezifischen IgE gegen die dominanten Peptide (Peptid 3, Peptid 53, Peptid 54 und Peptid 55) am spezifischen IgE gegen Api m 10 (Gesamtprotein) (n=40). Das spezifische IgE gegen die dominanten Peptide macht einen Anteil von 68% an der IgE-Reaktivität gegen Api m 10 aus.

5.1.1. sIgE-Reaktivität gegen Peptid 54

Nach erfolgter Identifikation der dominanten Peptide 3, 53, 54 und 55, wurden in einem weiteren Schritt die sIgE-Reaktivitäten gegen eben diese Peptide näher betrachtet. Im direkten Vergleich der sIgE-Reaktivitäten gegen die Peptide 3, 53, 54 und 55 konnte eine signifikant höhere sIgE-Reaktivität gegen das Peptid 54 beobachtet werden (Abbildung 10, $p < 0,0001$).

Gleichzeitig zeigte sich eine signifikante Korrelation der sIgE-Reaktivität gegen Api m 10 mit der sIgE-Reaktivität gegen das Peptid 54, welche mit Hilfe des Macroarray detektiert werden konnte (Abbildung 11, $r = 0.7763$, $p < 0.0001$).

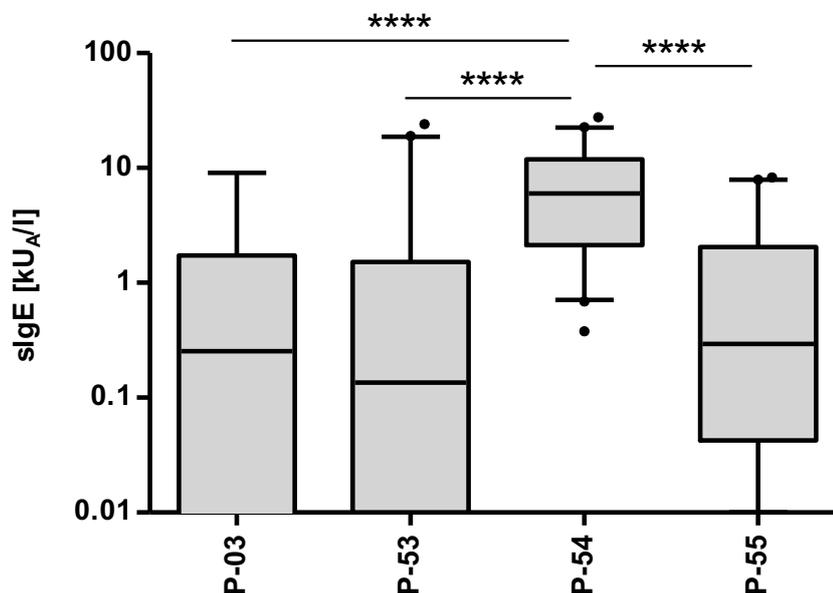


Abbildung 10: Vergleich der Intensitäten der dominanten Api m 10 Peptide Peptid 3, Peptid 53, Peptid 54 und Peptid-55 bei BG-allergischen Patienten ($n=40$) gemessen mittels Macroarray. Die Peptid 54 spezifische IgE-Reaktivität ist signifikant höher als die, der Peptide 3, 53 und 55, welche ebenfalls einen Großteil der Patientenseren gebunden haben ($p < 0,0001$).

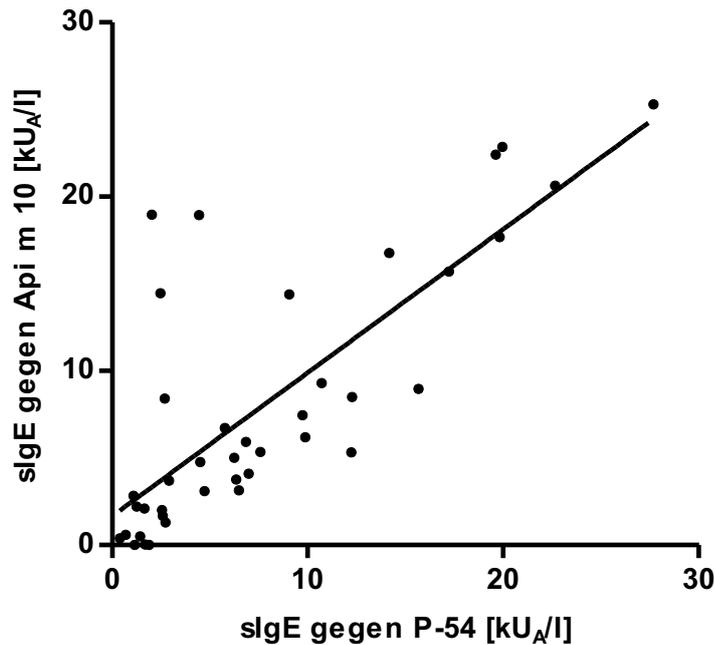


Abbildung 11: Korrelation des spezifischen IgE gegen Api m 10 mit dem spezifischen IgE gegen das Peptid-54 bei BG-allergischen Patienten gemessen mit Hilfe des Macroarray (n=40). Der Pearson-Korrelationskoeffizient r zeigt mit $r = 0,7763$ eine positive Korrelation an. Die Signifikanz der Korrelation wird mit $p < 0,0001$ beschrieben.

5.1.2. Inhibitionsassay

Um die Bedeutung des Peptid 54 in der Bienengiftallergie zu beweisen, wurden in einem nächsten Schritt Inhibitionsassays durchgeführt.

Nach Vorinkubation des Serums des Patienten 10 mit Api m 10 zeigte sich eine Inhibition der slgE-Reaktivität gegen die Api m 10 Peptide. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse des Patienten nach Vorinkubation mit Api m 10 (Api m 10 +) und ohne Vorinkubation (Api m 10 -) im direkten Vergleich (Abbildung 12). Die CAP Klassen wurden farblich gekennzeichnet. Eine grüne Färbung steht für die CAP-Klasse 0 (slgE $< 0,35$ kU_A/l), eine hellgelbe und gelbe Färbung für die CAP-Klassen 1 und 2 (slgE 0,35-3,50 kU_A/l), eine orange Färbung für die CAP-Klasse 3 (slgE 3,51-17,50 kU_A/l) und eine hellrote und rote Färbung für die CAP-Klassen 4 und 5 (slgE 17,51- >100 kU_A/l). Bei Betrachtung der einzelnen Api m 10-Peptide mit und ohne Vorinkubation fiel eine Abnahme der slgE-Reaktivität nach Vorinkubation mit Api m 10 auf (P-3 ohne Vorinkubation: CAP-Klasse 3, mit Vorinkubation: CAP-Klasse 0; P-54 ohne Vorinkubation: CAP-Klasse 4, mit Vorinkubation: CAP-Klasse 1). Zur Kontrolle dienten die IgE-Reaktivitäten gegen Api m 2, 3 und 4. Bei den BG-Allergenen konnte keine Inhibition nach Vorinkubation mit Api m 10 gezeigt werden.

Allergene/ Peptide	Keine Vorinkubation	Vorinkubation
Serum	+	+
Api m10	-	+
Api m 2		
Api m 3		
Api m 4		
Api m 10		
P-01		
P-02		
P-03		
P-04		
P-05		
P-06 – P-49		
P-50		
P-51		
P-52		
P-53		
P-54		
P-55		
P-56		
P-57		
P-58		
P-59		
P-60		
P-61		
P-62		
P-63		
P-64		

CAP-Klasse	s-IgE [kUA/l]
0	0-0,35
1	0,35-0,70
2	0,71-3,50
3	3,51-17,50
4	17,51-50,0
5+6	50- >100

Abbildung 12: Inhibition der IgE-Reaktivität der Api m 10-Peptide durch rApi m 10. Nach Vorinkubation des Serums eines Api m 10-sensibilisierten BG-allergischen Patienten mit rApi m 10 wurde die IgE-Reaktivität der einzelnen Api m 10-Peptide mittels Macroarray gemessen. Die Immunreaktivität gegenüber rApi m 2, 3 und 4 dient als Kontrolle. Serum+/Api m 10- : keine Vorinkubation des Serums mit Api m 10; Serum+/Api m 10+ : Vorinkubation des Serums mit rApi m 10. Die farblichen Unterschiede richten sich nach der jeweiligen CAP-Klasse, die erreicht wird. Nach Vorinkubation mit rApi m 10 wird die IgE Bindung an die Api m 10 Peptide inhibiert, während die IgE Bindung an die anderen BG-Allergene (Api m 2, 3, 4) nicht inhibiert wird.

Bei Durchführung des Peptidinhibitionsassays mittels ImmunoCAP zeigte sich nach Vorinkubation von Seren Api m 10-sensibilisierter BG-allergischer Patienten mit steigenden Konzentrationen des Peptid 54 eine dosisabhängige Inhibition der IgE-Reaktivität gegen Api m 10. Währenddessen konnte bei dem als Kontroll-Peptid verwendete Peptid 12 keine Inhibition gemessen werden (Abbildung 13).

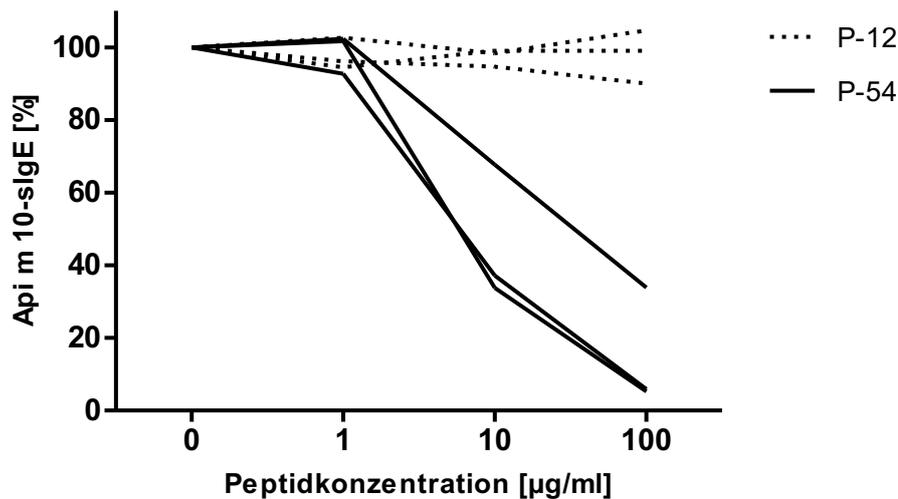


Abbildung 13: Inhibition der IgE-Reaktivität gegen Api m 10 durch das Peptid 54. Seren Api m 10-sensibilisierter BG-allergischer Patienten ($n=3$) wurden mit Peptid 54 oder Peptid 12 (Kontroll-Peptid) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der IgE-Reaktivität gegen Api m 10 mittels ImmunoCAP. Steigende Konzentrationen des Peptides 54 inhibieren die IgE-Reaktivität gegen Api m 10.

5.2. Bestimmung der IgG-Reaktivität gegen Api m 10 mittels ImmunoCAP

Zur Analyse des Bindungsprofils von IgG Antikörpern gegen die Api m 10-Peptide wurden zunächst die mit Hilfe der ImmunoCAP-Methode gemessenen IgG4-Reaktivitäten gegen Api m 10 eines Patientenkollektives zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Detail betrachtet ($n= 12$). Der erste Zeitpunkt lag hierbei vor Beginn der SIT, der zweite Zeitpunkt während bzw. nach abgeschlossener SIT.

Da die Nachweisgrenze für antigenspezifische IgG4-Antikörper laut Herstellerangaben bei $0,07 \text{ mg}_A/\text{l}$ liegt, wurde ein Anstieg der gemessenen IgG4-Reaktivität auf $> 0,07 \text{ mg}_A/\text{l}$ zum zweiten Zeitpunkt als Induktion unter SIT gewertet.

Eine Induktion der IgG4-Reaktivität unter SIT von $< 0,02 \text{ mg}_A/\text{l}$ auf $0,43 \text{ mg}_A/\text{l}$ konnte bei Patient 1 beobachtet werden. Einen ebenfalls sehr diskreten Anstieg unter Therapie zeigten Patient 10 ($< 0,02 \text{ mg}_A/\text{l}$ auf $0,08 \text{ mg}_A/\text{l}$), Patient 16 ($0,08 \text{ mg}_A/\text{l}$ auf $0,18 \text{ mg}_A/\text{l}$) und Patient 38 ($< 0,02 \text{ mg}_A/\text{l}$ auf $0,08 \text{ mg}_A/\text{l}$). Bei Patient 3 wurde ein deutlicher Anstieg der IgG4-Reaktivität gegen Api m 10 unter SIT von $< 0,02 \text{ mg}_A/\text{l}$ auf $1,84 \text{ mg}_A/\text{l}$ gemessen (Tabelle 7). Aus diesem Grund wurden die IgG-Reaktivitäten gegen die einzelnen Api m 10-Peptide der Patienten 1, 3, 10, 16 und 38 im weiteren Verlauf im Detail untersucht. Ein besonderer Fokus wurde hierbei auf Patient 3 gelegt, da dieser die stärkste Ausprägung einer Induktion unter Therapie zeigte.

Tabelle 7: Spezifisches IgG4 gegen Api m 10 gemessen mittels ImmunoCAP (n=12). Bestimmt wurde die IgG4-Reaktivität gegen Api m 10 vor Beginn der SIT und während bzw. nach SIT. Der zweite Zeitpunkt liegt zwischen einem bis vier Jahren nach Therapiebeginn. Die Werte wurden bei einer Verdünnung von 1/20 bzw. 1/100 (v:v) ermittelt.

Patient (Pat)	Vor SIT [mg _A /l]	Während/nach SIT [mg _A /l]
Patient 1	< 0,02	0,43
Patient 2	< 0,02	0,04
Patient 3	< 0,02	1,84
Patient 4	< 0,02	< 0,02
Patient 5	< 0,02	< 0,02
Patient 6	0,05	0,05
Patient 10	< 0,02	0,08
Patient 16	0,08	0,18
Patient 36	< 0,02	< 0,02
Patient 38	< 0,02	0,08
Patient 39	< 0,02	< 0,02
Patient 40	< 0,02	0,03

5.3. IgG-Epitopkartierung mittels Macroarray

Durch die Versuchsreihe zur IgE-Epitopkartierung mithilfe des Macroarray konnte ein dominantes Peptid, Peptid 54, identifiziert werden, welches von allen Patientenseren gebunden wurde. Des Weiteren wurden drei weitere dominante Peptide, Peptid 3, 53 und 55 detektiert.

