

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Nachweis des α -Gal-Epitops auf Proteinen in Giften
verschiedener Schlangenspezies**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stenzl, Anna Katharina**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Fischer

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. J. Held

Tag der Disputation: 16.12.2024

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	I
1 EINLEITUNG	1
1.1. SCHLANGENBISSE - EINE VERGESSENE KRANKHEIT	1
1.1.1. Behandlung/Herausforderung – Gegengifte	2
1.1.2. Gifte sind selbst in der Lage Allergien hervorzurufen	3
1.2. ALLERGIEN UND DIE TOXINHYPOTHESE.....	4
1.3. ALLGEMEIN	4
1.3.1. Die Toxinhypothese	4
1.3.2. Das Toxin als Allergen	6
1.3.2.1. α -Gal als Allergen	7
1.3.3. α-Gal, Cetuximab und Zecken	8
1.3.4. α-Gal, Zecken und Fleischallergie	9
1.3.4.1. Pathophysiologie der α -Gal- Sensibilisierung.....	10
1.3.4.2. α -Gal, Transplantate und Gummibärchen.....	11
1.3.4.3. α -Gal und Schlangengift	13
1.4. ZIEL DER ARBEIT UND EXPERIMENTELLES DESIGN	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1. MATERIAL.....	15
2.1.1. Geräte	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2.1. Schlangengifte.....	16
2.1.2.2. Patientenserumproben.....	17
2.1.3. Reagenzien und Antikörper	18
2.1.3.1. Reagenzien.....	18
2.1.3.2. Antikörper.....	20
2.1.4. Medien und Puffer	20
2.2. METHODEN	22
2.2.1. Immunoblot	22
2.2.1.1. Bradford Assay.....	22
2.2.1.2. Blue Stain-Gel	23
2.2.1.3. Immunoblot mit 2 verschiedenen anti- α -Gal-Antikörpern	24
2.2.2. Präparative Gele	29
2.2.2.1. Präparatives Gel mit Gift der <i>Naja mossambica</i> und Patientenserum.....	29
2.2.3. Immunoblot mit allen Giften und dem Poolserum	31
2.2.4. Proteinanalyse mittels MALDI-TOF	31
2.2.5. ELISAs	33
2.2.5.1. ELISA der <i>Naja kaouthia</i>	33
2.2.5.2. ELISAs mit fraktionierten Schlangengiftproben.....	34
2.2.5.3. Inhibitions-ELISA.....	35

2.2.6. CAP-Inhibition mit Schlangengiften	35
3 ERGEBNISSE	38
3.1. IMMUNOBLLOT	38
3.1.1. Bradford-Assay	38
3.1.2. Blue Stain Gel	39
3.1.3. Immunoblot mit 2 verschiedenen Antikörpern	40
3.2. MALDI-TOF	44
3.2.1. Immunoblot	44
3.2.2. SYPRO Ruby Stain	47
3.2.2.1. Picking und MALDI-TOF Analyse	48
3.3. PREPARATIVES GEL MIT GIFT DER <i>NAJA MOSSAMBICA</i> UND PATIENTENSEREN	55
3.4. IMMUNOBLLOT MIT ALLEN GIFTEN UND POOLSERUM	57
3.5. CAP-INHIBITION MIT α -GAL POSITIVEN SCHLANGENGIFTEN	58
3.5.1. Effekte von Schlangengift auf IgE	58
3.5.2. Immuno-CAP-Inhibition	60
3.6. ELISAS	66
3.6.1. Ergebnisse des ELISAs der <i>Naja kaouthia</i> , unfraktioniert	66
3.6.2. ELISA mit diversen Schlangengiftfraktionen	67
3.6.3. Inhibitions-ELISA mit diversen Schlangengiftfraktionen	69
4 DISKUSSION	74
4.1. DIE TOXIN-HYPOTHESE DER ALLERGIE	78
4.2. α -GAL UND SCHLANGENGIFT	80
4.2.1. Identifikation α -Gal tragender Proteine in Schlangengiften	81
4.2.2. Allergische Reaktionen auf Schlangengifte durch α -Gal	83
4.2.3. Das α -Gal-Syndrom	84
4.3. AUSBLICK	86
5 ZUSAMMENFASSUNG	89
LITERATURVERZEICHNIS	91
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
TABELLENVERZEICHNIS	103
6 ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL	104
7 DANKSAGUNG	104
ANHANG	105

Abkürzungen

<i>4xMG</i>	<i>beta-mercapto-