Zur Untersuchung des Bindungsprofils der Api m 10-Peptide gegen IgG-Antikörper wurde ein IgG-Macroarray mit einer Kohorte von 8 Patienten durchgeführt. Die IgG-Reaktivitäten gegen die Api m 10-Peptide der 8 Patienten wurden zu einem Zeitpunkt vor und einem Zeitpunkt während bzw. nach abgeschlossener SIT untersucht. Neben den Api m 10-Peptiden wurden die BG-Einzelallergene Api m 2- 4 sowie Api m 10 analysiert (Abbildung 14A). Eine Induktion der IgG-Reaktivität gegen Einzelallergene konnte unter SIT in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet werden. Im Mittel zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IgG-Reaktivität gegen Api m 2 am deutlichsten ($p < 0,01$). Eine signifikante Induktion der IgG-Reaktivität gegen Api m 3, 4 und 10 konnte ebenfalls detektiert werden ($p < 0,01$).

Die Analyse der sIgG-Reaktivitäten gegen die 64 Api m 10 Peptide erbrachte eine breite IgG-Reaktivität. Alle Peptide zeigten im Mittel hohe sIgG-Reaktivitäten. Es zeichnete sich kein einzelnes, dominantes Peptid ab. Eine Induktion der Reaktivität konnte vorwiegend bei den Peptiden 1- 16 sowie bei dem Peptid 54 beobachtet werden (Abbildung 14B). Eine signifikante Induktion zeigte das Peptid 6 ($p < 0,1$). Im Allgemeinen wurden hohe IgG-Reaktivitäten gegen das Peptid 54 im Vergleich zu den anderen

Peptiden detektiert. Im Mittel lag die IgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 bei 3488,75 kU_A/l vor SIT und bei 3893,75 kU_A/l während bzw. nach SIT. Im Gegensatz dazu wurde im Mittel eine IgG-Reaktivität gegen alle Api m 10-Peptide von 1769,28 kU_A/l vor SIT und 1793,13 kU_A/l während bzw. nach SIT gemessen.

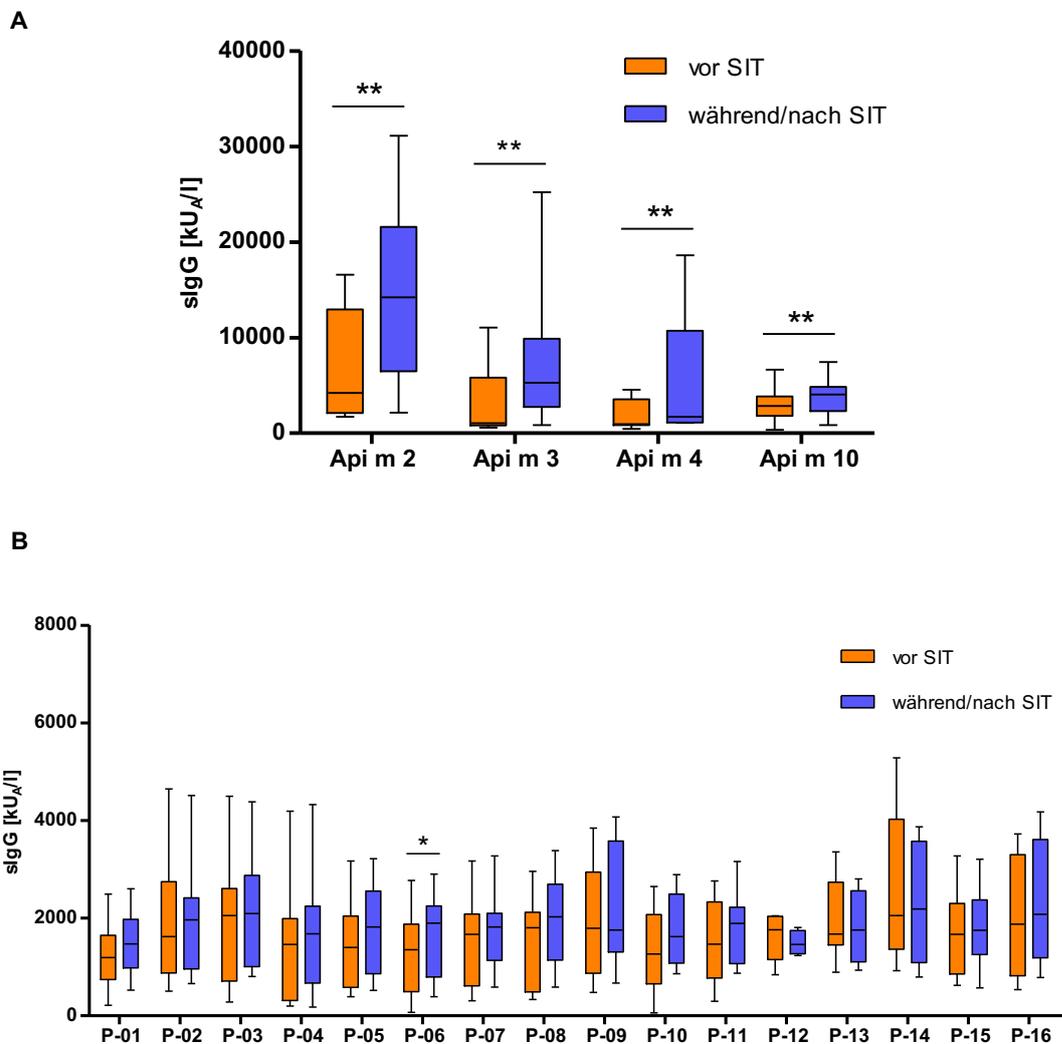
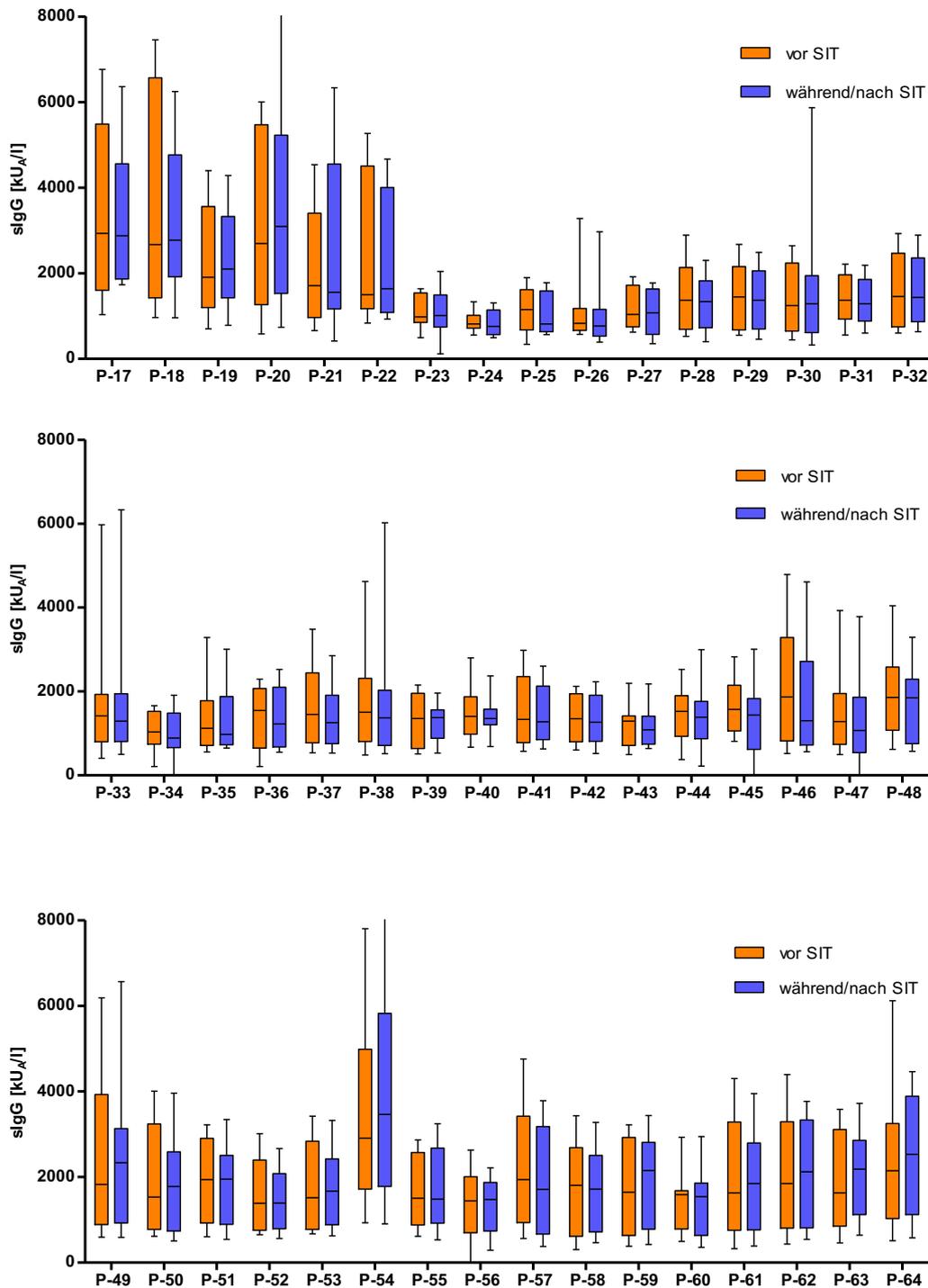


Abbildung 14: (A) Vergleich der IgG-Reaktivitäten gegen die Einzelallergene des Bienengiftes, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 10 vor (orange) und während/nach (blau) SIT gemessen mittels Macroarray (n=8). (B) Vergleich der IgG-Reaktivitäten gegen die Api m 10-Peptide vor (orange) und während/nach (blau) SIT gemessen mittels Macroarray (n=8). Die Klassifizierung während/nach Therapie beschreibt einen Zeitpunkt, der mindestens 1 bis maximal 4 Jahre nach Therapiebeginn liegt. Signifikante Anstiege der IgG-Reaktivität zeigen die BG-Einzelallergene Api m 2-4 sowie Api m 10 ($p < 0,01$). Eine Induktion der sIgG-Reaktivität gegen die Api m 10-Peptide während bzw. nach Therapie ist bei verschiedenen Peptiden zu beobachten.

Abbildung 14 (B): Fortsetzung



In einem nächsten Schritt wurden die Patienten detaillierter analysiert, die, wie unter 5.2. beschrieben, einen Anstieg der IgG-Reaktivität gemessen mittels ImmunoCAP während SIT zeigten. Außerdem deuteten die Daten in Abbildung 14B auf eine Induktion der IgG-Reaktivitäten vorwiegend gegen die Peptide 1- 16 hin, sodass zunächst die IgG-

Reaktivitäten gegen die Peptide 1- 16 bei den Patienten 1, 10, 16 und 38 im Einzelnen betrachtet wurden (Abbildung 15).

Patient 1 zeigte lediglich eine deutliche Induktion der IgG-Reaktivität gegen das Peptid 16. Bei Patient 10 konnte bei der Hälfte der Peptide ein Anstieg der IgG-Reaktivität detektiert werden. Patient 16 hingegen deutete auf eine signifikante Induktion der IgG-Reaktivität gegen die Peptide 1- 16 hin (Abbildung 15, $p < 0,05$). Bei Patient 38 wurden diskrete Anstiege der IgG-Reaktivitäten gegen einzelne Peptide beobachtet.

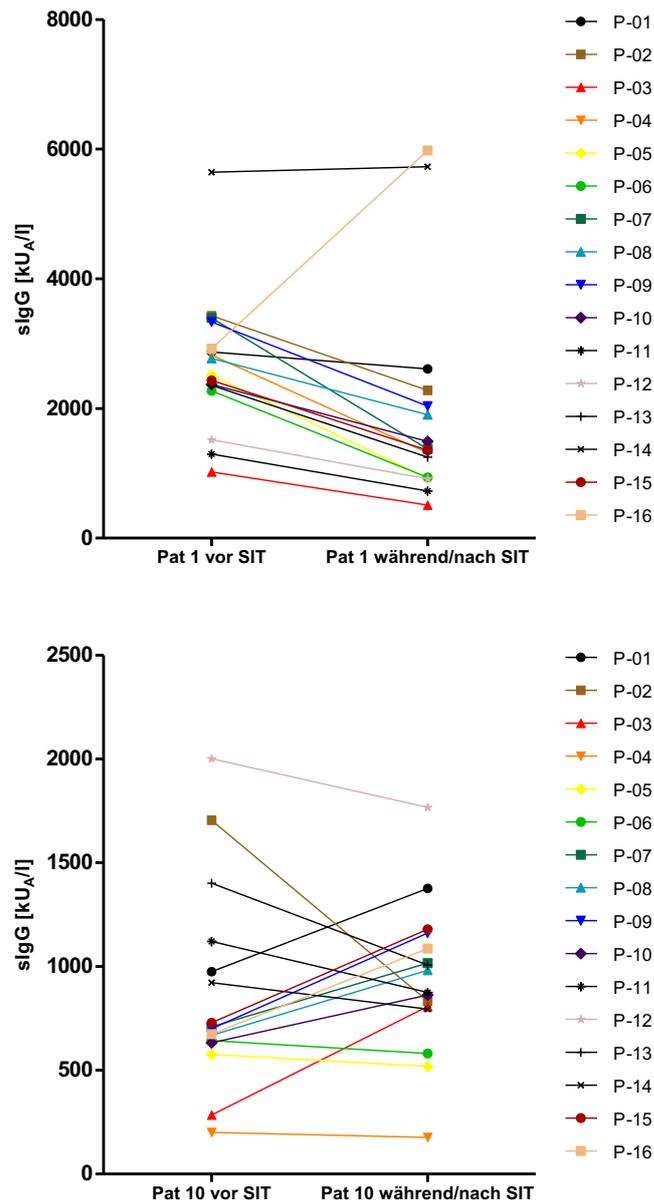
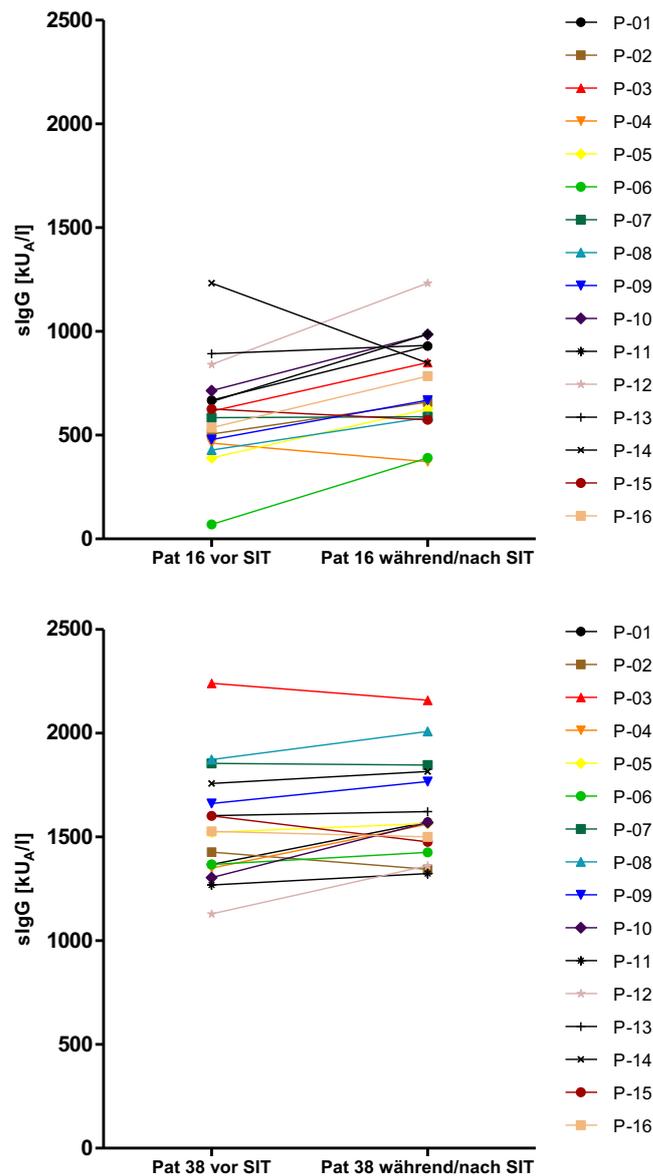


Abbildung 15: Vergleich der IgG-Reaktivitäten gegen die Api m 10-Peptide 1- 16 bei den Patienten 1, 10, 16 und 38 gemessen mit Hilfe des Macroarray. Verglichen wird die IgG-Reaktivität gegen Api m 10-Peptide vor Beginn der SIT mit einem Zeitpunkt während bzw. nach abgeschlossener SIT.

Abbildung 15: Fortsetzung



Bei Patient 3 konnte in den ImmunoCAP-Messungen ein deutlicher Anstieg der IgG-Reaktivität gegen Api m 10 unter SIT beobachtet werden, sodass für diesen Patient eine Analyse der IgG-Reaktivitäten gegen alle 64 Api m 10-Peptide vor und während bzw. nach abgeschlossener SIT, gemessenen mittels Macroarray, durchgeführt wurde. Eine signifikante Induktion der IgG-Reaktivität gegen die Peptide 1- 16 konnte dargestellt werden (Abbildung 16, $p < 0,01$). Bei den IgG-Reaktivitäten gegen die Peptide 17- 32 wurde bei den Peptiden 21 und 30 ein Anstieg unter Therapie beobachtet, die IgG-Reaktivitäten gegen die übrigen Peptide blieben größtenteils unverändert. Gleiches zeigte sich bei den IgG-Reaktivitäten gegen die Peptide 33- 64.

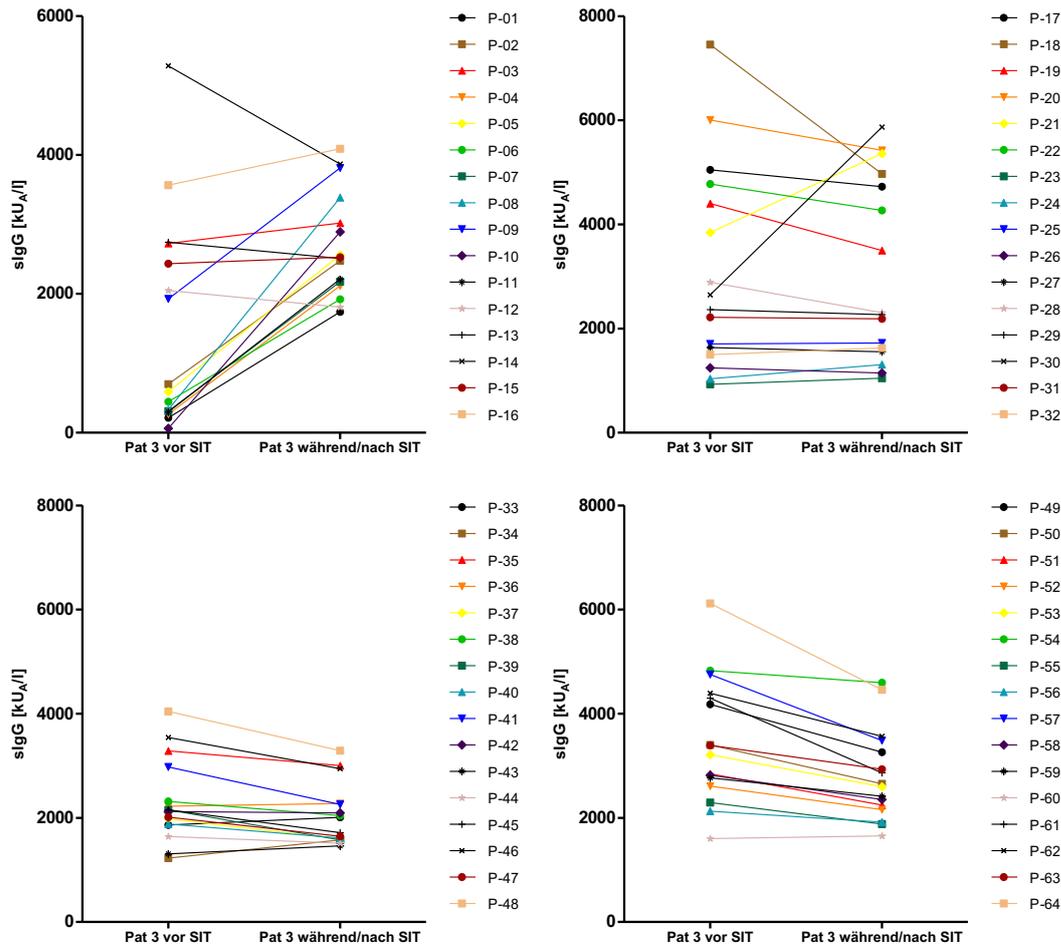


Abbildung 16: Vergleich der IgG-Reaktivität gegen die Api m 10-Peptide bei Patient 3 zu einem Zeitpunkt vor SIT mit einem Zeitpunkt während bzw. nach abgeschlossener SIT. Eine signifikante Induktion der IgG-Reaktivität ist vorwiegend bei den Peptiden 1- 16 zu beobachten ($p < 0,01$).

In Abbildung 14B ließ sich im Mittel eine Zunahme der IgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 während SIT beobachten. Generell zeigten sich höhere Reaktivitäten gegen das Peptid 54 im Vergleich zu den anderen Api m 10-Peptiden. Daher wurden weiterführend die IgG-Reaktivitäten gegen das Peptid 54 vor und während bzw. nach SIT der Patienten 1, 3, 10, 16 und 38 miteinander verglichen (Abbildung 17B). Ebenso wurden die IgG-Reaktivitäten gegen Api m 10 dieser Patienten vor und während bzw. nach SIT miteinander verglichen (Abbildung 17A).

Bei allen Patienten zeigte sich eine Induktion der slgG-Reaktivität gegen Api m 10. Die slgG-Reaktivität gegen Peptid 54 zeigte im Gegensatz dazu keine wesentliche Veränderung im Sinne einer Induktion unter Therapie. Lediglich bei Patient 38 konnte eine Induktion der IgG-Reaktivität während Therapie beobachtet werden.

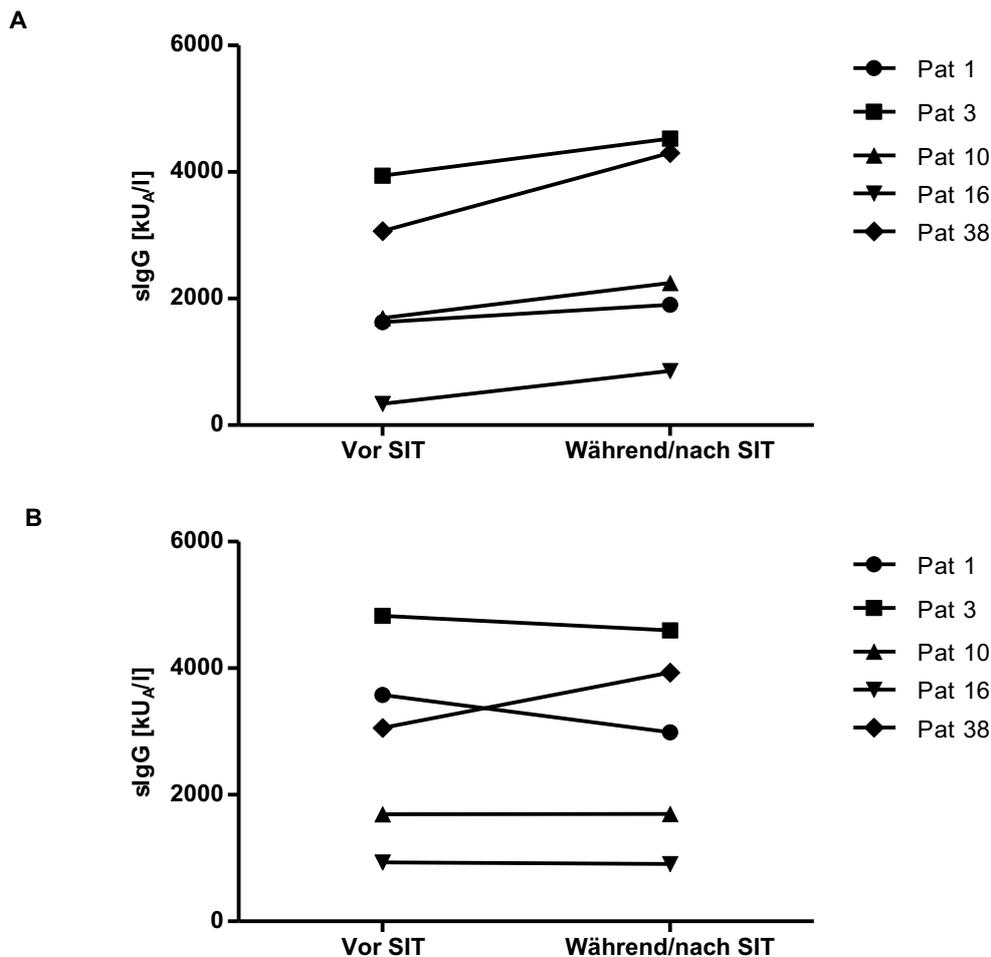


Abbildung 17: (A) Vergleich der spezifischen IgG-Reaktivität gegen Api m 10 vor und während bzw. nach abgeschlossener SIT bei Patient 1, 3, 10, 16 und 38 gemessen mittels Macroarray. (B) Vergleich der spezifischen IgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 vor und während bzw. nach abgeschlossener SIT bei Patient 1, 3, 10, 16 und 38 gemessen mittels Macroarray. Die P-54- spezifische IgG-Reaktivität verändert sich während SIT bei den Patienten nicht wesentlich abgesehen von Patient 38.

5.4. IgG-Epitopkartierung mittels ELISA

Als weitere Methode zur Kartierung der IgG Epitope wurde ein ELISA Verfahren durchgeführt (n=12).

Um die Validität des ELISA zu prüfen, wurde ein Vergleich von Negativ- mit Positivkontrollen graphisch dargestellt. Eine Negativkontrolle wurde als eine Probe definiert, bei der die ELISA Platte nicht mit einem Peptid beschichtet wurde. Bei einer Positivkontrolle wurde die Platte zuvor mit Api m 10 beschichtet. Das weitere methodische Vorgehen blieb identisch. Zusammengehörende Werte wurden mittels einer Linie verbunden.

Die Positivkontrollen zeigten hierbei stets eine höhere optische Dichte als die dazugehörigen Negativkontrollen (Abbildung 18). Teilweise wurden starke Unterschiede zwischen Negativ- und Positivkontrolle gemessen, teilweise unterschieden sich die Werte nur minimal, wodurch die Detektion von Schwankungen des sIgG während Therapie erschwert wurde.

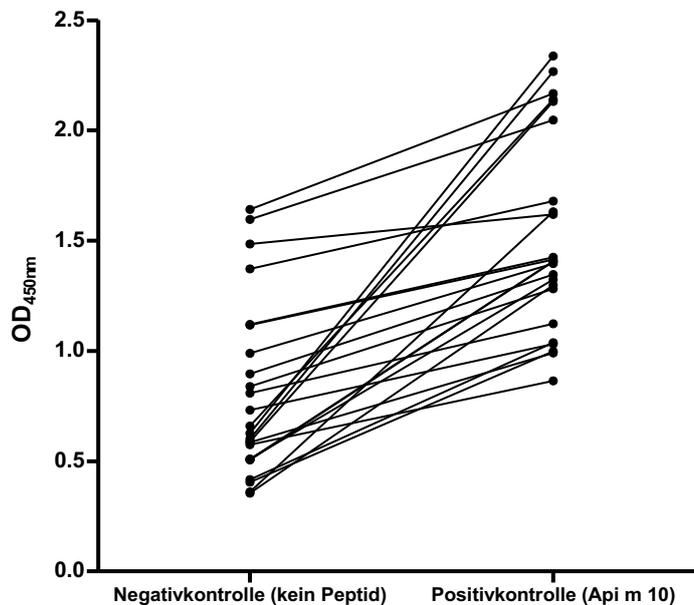


Abbildung 18: Vergleich der optischen Dichte der Negativ- und Positivkontrollen des IgG-ELISA gemessen bei 450 nm ($n=12$). Zusammengehörende Punkte sind mit einer Linie verbunden. Die Werte der Positivkontrollen sind durchgehend auf einem höheren Niveau als die Negativkontrollen.

Es erfolgte ein Vergleich der optischen Dichte der spezifischen IgG-Reaktivität gegen die Api m 10-Peptide gemessen bei 450 nm von Therapiebeginn mit einem Zeitpunkt während oder nach abgeschlossener Therapie. Graphisch dargestellt wurde der Median der IgG-Reaktivität gegen das jeweilige Api m 10-Peptid nach Abzug der Pufferkontrolle. Unterschiedliche Zeitpunkte wurden farblich gekennzeichnet. Bei der Betrachtung des jeweiligen Medians konnte keine signifikante Induktion unter SIT festgestellt werden (Abbildung 19). Ein diskreter Anstieg der IgG-Reaktivität unter Therapie ließ sich gegen einzelne Peptide beobachten, eine leichte Induktion des sIgG gegen das Peptid 54 konnte auch hier bestätigt werden.

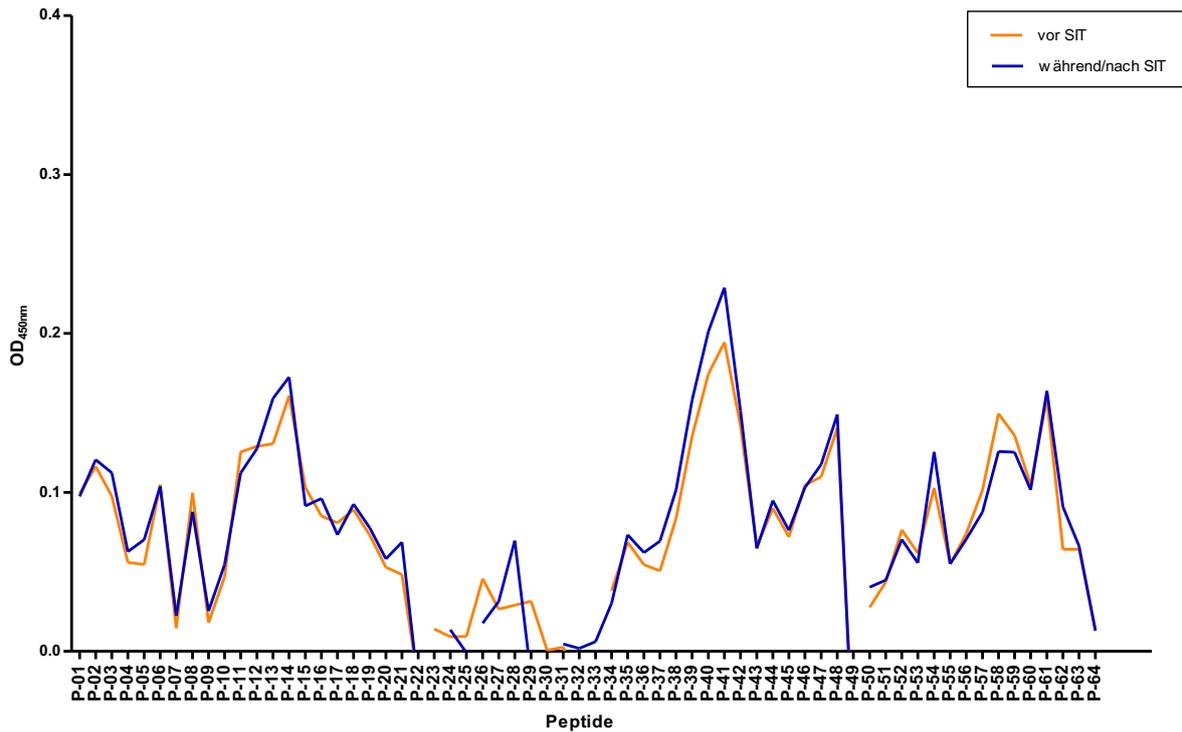


Abbildung 19: IgG-ELISA der Api m 10-Peptide gemessen bei 450 nm (n=12). Dargestellt wird das geometrische Mittel der optischen Dichte der einzelnen Peptide im IgG-ELISA jeweils vor (orange) und während/nach (blau) SIT. Die Klassifizierung während/nach Therapie beschreibt einen Zeitpunkt, der mindestens 1 bis maximal 4 Jahre nach Therapiebeginn liegt. Es konnten keine deutlichen Induktionen der IgG-Reaktivität während SIT im ELISA beobachtet werden.

6. Diskussion

Die vorliegende Studie verfolgte das Ziel ein besseres Verständnis über die Rolle des Einzelallergens Api m 10 in der Bienengiftallergie zu erlangen. Im Fokus der Studie stand die Suche nach spezifischen B-Zell-Epitopen des Api m 10, an welche sIgE-Antikörper binden. Es sollte untersucht werden, ob Api m 10 dominante Epitope aufweist, die in Zukunft zu einer Verbesserung von Diagnostik und Therapie bei Bienengiftallergikern führen könnten. Hierfür wurde ein Macroarray-System verwendet, welches mit 15-mer Peptiden beschichtet war und die gesamte Struktur des Api m 10 Proteins abdeckte. Weiterführend wurden IgG-Antikörper bzw. die für die humorale Immunantwort mit IgG-Antikörpern bedeutenden Api m 10-Epitope mit Hilfe des Macroarray-Systems und ELISA untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass ein Major IgE-Epitop vorliegt, welches von 100% der Api m 10-sensibilisierten Patienten erkannt wird und eine signifikant höhere sIgE-Reaktivität aufweist als alle anderen Peptide. Im Gegensatz dazu können keine dominanten Api m 10-Epitope für IgG-Antikörper gezeigt werden, es lässt sich eine breite IgG-Reaktivität darstellen. Die IgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 ist im Vergleich zu dem sIgG gegen die anderen Api m 10-Peptide auf einem höheren Niveau. Unter SIT kann bei einigen Api m 10-Peptiden eine IgG-Induktion detektiert werden.

In der nun folgenden Diskussion möchte ich zunächst auf die Ergebnisse der B-Zell-Epitopkartierung mit Hilfe des Macroarray-Systems eingehen. Beginnend mit den Epitopen für IgE-Antikörper und anschließend IgG-Antikörpern. An dieser Stelle sollen Vergleiche zwischen den Epitopen gezogen werden. Im Anschluss daran werde ich die Ergebnisse des ELISA diskutieren. Weiterführend möchte ich Aussagen über die klinische Relevanz der Ergebnisse treffen und die Eignung der verschiedenen Methoden zur Epitopkartierung bewerten. Zum Schluss werde ich auf die Limitationen der Arbeit eingehen und einen Ausblick auf zukünftige Arbeiten zu dem Thema darstellen.

6.1. IgE-Reaktivität gegen Api m 10-Peptide

In der vorliegenden Studie wurde in einem ersten Schritt die IgE-Reaktivität gegen die 64 Api m 10-Peptide mit Hilfe des Macroarray Systems gemessen. Es zeigte sich eine Korrelation der detektierten IgE-Epitope, bemessen an der Anzahl der erkannten Peptide pro Patient, mit der Api m 10-spezifischen IgE-Konzentration. Gleiches konnte auch von Flintermann et al. (2008) bei dem Vergleich der IgE-Epitope von Erdnuss-Allergikern im Verhältnis zum Schweregrad der Allergie beobachtet werden und von Pang et al. (2021)

bei der Kartierung von IgE-Epitopen gegen das Allergen der Hausstaubmilbe, Der p 23, bestätigt werden. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Anzahl der erkannten Epitope von der Sensibilisierung des Patienten gegen das Allergen und einer damit einhergehenden gesteigerten allergischen Reaktion abhängt (Flinterman et al., 2008; Shreffler et al., 2004).

Alle untersuchten Patientenserum haben an das gleiche Epitop, Peptid-54, gebunden (n=40). Vergleichend dazu konnte in einer Studie für das *Polybia paulista* Antigen 5 ebenfalls ein Epitop für IgE identifiziert werden, an das alle Patienten gebunden haben. Die Anzahl der untersuchten Seren ist mit n=5 allerdings deutlich geringer als in der hier vorliegenden Studie (Aparecido dos Santos-Pinto et al., 2015). In einer anderen Studie, die sich mit der Kartierung von Epitopen bei Jug r 1, einem Allergen der englischen Walnuss, beschäftigte, wurde ebenfalls ein dominantes Epitop detektiert, für welches jedoch eine Bindungshäufigkeit von 75% (15/20) der untersuchten Patienten angegeben wurde (Robotham et al., 2002). Der direkte Vergleich mit anderen Studien zeigt, dass die Bindungshäufigkeit von 100% der Patienten an ein Epitop besonders bemerkenswert ist. Ein kurzes immundominantes Peptid kann viele relevante Vorteile in Diagnostik und Therapie haben. Hierauf werde ich im Kapitel 6.3. näher eingehen.

Neben dem identifizierten, dominanten Epitop Peptid 54, wurden weitere Epitope, Peptid 3, 53 und 55, von mehr als 40% der Patientenserum durch IgE gebunden und scheinen ebenfalls eine relevante Rolle bei der Immunantwort zu spielen. Diese Ergebnisse sind konkordant mit der Literatur, in der vielfach mehr als nur ein Epitop beschrieben wird (Flinterman et al., 2008; Padavattan et al., 2007). Dieses Phänomen beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die Antikörper zu Beginn der Immunreaktion für die Quervernetzung der IgE-Rezeptoren mehrere Epitope benötigen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass jedes Patientenserum an mindestens ein weiteres Peptid gebunden hat. Außerdem liegen neben den hier untersuchten linearen Epitopen vermutlich noch weitere konformationelle Epitope vor, die an einer IgE-Bindung beteiligt sind. Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund der Vorhersage einer eher ungefalteten Struktur von Api m 10, lineare Epitope eine bedeutende Rolle spielen (Jakob et al., 2020).

Die IgE-Reaktivität gegen das Peptid 54 zeigte ein signifikant höheres Level als die IgE-Reaktivitäten gegen die anderen Api m 10-Peptide. Des Weiteren korreliert die IgE-Reaktivität gegen Api m 10 signifikant mit der IgE-Reaktivität gegen Peptid 54. Dies unterstreicht die Aussage, dass das Peptid 54 als dominantes Epitop für die Interaktion zwischen dem Allergen Api m 10 und den IgE-Antikörpern von essenzieller Bedeutung ist.

Um die Bedeutung des Peptid 54 für die Bienengiftallergie zu überprüfen, wurde ein Inhibitionsassay durchgeführt. Nach Vorinkubation mit rApi m 10 konnte eine Abnahme der sIgE-Reaktivität gegen die verschiedenen Peptide beobachtet werden. Im Vergleich dazu blieb die sIgE-Reaktivität gegen die BG-Einzelallergene Api m 2, 3 und 4 trotz Vorinkubation konstant. Durch die Vorinkubation des Serums mit rApi m 10 binden die im Patientenserum enthaltenen IgE-Antikörper, welche gegen Api m 10 gerichtet sind, an das rekombinante Api m 10. Folglich können weniger Antikörper eine Bindung mit den Peptiden auf dem Array eingehen, sodass es zu einer Signalabschwächung kommt. Gleiches wurde in einem Peptidinhibitionsassay bestätigt, wobei nach Vorinkubation von Seren Api m 10-sensibilisierter BG-allergischer Patienten mit steigenden Konzentrationen des Peptid 54 eine dosisabhängige Inhibition der IgE-Reaktivität gegen Api m 10 gezeigt wurde. Somit wurde bestätigt, dass das Peptid 54 eine immundominante Struktur des Api m 10 darstellt.

In Weiterführung des Projektes wurde das Epitop durch die Laborleiterin Frau Britta Dorn in einem Alanin-Scan überprüft. Hierbei erfolgte ein Austausch jeweils einer Aminosäure der Sequenz des Peptid 54 gegen Alanin. Im Anschluss wurde die IgE-Reaktivität gegen die verschiedenen Varianten mittels ELISA gemessen. Die gewonnenen Daten wurden mir zur Veranschaulichung für die Diskussion zur Verfügung gestellt (Abbildung 20).

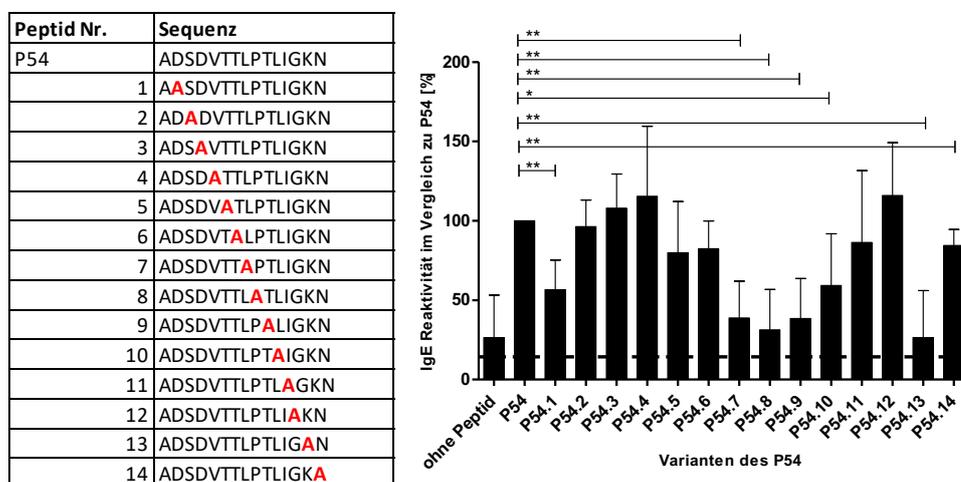


Abbildung 20: (Links) Die Peptidsequenz von P-54 lautet ADSDVTTTLPTLIGKN. Austausch jeweils einer Aminosäure gegen Alanin [A]. **(Rechts)** Biotinylierte Peptide (P54.1- P54.14) binden an mit Neutravidin beschichtete Platten. Nach Zugabe von Api m 10+ Seren wurde ein HRP-markierter Anti-IgE-Sekundärantikörper aufgetragen und die IgE-Reaktivität mittels ELISA gemessen. Die IgE-Reaktivität gegen die Aminosäuresequenz des Peptid 54 entspricht 100% (n=8, Mittelwert+Standardabweichung, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Der Austausch einer Aminosäure der Aminosäuresequenz des Peptides 54 kann bereits eine signifikante Abnahme der sIgE-Reaktivität bedingen.

Es zeigte sich, dass zum Teil bereits der Austausch einer Aminosäure der Aminosäuresequenz des Peptid 54 eine signifikante Abnahme der sIgE-Reaktivität zur Folge hat. Daraus lässt sich schlussfolgernd die immundominante Struktur des Peptid 54 bestätigen.

6.2. IgG-Reaktivität gegen Api m 10-Peptide

Allergen-spezifische IgG-Antikörper spielen eine wichtige Rolle in der Allergentoleranz, sowohl in der natürlichen Immunabwehr als auch in der durch SIT generierten Allergentoleranz (Bilò et al., 2012). IgG-Antikörper können mit sIgE-Antikörpern konkurrieren, die Basophilen- und Mastzellaktivierung hemmen und somit IgE-vermittelte Allergien verhindern (Shamji et al., 2011).

In der Literatur wird beschrieben, dass unter SIT ein Anstieg der IgG-Antikörper, vor allem der Subklasse IgG4, zu erwarten ist (Bilò et al., 2012). Frick und Kollegen stellten fest, dass eine Induktion des IgG4 gegen Api m 10 unter Therapie nur bei den Patienten gezeigt werden konnte, die mit einem Api m 10-haltigen Giftpräparat therapiert wurden (Frick et al., 2016).

6.2.1. Macroarray

Der zweite Teil der Studie beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob sich auch für IgG-Antikörper spezifische Epitope finden lassen und ob diese Epitope den zuvor identifizierten IgE-Epitopen ähneln. In anderen Studien wurde über größtenteils ähnliche Epitope für IgE und IgG bei Erdnussallergikern berichtet (Flinterman et al., 2008; Shreffler et al., 2005).

Die Ergebnisse zeigen eine breite IgG-Reaktivität. Im Gegensatz zur IgE-Epitopkartierung lassen sich keine einzelnen, dominanten Epitope darstellen. Einige Peptide zeigen im Mittel höhere sIgG-Reaktivitäten.

Interessanterweise wies das Peptid 54 eine höhere sIgG-Reaktivität auf, was erneut auf eine bedeutende Rolle dieses Peptides in der Immunantwort bei Api m 10-sensibilisierten Patienten hindeutet.

Beim Vergleich der IgE- und IgG-Epitope lassen sich folglich nicht ausschließlich übereinstimmende, dominante Epitope finden. Verschiedene Studien beschreiben ähnliche Beobachtungen (Aparecido dos Santos-Pinto et al., 2015; Bøgh et al., 2014). Die Ursache hierfür liegt laut Bøgh und Kollegen in den unterschiedlichen Mechanismen der Reifung der spezifischen Antikörper. Die Autoren vermuten, dass es nur eine geringe Homogenität in der Spezifität der IgE- und IgG-Antikörper gibt aufgrund der Tatsache,

dass die IgE- und IgG-sezernierenden Plasmazellen nicht von den selben Vorläuferzellen stammen (Bøgh et al., 2014). Im Gegensatz dazu wird in einer Studie zur Auswirkung der oralen Immuntherapie bei Erdnussallergikern auf die IgE und IgG4 Antwort die Beobachtung geschildert, dass einige Patienten eine Abnahme der Intensität der IgE-Bindung mit gleichzeitiger Zunahme der IgG4-Bindungsintensität an den ähnlichen Epitopen gezeigt haben. Dies würde die Hypothese der Isotypenverschiebung unterstützen. Sie besagt, dass es während der Immuntherapie zu einer Verringerung der IgE-Bindung an den Epitopen kommt, an denen die IgG4-Bindung zunimmt (Vickery et al., 2013). In der vorliegenden Studie konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, lediglich die deutlich höhere sIgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 im Vergleich zu den meisten anderen Peptiden könnte ein Indiz für einen Isotypenswitch sein. Ein möglicher Grund für den fehlenden eindeutigen Nachweis dominanter IgG-Epitope könnte sein, dass in dieser Studie die gesamten IgG-Antikörper betrachtet wurden und nicht wie von Vickery et al. beschrieben einzelne Subgruppen beziehungsweise IgG4.

In einem weiteren Schritt wurde die Induktion der IgG-Antikörper unter Therapie untersucht. Es konnte nicht bei allen Peptiden eine Zunahme des sIgG-Titers detektiert werden. Die Peptide 1-16 zeigten unter Therapie im Mittel eine sIgG-Erhöhung, ebenso das Peptid 54. Bei der Betrachtung der sIgG-Reaktivitäten gegen das Peptid 54 bei einzelnen Patienten während der Therapie im Detail, bleibt jedoch eine Induktion des sIgG gegen das Peptid 54 bei vier aus fünf Patienten aus, obwohl eine Induktion des sIgG gegen Api m 10 zu beobachten ist. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis einer Induktion ist, dass die blockierende Wirkung der IgG-Antikörper nicht mit Hilfe des sIgG-Titers, sondern mit Hilfe funktioneller Assays gemessen werden kann. Diese Assays bringen einen Nachweis über die Inhibition der Immunantwort und könnten als Biomarker für das Ansprechen auf eine SIT fungieren. Hierbei wird die funktionelle IgG-assoziierte Hemmaktivität durch verschiedene Tests der Serumblockierungsaktivität gemessen, wie die Hemmung der FcRII (CD23)-abhängigen Bindung von Allergen-IgE-Komplexen an B-Zellen oder die Hemmung der Allergen-IgE-Interaktion (Shamji et al., 2012).

Ein fehlender Anstieg des sIgG-Titers unter Therapie kann auch für das Fehlen von Api m 10 in therapeutischen Giftpräparaten sprechen (Köhler et al., 2014). Die Patienten der hier vorliegenden Studie erhielten zur Therapie entweder das Präparat *Venomil* (Allergy Therapeutics, Worthing, U.K) oder *ALK lyophilisiert* (ALK Abelló Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland). In vorherigen Arbeiten wurde der Gehalt von Api m 10 in verschiedenen Präparaten untersucht. In *Venomil* erfolgte der Nachweis von Api m 10, wenn auch in einem etwas geringeren Ausmaß als im Rohgift enthalten. Im Gegensatz

dazu konnte kein Api m 10 in dem Präparat *ALK lyophilisiert* nachgewiesen werden (Blank et al., 2017). Aus der hier untersuchten Kohorte wurden zwei Patienten, Patient 36 und 38, mit Venomil therapiert. Die anderen Patienten erhielten folglich eine initiale Einleitung und Aufdosierung mit *ALK lyophilisiert* und bekamen im Verlauf eine Erhaltungstherapie mit *ALK Depot*. Bei Patient 38 konnte eine Zunahme der slgG-Reaktivität gegen Api m 10 beobachtet werden. Weiterführend wurde bei diesem Patienten ebenfalls ein Anstieg der slgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 verzeichnet. Diese Beobachtungen bestätigen somit die von Köhler et al. (2014) vermutete Annahme, dass das Vorhandensein von Api m 10 in Giftpräparaten mit einem Anstieg des slgG-Titers unter Therapie einhergeht. Allerdings konnten diese Beobachtungen bei Patient 36 nicht gemacht werden, da eine Induktion des slgG gegen Api m 10 ausblieb. In einer Studie von Peireira Santos und Kollegen (2020) werden ähnliche Beobachtungen geschildert. Hierbei wurde die Entwicklung des Api m 10 spezifischen IgG4 ein Jahr nach SIT untersucht. Die Autoren beschreiben ebenfalls einen ausbleibenden Anstieg des slgG4 gegen Api m 10, wohingegen ein Anstieg des slgG4 gegen Api m 1 beobachtet wird.

Interessanterweise zeigte Patient 3 einen vergleichsweise sehr deutlichen Anstieg des slgG gegen Api m 10 in den ImmunoCAP Messungen, obwohl er mit *ALK* als Giftpräparat therapiert wurde. Somit widerspricht er den zuvor beschriebenen Vermutungen, dass das Fehlen von Api m 10 in den Giftpräparaten mit einer ausbleibenden Induktion der slgG-Reaktivität einhergeht (Blank et al., 2017; Frick et al., 2016; Köhler et al., 2014). Bei der Betrachtung der anamnestischen Daten des Patienten 3 im Detail fällt auf, dass er als Imker tätig ist. Des Weiteren erhielt er zur Erhaltungstherapie die Maximaldosis von 200µg bestehend aus einer Kombination von *ALK lyophilisiert* und *ALK Depot*. Es gilt zu vermuten, dass die Tätigkeit als Imker und die damit einhergehende gesteigerte Exposition gegenüber dem Bienengift zu einer stärkeren Zunahme des slgG-Titers geführt haben könnte.

Um die Ergebnisse des IgG Macroarray mit einer für die Epitopkartierung geläufigeren Methode zu vergleichen und zu validieren, wurde ein ELISA durchgeführt.

6.2.2. ELISA

Die Ergebnisse der IgG-Epitopkartierung mittels ELISA bestätigen die Macroarray-Daten insofern, dass eine ebenso breite IgG-Reaktivität ermittelt wurde. Einige Peptide zeigen im Mittel eine leichte Induktion, ein diskreter Anstieg der slgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 unter Therapie konnte ebenfalls beobachtet werden.

Weiterhin wurden die gemessenen IgG-Reaktivitäten der Positiv- und Negativkontrollen miteinander verglichen. Die Positivkontrolle übertraf in jedem Fall die Negativkontrolle, wodurch bestätigt werden konnte, dass der ELISA als Methode funktioniert hat.

Es konnten jedoch vereinzelt nur leichte Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrolle gemessen werden. Dies verdeutlicht die Problematik der erschwerten Identifikation von Unterschieden der sIgG-Reaktivitäten gegen einzelne Peptide hinsichtlich einer Induktion aufgrund eines zum Teil sehr schmalen Messbereiches. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe verschiedener Strategien versucht, die Hintergrundaktivität zu minimieren, um somit die Negativkontrollen auf ein niedriges Niveau zu bringen. Hierfür wurden zunächst unterschiedliche Puffer verwendet (1% BSA, 3% BSA, 10% FCS, 5% Ziegen Serum, 5% Ziegen Serum und 5% FCS, 4% Milchpulver in DPBS). Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen des Serums getestet. Bei allen Strategien blieben die gemessenen Werte der Negativkontrollen auf einem relativ hohen Niveau. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass bei dem hinzugefügten Plasma neben IgG-Antikörpern gegen Api m 10 auch solche gegen Milch oder Rinderbestandteile vorhanden sein können (Andersen et al., 2004). Vermutlich wurden zuvor Milchprodukte und Rindfleisch von den Probanden konsumiert und eine Antikörperproduktion angeregt, sodass Kreuzreaktivitäten zwischen Plasma und Puffer für eine hohe Hintergrundaktivität sorgen (Güven et al., 2014).

6.3. Macroarray und ELISA als Methoden zur Epitopkartierung

Eine Methode zur Epitopkartierung ist die Anwendung bindungsspezifischer Essays (Ahmad et al. 2016). In dieser Studie wurde neben eines ELISA die Methode des Macroarray erstmals zur Epitopkartierung verwendet. Der Macroarray wird seit 2016 zur Allergiediagnostik angewendet und ermöglicht durch die Blockade von klinisch irrelevanten IgE Antikörpern eine nahezu CCD-freie Diagnostik („Macroarray Diagnostics GmbH“). In verschiedenen Studien wird die Zuverlässigkeit und Effizienz der Methode zur Diagnostik einer Allergie sowie dem Nachweis einer Sensibilisierung gegen Einzelallergene beschrieben (Akarsu et al., 2022; Heffler et al., 2018).

Heffler et al. (2018) beobachten eine Korrelation der ermittelten IgE-Profile von ImmunoCAP und Macroarray. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Beobachtungen. Die mit Hilfe des Macroarray ermittelten Werte des sIgE gegen Api m 10 korrelierten sehr gut mit den zuvor gemessenen ImmunoCAP Daten.

Weiterhin werden für die Durchführung des Arrays nur kleine Mengen des Patientenserums benötigt.

Prinzipiell können die Chips mit den Peptiden sämtlicher Allergene beschichtet werden, sodass die Methode ebenfalls zur Kartierung von Epitopen der anderen BG-Allergene

verwendet werden kann. Auch in der Detektion dominanter Epitope der Allergene, die im Rahmen anderer Allergien eine wichtige Rolle spielen, könnte die Methode Anwendung finden.

Bei dem Vergleich des Macroarray mit der seit 10 Jahren erprobten Methode des Microarray zur Epitopkartierung von Lebensmittelallergenen lassen sich viele Parallelen finden, wie die Durchführung der Methode in einer Feuchtigkeitskammer oder eine Überlappung der Aminosäuren auf dem Chip bzw. Objektträger. Da allerdings die Inkubationsschritte lichtgeschützt und die Analyse in einem Vakuum erfolgen muss, stellt sich die hier angewandte und speziell zur Epitopkartierung von Api m 10 entwickelte Methode des Macroarray als unkomplizierter dar (Lin et al., 2017).

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit individuelle Sensibilisierungsprofile für jeden Patienten herstellen zu können. Dadurch könnten nicht nur Allergen-spezifische Profile erstellt werden, sondern auch die dominanten Epitope der individuellen Immunantwort eines Patienten identifiziert werden, um so eine personalisierte Therapie zu ermöglichen. Neben den Api m 10 Peptiden wurden in dieser Studie auf dem Arraychip ebenfalls die BG-Allergene Api m 1-4 und Api m 10 mit analysiert und die sIgE- und sIgG-Titer gemessen. Api m 1 wird in der Literatur als das bedeutendste Majorallergen des Bienengiftes mit einem Trockengewicht von 12% und einer Sensibilisierungsrate von bis zu 72,9% beschrieben (Köhler et al., 2014; Spillner et al., 2014). Die sIgE- und sIgG-Reaktivität gegen das BG-Allergen Api m 1 zeigte allerdings keine mit der Literatur konkordanten Werte (Köhler et al., 2014), sodass dieses Allergen vermutlich nicht korrekt auf dem Chip abgebildet ist. Vor einer weiteren Anwendung der Methode im Rahmen größerer Studien sollte dies zunächst überprüft werden.

Im Gegensatz zum Macroarray ist der ELISA eine vorher bereits erprobte Methode zur Epitopkartierung (Aparecido dos Santos-Pinto et al., 2015; Govindaraj et al., 2016), vorwiegend für die Charakterisierung der IgE-Immunantwort. Beschrieben ist allerdings auch die Verwendung des ELISA zur Bestimmung Allergen-spezifischer IgG-Titer (Shamji et al., 2012). In dieser Studie wurde der ELISA jedoch aufgrund seiner relativ hohen Hintergrundaktivität im Gegensatz zu dem Macroarray als fehleranfälliger eingeschätzt und zeigte sich komplexer in der Durchführbarkeit. Die Methode scheint eine niedrige Sensitivität zu haben, da zu geringe Mengen an sIgG im Plasma vorhanden sind, um diese im ELISA messen zu können.

6.4. Klinische Relevanz der Ergebnisse

In verschiedenen Studien wurde ein Mangel an Api m 10 in bestimmten therapeutischen Giftpräparaten beschrieben (Blank et al., 2011; Frick et al., 2016; Köhler et al., 2014). Frick et al. (2016) beschreibt zudem einen Zusammenhang zwischen dem Mangel an Api m 10 in therapeutischen Giftpräparaten und einer geringeren therapeutischen Wirksamkeit der Bienengift-SIT. In dem Zusammenhang wird deutlich, dass therapeutische Bienengiftpräparate mit rApi m 10 aufgestockt werden müssen, um die therapeutische Lücke zu schließen. Die Struktur des rApi m 10 wird allerdings als sehr instabil beschrieben, sodass alternative Strategien für die SIT notwendig werden (Blank et al., 2011).

In dieser Studie konnte ein dominantes Epitop identifiziert werden. Da es sich bei dem Epitop um ein kurzes Peptid handelt, ist es deutlich einfacher in der Herstellung als das gesamte Protein von rApi m 10. Blank et al. (2017) beobachteten einen schnellen Abbau des rekombinant hergestellten Allergens rApi m 10 bei 4°C innerhalb von drei Tagen, welches in vergleichbarer Konzentration wie im Rohgift enthalten vorlag.

Ein weiterer Aspekt ist die Hypoallergenität eines einzelnen Peptides bei SIT im Gegensatz zu dem gesamten Allergen. King et al. stellten eine Methode vor, bei der kleinste Teile von *Ves v 5* (*yellow-jacket wasp*) und *Pol a 5* (*paper-wasp*) mit einem homologen, wenig kreuzreagierenden Protein zusammengeführt wurden. Sie stellten eine Reduktion der Allergenität um das 100- bis 3000-fache, bemessen an einem Histaminfreisetzungstest bei Wespengiftallergikern, fest (King et al., 2001).

In einer Studie von Ziegelmayer et al. (2016) wurde ein B-Zell-Epitop-basierter Impfstoff *BM32* für die Immuntherapie bei Gräserpollen-Allergikern entwickelt. Hierbei wurden Peptide, die von den IgE-Bindungsstellen auslösender Allergene abgeleitet sind, an ein nicht-allergenes Trägerprotein, welches ein Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus darstellt, gekoppelt. Aufgrund einer geringeren Allergenität des Impfstoffes im Vergleich zu den konventionell angewandten Präparaten, können höhere Dosen appliziert werden. Die Autoren beschreiben eine hiermit assoziierte, stärkere IgG-Induktion. In einer Phase IIb-Studie mit dem Impfstoff *BM32* konnte die klinische Wirksamkeit des Präparates ebenso wie eine gute Toleranz nach Applikation beobachtet werden (Ziegelmayer et al., 2016). In der Theorie würde sich dadurch die Möglichkeit ergeben, die Zusammensetzung der Impfstoffe anhand des individuellen Sensibilisierungsprofils des einzelnen Patienten anzupassen (Valenta et al., 2017).

Die hier beschriebenen Ergebnisse könnten als Vorlage für die Entwicklung eines peptid-basierten Impfstoffes in der Bienengift-SIT dienen. Dazu müssten allerdings zunächst

die dominanten Epitope der restlichen, für die Bienengiftallergie relevanten Allergene charakterisiert werden.

Neben einem therapeutischen Nutzen kann die Dominanz eines Epitopes auch für die Diagnostik relevant sein. Das rekombinante Allergen rApi m 10 könnte durch das Peptid 54 ersetzt werden, sodass zukünftig peptidbasierte Assays zum Einsatz kommen könnten.

Der fehlende Nachweis einer deutlichen IgG-Induktion gegen Api m 10 unter SIT bei Bienengiftallergikern kann darin begründet sein, dass Api m 10 in zu geringen Konzentrationen in therapeutischen Giftpräparaten vorliegt und somit als Indiz für ein Therapieversagen gesehen werden. Die instabile Struktur des Proteins in den verwendeten Präparaten kann ebenfalls eine ausbleibende IgG-Induktion gegen Api m 10 bedingen (Blank et al., 2011). Um diese Thesen zu prüfen, sollten größere Kohorten und einzelne IgG-Subklassen betrachtet werden.

6.5. Limitationen der Arbeit

Limitation der hier vorliegenden Studie ist die Größe der Kohorte. Vor allem die Kohorte zur Charakterisierung der humoralen Immunantwort der IgG-Antikörper ist mit 8 Patienten eher klein angelegt. Folglich ist die Aussagekraft der Ergebnisse projiziert auf die Gesamtpopulation kritisch zu hinterfragen.

Weiterhin limitierend ist, dass der zweite Zeitpunkt, welcher definitionsgemäß während beziehungsweise nach abgeschlossener SIT liegt, einen Zeitraum von einem bis vier Jahre umfasst. Durch diese große Zeitspanne wird die Vergleichbarkeit der gemessenen sIgG-Werte zwischen den Patienten herabgesetzt. Ein späterer zweiter Zeitpunkt mit beispielsweise vier Jahren nach Therapiebeginn könnte ein Grund dafür sein, dass eine Induktion der IgG-Antikörper zu diesem Zeitpunkt nicht messbar gewesen ist. Durch einen größeren Abstand zur letzten Gabe des Giftpräparates könnte es bereits zu einem Abfall des sIgG-Titers gekommen sein. Immunreaktive IgG-Spiegel scheinen innerhalb eines Jahres nach Absetzen der SIT um ca. 80-90% abzunehmen (Mahler et al., 2020). Ein weiterer Kritikpunkt dieser Studie ist die reine Bestimmung der sIgG-Titer gegen die Api m 10-Peptide in Macroarray und ELISA. Eine Messung der sIgG4-Titer wäre sicherlich ebenfalls von Bedeutung gewesen, da ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg dieser Subgruppe und der klinisch wirksamen SIT beschrieben wurde (Hofmaier et al., 2014).

6.6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit vermag einen Beitrag zum Verständnis des Bienengiftallergens Api m 10 leisten. Es konnten interessante Aufschlüsse über die Epitope des Api m 10 gegeben werden. Vor allem die Charakterisierung der Immunantwort der IgE-Antikörper brachte bedeutsame Ergebnisse mit der Identifikation eines dominanten Epitops. Neben der Erschließung der humoralen Immunantwort konnte eine weitere Methode zur Epitopkartierung, ein Macroarray, etabliert werden.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu stützen, sind größere Kohorten notwendig. Zunächst sollten in weiteren Arbeiten die Dominanz des Peptid 54 als Epitop für IgE-Antikörper in großen Populationen verifiziert werden.

Weiterhin gilt es den Macroarray auf seine Anwendbarkeit, Durchführbarkeit und Testleistung in einer größeren Kohorte zu prüfen und den Einsatz zur Epitopkartierung zu bestätigen.

Die Versuche zur IgG-Epitopkartierung mit Hilfe des Arrays sollten ebenfalls mit einer größeren Anzahl von Patienten wiederholt werden. Hier wäre es für zukünftige Arbeiten sicherlich interessant die Patienten zu einem ähnlichen Zeitraum während der SIT auf eine IgG-Induktion zu untersuchen und die Subklasse IgG4 detaillierter zu betrachten.

Neben den B-Zell-Epitopen ist ein Überblick über die T-Zell-Epitope ebenso erstrebenswert. Daher könnte eine Kartierung der T-Zell-Epitope von besonderem Interesse für zukünftige Arbeiten sein.

Durch die Kenntnis der individuellen Sensibilisierungsprofile der Patienten, kann zukünftig eine bessere Risikostratifizierung vor Therapieeinleitung erfolgen und eine personalisierte Behandlung ermöglicht werden.

7. Zusammenfassung

Stiche der Honigbiene (*Apis mellifera*) gehören zu den häufigsten Auslösern schwerer anaphylaktischer Reaktionen in der Bevölkerung. Die einzige kausale Therapie zur Verhinderung künftiger anaphylaktischer Reaktionen ist die spezifische Immuntherapie (SIT). Api m 10 ist als ein Majorallergen des Bienengiftes identifiziert worden und stellt durch seine Unterrepräsentation in SIT-Therapeutika ein erhöhtes Risiko bei dominanter Api m 10-Sensibilisierung für ein Behandlungsversagen dar. Ziel dieser Studie war es, die humorale Immunantwort auf Api m 10 genauer zu charakterisieren.

Dafür wurden lineare IgE- und IgG-Epitope analysiert, die von BG-allergischen Patienten erkannt werden. Die untersuchte Kohorte bestand aus 41 Patienten mit Bienengiftallergie der Unikliniken Gießen und Freiburg. Es erfolgten Blutentnahmen vor Beginn der SIT und während beziehungsweise nach abgeschlossener Therapie. Methodisch wurde zunächst ein Macroarray angewandt, auf dem synthetische 15-mer Peptide mit 12 Aminosäuren Überlagerung, die die gesamte Aminosäuresequenz von Api m 10 abdecken, gekoppelt wurden. Für die Verifizierung der IgG-Epitope wurde zusätzlich ein ELISA verwendet.

Die IgE-Bindung wurde in Seren von BG-allergischen Patienten vor Beginn der SIT untersucht, die eine sIgE-Reaktivität gegen Api m 10 ($>0,35\text{kAU/l}$), bestimmt mittels ImmunoCAP, aufwiesen (Api m 10-spezifisches IgE, Median [Bereich]: 3,79 [0,59-66,6] kAU/l ; $n=40$). Alle Patientenserum zeigten in der Macroarray-Analyse eine positive IgE-Reaktivität für rApi m 10 (5,37 [0,17-24] kAU/l), die eine angemessene Korrelation mit den durch ImmunoCAP erhaltenen Werten aufwies ($r=0,4792$, $p<0,01$). Einzelne Seren zeigten eine IgE-Reaktivität auf bis zu 29 Api m 10-Peptide. Es wurden drei Api m 10-Peptide identifiziert, die von mehr als 40 % der getesteten Seren erkannt wurden. Ein Peptid, das Peptid 54 (Aminosäuresequenz: ADSDVTTTLPTLIGKN), wurde von 100 % der Api m 10-positiven Seren gebunden und stellt somit ein dominantes lineares IgE-Epitop von Api m 10 dar. Die Korrelation von IgE gegen Api m 10 (bestimmt durch den ImmunoCAP) und IgE gegen das Peptid 54 (bestimmt durch den Macroarray) zeigte einen positiven Zusammenhang ($r=0,78$, $p<0,0001$).

Das Bindungsprofil der Api m 10-Peptide gegen IgG-Antikörper wurde zu je einem Zeitpunkt vor und einem Zeitpunkt während bzw. nach abgeschlossener SIT in Seren BG-allergischer Patienten untersucht ($n=8$, 2. Zeitpunkt: 1 - 4 Jahre nach Therapiebeginn). Hierbei wurde eine breite IgG-Reaktivität beobachtet. Bei einigen Api m 10-Peptiden konnte im Mittel eine Induktion des sIgG während SIT detektiert werden (Peptide 1 - 16, Peptid 54). Im Allgemeinen zeigte sich ein hoher sIgG-Titer gegen das Peptid 54, eine Induktion unter Therapie bleibt allerdings bei den meisten Patienten aus

(Mittelwert: 3488,75 kU_A/l (vor SIT), 3893,75 kU_A/l (während/ nach SIT)). Mit Hilfe des ELISA konnte eine breite IgG-Reaktivität bestätigt werden. Eine signifikante Induktion des sIgG gegen einzelne Peptide konnte nicht beobachtet werden. Es ließen sich keine deutlichen Überschneidungen von IgE und IgG Epitopen darstellen.

Interessanterweise konnte bei einem Patienten, Patient 3, ein deutlicher Anstieg des sIgG gegen Api m 10 mittels ImmunoCAP ((ImmunoCAP: <0,02 mg_A/l (vor SIT); 1,84 mg_A/l (während/nach SIT)) gemessen werden trotz Therapie mit dem Giftpräparat *ALK lyophilisiert*, einem Präparat, bei dem bisher der Nachweis von Api m 10 ausblieb. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte seine berufliche Tätigkeit als Imker und das damit einhergehende erhöhte Risiko eines Sticheignisses sein.

Ein Mangel an Api m 10 in therapeutischen Bienengiftpräparaten kann durch rekombinant synthetisiertes Api m 10 ausgeglichen werden. Aufgrund der Instabilität von Api m 10 kann die Identifizierung eines wichtigen Api m 10-IgE-Epitops, wie das Peptid 54, von großer Bedeutung für die Verbesserung der Therapie sein und einen ebenso großen Nutzen für diagnostische Zwecke haben. Es werden größere Patientenkohorten benötigt, um die Durchführbarkeit dieses Ansatzes zu untersuchen und die Methode der Epitopkartierung mittels Macroarray (Firma Macro Array Diagnostics GmbH (MADx)) etablieren zu können. IgG-Epitope sollten in einer größeren Kohorte von Patienten, die ein Api m 10-enhaltendes BG-Präparat zur SIT bekommen haben, analysiert werden, gleichermaßen wie eine Induktion der IgG-Antikörper, vor allem der Subgruppe IgG4, unter SIT.

8. Summary

Honeybee (*Apis mellifera*) stings are among the most common triggers of severe anaphylactic reactions in the general population. The only causal therapy to prevent future anaphylactic reactions is the systemic immunotherapy (SIT). Api m 10 has been identified as a major allergen of honeybee venom and presents an increased risk for treatment failure in the presence of dominant Api m 10 sensitizations, due to its underrepresentation in SIT therapeutics. The aim of this study was to characterize the humoral immune response to Api m 10 more in detail.

For this purpose, linear IgE and IgG epitopes recognized by honeybee-venom (HBV)-allergic patients were analyzed. The investigated cohort consisted of 41 patients with bee venom allergy from the University Hospitals Giessen and Freiburg. Blood samples were taken before starting SIT and during therapy. Methodologically, a macroarray was initially applied, on which synthetic 15-mer peptides with 12 amino acid overlap covering the entire amino acid sequence of Api m 10, were coupled. Additionally, an ELISA was used to verify IgG epitopes that were identified in the Macroarray.

IgE binding was assessed in sera from HBV-allergic patients prior to initiation of SIT, who displayed sIgE reactivity against Api m 10 ($>0.35\text{kAU/l}$) as determined by ImmunoCAP (Api m 10-specific IgE, median [range]: 3.79 [0.59-66.6] kUA/l; $n=40$). All patient sera showed positive IgE reactivity for rApi m 10 (5.37 [0.17-24] kUA/l) in macroarray analysis, which correlated with values obtained by ImmunoCAP ($r=0.4792$, $p<0.01$). Individual sera showed IgE reactivity to up to 29 Api m 10 peptides. Three Api m 10 peptides were identified that were recognized by more than 40% of the sera tested. One peptide, peptide 54 (amino acid sequence: ADSDVTTLPTLIGKN), was bound by 100% of Api m 10-positive sera and thus represents a dominant linear IgE epitope of Api m 10. Correlation of Api m 10-specific IgE (determined by ImmunoCAP) and P54-specific IgE (determined by Macroarray) displayed a positive correlation ($r=0.78$, $p<0.0001$).

The binding profile of Api m 10 peptides against IgG-Antibodies was investigated at one time point before and one time point during or after completed SIT in sera of HBV-allergic patients ($n=8$, 2nd time point: 1 - 4 years after therapy initiation). Here, a broad IgG reactivity was observed. For some Api m 10 peptides an induction of sIgG during SIT could be detected on average (peptides 1 - 16, peptide 54). In general, a high sIgG-Titer against peptide 54 was found, but induction during therapy was absent in most patients (mean: 3488.75 kUA/l (before SIT), 3893.75 kUA/l (during/after SIT)). Broad IgG-reactivity was confirmed by ELISA. A significant induction of sIgG against individual peptides could not be seen. Likewise, no clear overlap of IgE and IgG epitopes could be shown.

Interestingly, one patient, patient 3, showed a significant increase of sIgG against Api m 10 measured by ImmunoCAP (ImmunoCAP: <0.02 mgA/I (before SIT); 1.84 mgA/I (during/after SIT)) despite therapy with the venom preparation *ALK lyophilisiert*, a preparation that so far does not contain Api m 10. A possible explanation for this could be his work as a beekeeper and the associated increased risk of a sting event.

The lack of Api m 10 in therapeutic bee venom preparations could be compensated by recombinantly synthesized Api m 10. Due to the instability of Api m 10, the identification of an important Api m 10 IgE epitope, such as peptide 54, may be of great importance for the improvement of therapy and have an equally great utility for diagnostic purposes. Larger patient cohorts are needed to investigate the practicability of this approach and to establish the method of epitope mapping by Macroarray. IgG-Epitopes should be analyzed in a larger cohort of patients receiving an Api m 10-containing HBV preparation for SIT, as should an induction of IgG antibodies under SIT, especially of the subgroup IgG4, be examined.

9. Verzeichnisse

9.1. Abkürzungsverzeichnis

ACE	engl.: angiotension-converting enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
Api m	<i>Apis mellifera</i>
BG (A)	Bienengift- (Allergiker)
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CCD	engl.: cross-reactive carbohydrate determinants (kreuzreagierende Kohlenhydratseitenketten)
CPDA	engl.: citrate phosphate dextrose adenine
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
etc.	et cetera (und die übrigen)
ggf.	gegebenenfalls
HBV	engl.: honey bee venom (Honigbienengift)
HBG	Honigbienengift
HUZZELL	humane und zelluläre Immunantwort (Name der Studie)
HRP	engl.: horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
ImmunoCAP	In-vitro-Test zur Bestimmung von IgE-Antikörpern gegen Allergene (entwickelt von Phadia AB, Uppsala, Schweden)
min.	Minuten
nApi	natürlich gewonnenes Bienengift-Einzelallergen
P	Peptid
Pat.	Patient
DPBS	engl.: Dulbeccos phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
rApi	rekombinat hergestelltes Bienengift-Einzelallergen
rpm	engl.: rounds per minute (Runden pro Minute)
slg	spezifische Immunglobuline
SIT	spezifische Immuntherapie
sys.	systolisch
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
u.a.	und andere
UKGM	Uniklinikum Gießen und Marburg
Ves v	<i>Vespula vulgaris</i>

°C	Grad Celsius
β-Blocker	β-Rezeptoren blockierendes Medikament

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Angriffspunkte diagnostischer Tests	7
Abbildung 2: Api m 10 Peptid Array.....	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Macroarray	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung des IgG ELISA.....	28
Abbildung 5: Korrelation des spezifischen IgE gegen Api m 10 gemessen mittels ImmunoCAP oder Macroarray.	30
Abbildung 6: Korrelation der sIgE-Reaktivität gegen Api m 10 mit der Anzahl der Peptide, die mittels Macroarray detektiert wurden	31
Abbildung 7: Prozentualer Anteil der Seren von Bienengift (BG)-allergischen Patienten, die das jeweilige Api m 10-Peptid gebunden haben.	32
Abbildung 8: Spezifisches IgE gegen die Api m 10-Peptide bei Bienengift-allergischen Patienten gemessen mittels Macroarray.....	33
Abbildung 9: Anteil des spezifischen IgE gegen die dominanten Peptide (Peptid 3, Peptid 53, Peptid 54 und Peptid 55) am spezifischen IgE gegen Api m 10 (Gesamtprotein).	33
Abbildung 10: Vergleich der Intensitäten der dominanten Api m 10 Peptide Peptid 3, Peptid 53, Peptid 54 und Peptid-55 bei BG-allergischen Patienten (n=40) gemessen mittels Macroarray.....	34
Abbildung 11: Korrelation des spezifischen IgE gegen Api m 10 mit dem spezifischen IgE gegen das Peptid-54 bei BG-allergischen Patienten gemessen mit Hilfe des Macroarray	35
Abbildung 12: Inhibition der IgE-Reaktivität der Api m 10-Peptide durch rApi m 10. ...	36
Abbildung 13: Inhibition der IgE-Reaktivität gegen Api m 10 durch das Peptid 54	37
Abbildung 14: (A) Vergleich der IgG-Reaktivitäten gegen die Einzelallergene des Bienengiftes, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 10 vor (orange) und während/nach (blau) SIT gemessen mittels Macroarray (n=8). (B) Vergleich der IgG-Reaktivitäten	

gegen die Api m 10-Peptide vor (orange) und während/nach (blau) SIT gemessen mittels Macroarray (n=8).....	39
Abbildung 15: Vergleich der IgG-Reaktivitäten gegen die Api m 10-Peptide 1- 16 bei den Patienten 1, 10, 16 und 38 gemessen mit Hilfe des Macroarray.	41
Abbildung 16: Vergleich der IgG-Reaktivität gegen die Api m 10-Peptide bei Patient 3 zu einem Zeitpunkt vor SIT mit einem Zeitpunkt während bzw. nach abgeschlossener SIT.....	43
Abbildung 17: (A) Vergleich der spezifischen IgG-Reaktivität gegen Api m 10 vor und während bzw. nach abgeschlossener SIT bei Patient 1, 3, 10, 16 und 38 gemessen mittels Macroarray. (B) Vergleich der spezifischen IgG-Reaktivität gegen das Peptid 54 vor und während bzw. nach abgeschlossener SIT bei Patient 1, 3, 10, 16 und 38 gemessen mittels Macroarray	44
Abbildung 18: Vergleich der optischen Dichte der Negativ- und Positivkontrollen des IgG-ELISA gemessen bei 450 nm.....	45
Abbildung 19: IgG-ELISA der Api m 10-Peptide gemessen bei 450 nm (n=12). Dargestellt wird das geometrische Mittel der optischen Dichte der einzelnen Peptide im IgG-ELISA jeweils vor (orange) und während/nach (blau) SIT	46
Abbildung 20: (Links) Die Peptidsequenz von P-54 lautet ADSDVTTLPTLIGKN. Austausch jeweils einer Aminosäure gegen Alanin [A]. (Rechts) Biotinylierte Peptide (P54.1- P54.14) binden an mit Neutravidin beschichtete Platten. Nach Zugabe von Api m 10+ Seren wurde ein HRP-markierter Anti-IgE-Sekundärantikörper aufgetragen und die IgE-Reaktivität mittels ELISA gemessen.....	49

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade einer Anaphylaxie.....	4
Tabelle 2: Übersicht zu Risikogruppen, die einer häufigen Exposition unterliegen und Risikofaktoren für eine Anaphylaxie.....	5
Tabelle 3: Übersicht der weltweit zur spezifischen Immuntherapie zugelassenen, therapeutischen BG-Präparate	11
Tabelle 4: Übersicht der Einzelallergene des Bienengiftes <i>Apis mellifera</i> nach der WHO/IUIS Allergen Nomenklatur.....	14
Tabelle 5: Demographische und klinische Daten des Patientenkollektivs für den Macroarray	23
Tabelle 6: Aminosäuresequenzen der 64 15-mer Peptide des Api m10 mit einer Überlappung von je 12 Aminosäuren.....	25
Tabelle 7: Spezifisches IgG4 gegen Api m 10 gemessen mittels ImmunoCAP	38
Tabelle A-1: Übersicht des in der Studie eingeschlossenen Patientenkollektivs	75

9.4. Literaturverzeichnis

- Ahmad, T. A., Eweida, A. E., & Sheweita, S. A. (2016). B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. *Trials in Vaccinology*, 5: 71–83
- Akarsu, A., Ocak, M., Sahiner, U. M., Soyer, O., & Sekerel, B. E. (2022). Multiplex component-based allergen macroarray test is useful to predict clinical reactivity to tree nuts in children. *Allergology International*, 71: 236–247
- Andersen, D. C., Koch, C., Jensen, C. H., Skjødt, K., Brandt, J., & Teisner, B. (2004). High prevalence of human anti-bovine IgG antibodies as the major cause of false positive reactions in two-site immunoassays based on monoclonal antibodies. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 25: 17–30
- Aparecido dos Santos-Pinto, J. R., Delazari dos Santos, L., Arcuri, H. A., Ribeiro da Silva Menegasso, A., Pêgo, P. N., Santos, K. S., Castro, F. M., Kalil, J. E., De-Simone, S. G., & Palma, M. S. (2015). B-cell linear epitopes mapping of antigen-5 allergen from *Polybia paulista* wasp venom. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135: 264-267.e8
- Arzt, L., Bokanovic, D., Schrautzer, C., Schwarz, I., Laipold, K., Aberer, W., & Sturm, G. J. (2017). Questionable diagnostic benefit of the commercially available panel of bee venom components. *Allergy*, 72: 1419–1422
- Bilo, B. M., Rueff, F., Mosbech, H., Bonifazi, F., & Oude-Elberink, J. N. G. (2005). Diagnosis of hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60: 1339–1349
- Bilò, M. B., Antonicelli, L., & Bonifazi, F. (2012). Honeybee venom immunotherapy: certainties and pitfalls. *Immunotherapy*, 4: 1153–1166
- Blank, S., Etzold, S., Darsow, U., Schiener, M., Eberlein, B., Russkamp, D., Wolf, S., Graessel, A., Biedermann, T., Ollert, M., & Schmidt-Weber, C. B. (2017). Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13: 2482–2489

-
- Blank, S., Haemmerle, S., Jaeger, T., Russkamp, D., Ring, J., Schmidt-Weber, C. B., & Ollert, M. (2019). Prevalence of hymenoptera venom allergy and sensitization in the population-representative german KORA cohort. *Allergo Journal International*, 28: 83–191
- Blank, S., Seismann, H., Michel, Y., McIntyre, M., Cifuentes, L., Braren, I., Grunwald, T., Darsow, U., Ring, J., Bredehorst, R., Ollert, M., & Spillner, E. (2011). Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy*, 66: 1322–1329
- Bøgh, K. L., Nielsen, H., Eiwegger, T., Madsen, C. B., Mills, E. N. C., Rigby, N. M., Szépfalusi, Z., & Roggen, E. L. (2014). IgE versus IgG4 epitopes of the peanut allergen Ara h 1 in patients with severe allergy. *Molecular Immunology*, 58: 169–176
- Bröker, B., Schütt, C., & Fleischer, B. (2019). *Grundwissen Immunologie*, 4. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin (Deutschland)
- Burzyńska, M., & Piasecka-Kwiatkowska, D. (2021). A review of honeybee venom allergens and allergenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 8371
- Crespo, J. F., Bueno, C., Villalba, M., Monaci, L., Cuadrado, C., Novak, N., & Cabanillas, B. (2021). Epitope mapping of the major allergen 2S albumin from pine nut. *Food Chemistry*, 339: 127895
- Flinterman, A. E., Knol, E. F., Lencer, D. A., Bardina, L., den Hartog Jager, C. F., Lin, J., Pasmans, S. G. M. A., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Sampson, H. A., van Hoffen, E., & Shreffler, W. G. (2008). Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121: 737-743.e10
- Frick, M., Fischer, J., Helbling, A., Ruëff, F., Wiczorek, D., Ollert, M., Pfützner, W., Müller, S., Huss-Marp, J., Dorn, B., Biedermann, T., Lidholm, J., Ruecker, G., Bantleon, F., Miehe, M., Spillner, E., & Jakob, T. (2016). Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138: 1663-1671.e9

-
- Gershoni, J. M., Roitburd-Berman, A., Siman-Tov, D. D., Tarnovitski Freund, N., & Weiss, Y. (2007). Epitope Mapping. *BioDrugs*, 21: 145–156
- Golden, D. B. K., Kagey-Sobotka, A., & Lichtenstein, L. M. (2000). Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105: 385–390
- Govindaraj, D., Sharma, S., Gaur, S. N., Lavasa, S., Prasad, N., & Arora, N. (2016). Immunogenic peptides: B & T cell epitopes of Per a 10 allergen of *Periplaneta americana*. *Molecular Immunology*, 80: 24–32
- Güven, E., Duus, K., Lydolph, M. C., Jørgensen, C. S., Laursen, I., & Houen, G. (2014). Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. *Journal of Immunological Methods*, 403: 26–36
- Heffler, E., Puggioni, F., Peveri, S., Montagni, M., Canonica, G. W., & Melioli, G. (2018). Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organization Journal*, 11: 7
- Hoffman, D. R., & Jacobson, R. S. (1984). Allergens in hymenoptera venom. XII: How much protein is in a sting. *Annals of Allergy*, 52: 276-278
- Hofmaier, S., Comberiat, P., & Matricardi, P. M. (2014). Immunoglobulin G in IgE-mediated allergy and allergen-specific immunotherapy. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 46: 6-11
- Jakob, T., Müller, U., Helbling, A., & Spillner, E. (2017). Component resolved diagnostics for hymenoptera venom allergy. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, 17: 363–372
- Jakob, T., Rauber, M. M., Perez-Riverol, A., Spillner, E., & Blank, S. (2020). The honeybee venom major allergen Api m 10 (Icarapin) and its role in diagnostics and treatment of hymenoptera venom allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 20: 48
- Jappe, U., Raulf-Heimsoth, M., Hoffmann, M., Burow, G., Hubsch-Muller, C., & Enk, A. (2006). In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for

-
- cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy*, 61: 1220–1229
- Kaufmann, S. (2014). *Basiswissen Immunologie*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin (Deutschland)
- King, T. P., Jim, S. Y., Monsalve, R. I., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M., & Spangfort, M. D. (2001). Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen Antigen 5s. *The Journal of Immunology*, 166: 6057–6065.
- Kleine-Tebbe, J., Ackermann-Simon, J., & Hanf, G. (2012). Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen zwischen wissenschaftlichem Fortschritt und medizinischer Versorgungsrealität. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 55: 343–350
- Klimek, L., Vogelberg, C., & Werfel, T. (2019). *Weißbuch Allergie in Deutschland*, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin (Deutschland)
- Köhler, J., Blank, S., Müller, S., Bantleon, F., Frick, M., Huss-Marp, J., Lidholm, J., Spillner, E., & Jakob, T. (2014). Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133: 1383-1389.e6.
- Lin, J., & Sampson, H. A. (2017). IgE epitope mapping using peptide microarray immunoassay. *Methods in Molecular Biology*, 1592: 177–187
- Macroarray Diagnostics GmbH. (o. J.). <https://www.macroarraydx.com/de/company>, zuletzt abgerufen am 19.06.2023
- Mahler, V., Kleine-Tebbe, J., & Vieths, S. (2020). Immuntherapien von Allergien: Aktueller Stand. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 63: 341–1356
- Mamessier, E., Birnbaum, J., Dupuy, P., Vervloet, D., & Magnan, A. (2006). Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 36: 704–713

-
- Mauss, V. (2008). Bionomie und Abwehrverhalten der in Deutschland vorkommenden allergologisch bedeutsamen Bienen und Faltenwespen. *Der Hautarzt*, 59: 84–193
- Müller, U. (1990). *Insect sting allergy*, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (Deutschland)
- Nakagawa, T., & Miyamoto, T. (1985). The role of IgG4 as blocking antibodies in asthmatics and in bee keepers. *International Archives of Allergy and Immunology*, 77: 204–205
- Ozdemir, C., Kucuksezer, U. C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2011). Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clinical & Experimental Allergy*, 41: 1226–1234
- Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., Soldatova, L., Slater, J., Mueller, U., & Markovic-Housley, Z. (2007). Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *Journal of Molecular Biology*, 368: 742–752
- Pang, S. L., Matta, S. A., Sio, Y. Y., Ng, Y. T., Say, Y.-H., Ng, C. L., & Chew, F. T. (2021). IgE-binding residues analysis of the house dust mite allergen Der p 23. *Scientific Reports*, 11: 921
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., de Graaf, D. C., Devreese, B., Van Beeumen, J., & Jacobs, F. J. (2005). The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1752: 1–5
- Pereira Santos, M. C., Lourenco, T., Pereira Barbosa, M., & Branco Ferreira, M. (2020). Evolution of Api m10 specific IgE and IgG4 after one year of bee venom immunotherapy. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 52: 175-181
- Przybilla, B., Ruëff, F., Walker, A., Rärer, H. C., Aberer, W., Bauer, C. P., Berdel, D., Biedermann, T., Brockow, K., Forster, J., Fuchs, T., Hamelmann, E., Jakob, T., Jarisch, R., Merk, H. F., Müller, U., Ott, H., Sitter, W., Urbanek, R., & Wedi, B.

-
- (2012). Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. *Allergologie*, 35: 563–589
- Renz, H., Biedermann, T., Bufe, A., Eberlein, B., Jappe, U., Ollert, M., Petersen, A., Kleine-Tebbe, J., Raulf-Heimsoth, M., Saloga, J., Werfel, T., & Worm, M. (2010). In-vitro-Allergiediagnostik. *Allergo Journal*, 19: 110-125
- Ring, J. (2012). Davos Declaration: Allergy as a global problem. *Allergy*, 67: 141-143
- Ring, J., Beyer, K., Biedermann, T., Bircher, A., Fischer, M., Fuchs, T., Heller, A., Hoffmann, F., Huttegger, I., Jakob, T., Klimek, L., Kopp, M. V., Kugler, C., Lange, L., Pfaar, O., Rietschel, E., Ruëff, F., Schnadt, S., Seifert, R., ... Brockow, K. (2021). Leitlinie zu Akuttherapie und Management der Anaphylaxie – Update 2021. *Allergologie*, 44: 356-388
- Robotham, J. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K., & Roux, K. H. (2002). Linear IgE epitope mapping of the english walnut (*Juglans regia*) major food allergen, Jug r 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109: 143-149
- Roesch, A., Boerzsoenyi, J., Babilas, P., Landthaler, M., & Szeimies, R.-M. (2008). Outcome survey of insect venom allergic patients with venom immunotherapy in a rural population. *JDDG*, 6: 292-297
- Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and methods for T- and B-Cell epitope prediction. *Journal of Immunology Research*, 2017: 1-14
- Schäfer, T. (2009). Epidemiologie der Insektengiftallergie. *Allergo Journal*, 18: 353–358
- Schäfer, T., & Przybilla, B. (1996). IgE antibodies to hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. *Allergy*, 51: 372-377
- Schmidt, M., Weimer, E. T., Sakell, R. H., & Hoffman, D. R. (2005). Proteins in the high molecular weight fraction of honeybee venom. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115: 107

-
- Seismann, H., Blank, S., Braren, I., Greunke, K., Cifuentes, L., Grunwald, T., Bredehorst, R., Ollert, M., & Spillner, E. (2010). Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of α -1,3-core fucosylation. *Molecular Immunology*, 47: 799-808
- Shamji, M. H., James, L. K., & Durham, S. R. (2011). Serum immunologic markers for monitoring allergen-specific immunotherapy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 31: 311-323
- Shamji, M. H., Ljørring, C., Francis, J. N., A Calderon, M., Larché, M., Kimber, I., Frew, A. J., Ipsen, H., Lund, K., Würtzen, P. A., & Durham, S. R. (2012). Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy*, 67: 217-226
- Shreffler, W. G., Beyer, K., Chu, T. H. T., Burks, A. W., & Sampson, H. A. (2004). Microarray immunoassay: Association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113: 776-782
- Shreffler, W. G., Lencer, D. A., Bardina, L., & Sampson, H. A. (2005). IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116: 893-899
- Spillner, E., Blank, S., & Jakob, T. (2014). Hymenoptera allergens: From venom to „venome“. *Frontiers in Immunology*, 5: 77
- Sturm, G. J., Varga, E. M., Roberts, G., Mosbech, H., Bilò, M. B., Akdis, C. A., Antolín-Amérigo, D., Cichočka-Jarosz, E., Gawlik, R., Jakob, T., Kosnik, M., Lange, J., Mingomataj, E., Mitsias, D. I., Ollert, M., Oude Elberink, J. N. G., Pfaar, O., Pitsios, C., Pravettoni, V., ... Muraro, A. (2018). EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 73: 744–764
- Sub-Committee, W. A. N. (2023). *WHO/IUIS Allergen Nomenclature Homepage*. <http://www.allergen.org>, abgerufen zuletzt am 19.06.2023
- Suerbaum, S., Kaufmann, S., Burchard, G.-D., & Schulz, T. (2009). *Medizinische*

Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Verlag, Berlin (Deutschland)

- Vachová, M., Panzner, P., Kopač, P., Stojkovič, U. B., & Korošec, P. (2018). Routine clinical utility of honeybee venom allergen components. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 6: 2121-2123
- Valenta, R., Campana, R., & Niederberger, V. (2017). Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes. *Immunology Letters*, 189: 19-26
- Van Regenmortel, M. H. V. (2009). What is a B-cell epitope? *Methods in Molecular Biology*, 524: 3-20
- Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., & de Graaf, D. C. (2014). Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *Journal of Proteomics*, 99: 169-178
- Vickery, B. P., Lin, J., Kulis, M., Fu, Z., Steele, P. H., Jones, S. M., Scurlock, A. M., Gimenez, G., Bardina, L., Sampson, H. A., & Burks, A. W. (2013). Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131: 128-134
- Zahirović, A., Koren, A., Kopač, P., Štrukelj, B., Korošec, P., & Lunder, M. (2019). Identification of bee venom Api m 1 IgE epitopes and characterization of corresponding mimotopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143: 791-794
- Zieglmayer, P., Focke-Tejkl, M., Schmutz, R., Lemell, P., Zieglmayer, R., Weber, M., Kiss, R., Blatt, K., Valent, P., Stolz, F., Huber, H., Neubauer, A., Knoll, A., Horak, F., Henning, R., & Valenta, R. (2016). Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy. *EBioMedicine*, 11: 43-57

10. Anhang

10.1. Patientenkollektiv

Tabelle A-1: Übersicht des in der Studie eingeschlossenen Patientenkollektivs. Patient 16 wird in dieser Übersicht nicht aufgelistet, da dieser aufgrund mangelnder Serummenge nicht in den IgE Array eingeschlossen werden konnte.

Patientenserum	Api m 10 spezifisches IgE [kU _A /l]	P-54 spezifisches IgE [kU _A /l]	Anzahl erkannter Peptide
Patient 1	2,18	2,54	10
Patient 2	0,40	0,38	2
Patient 3	1,62	1,25	8
Patient 4	18,08	2,02	15
Patient 5	5,35	7,58	5
Patient 6	5,47	4,5	6
Patient 7	6,51	9,87	3
Patient 8	7,85	9,74	2
Patient 9	8,39	2,69	13
Patient 10	6,16	15,65	9
Patient 11	15,55	14,16	22
Patient 12	1,41	2,72	3
Patient 13	3,75	6,33	5
Patient 14	24,65	27,68	13
Patient 15	17,11	4,44	29
Patient 17	13,73	19,81	7
Patient 18	3,46	2,91	4
Patient 19	22,53	19,62	14
Patient 20	22,90	19,95	19
Patient 21	14,23	2,46	28
Patient 22	2,66	1,08	9
Patient 23	9,12	10,71	8
Patient 24	18,90	22,65	9
Patient 25	3,53	6,47	2
Patient 26	14,36	9,05	18
Patient 27	3,80	6,98	4
Patient 28	1,83	1,89	5
Patient 29	9,65	12,27	2
Patient 30	6,70	5,76	18
Patient 31	3,11	4,72	3
Patient 32	4,71	6,23	15
Patient 33	0,56	1,43	5
Patient 34	15,04	17,21	4
Patient 35	11,91	1,68	11
Patient 36	0,38	0,69	4
Patient 37	1,06	2,58	2
Patient 38	7,57	1,14	4
Patient 39	3,72	6,84	10
Patient 40	3,34	12,23	3
Patient 41	1,58	1,64	3

10.2. Publikationen und Preise

Publikation

Rauber MM, **Roßbach A**, Jung A, Müller S, Möbs C, Pfützner W, Miehe M, Spillner E, Jakob T. "The honey bee venom allergen Api m 10 displays one major IgE epitope, Api m 10₁₆₀₋₁₇₄". *Allergy*. 2020 Jul;75(7):1756-1759. doi: 10.1111/all.14187. Epub 2020 Feb 5. PMID: 31957885. Impaktfaktor: 13.146

Preise

Mainzer Abstract-Preis der DGAKI, 3. Preis für den Abstract: Rauber MM, **Roßbach A**, Jung A, Müller S, Möbs C, Pfützner W, Miehe M, Spillner E, Jakob T. "The honey bee venom allergen Api m 10 displays one dominant linear IgE epitope in honey bee venom allergic patients". *Verliehen im Rahmen des 15. Deutschen Allergiekongresses vom 24.9.-26.9.2020 in Wiesbaden*

10.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Antonia M. Roßbach

10.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Studie und Verfassung der Arbeit unterstützt haben.

Zunächst gilt ein großer Dank Herrn Professor Thilo Jakob für die Vergabe des interessanten Themas und die Leitung dieser Studie. Die fachlichen Anregungen und Hilfestellungen habe ich sehr geschätzt.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Michèle Rauber-Ellinghaus für die Betreuung der Arbeit in den ersten zwei Jahren und die damit verbundene Einführung in die Thematik und Laborarbeit bedanken.

Für die spontane Übernahme der Betreuung im Anschluss bin ich Herrn Dr. Igor Hrgovic sehr dankbar. Die vielen Ratschläge und motivierenden Worte wusste ich sehr zu schätzen.

Ein außerordentlicher Dank gilt Britta Dorn, die mir jederzeit geduldig meine Fragen beantwortet hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Danke für die vielen hilfreichen Tipps bei der Durchführung des ELISA und die netten gemeinsamen Pausen.

Des Weiteren danke ich allen ärztlichen und technischen Mitarbeiter*innen der Allergologie des Uniklinikums Gießen, vor allem Herrn Professor Andreas Jung, für die Rekrutierung der Patienten und die Durchführung der Blutentnahmen im Rahmen der Studie.

Außerdem danke ich den Mitarbeiter*innen der Kollaborationszentren aus den Unikliniken Freiburg und Marburg.

Bei der Firma Macro Array Diagnostics GmbH bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und Produktion der Arraychips für diese Studie.

Abschließend danke ich ganz besonders meiner Familie und meinen Freunden für die stetige Unterstützung und den Rückhalt in der gesamten Zeit.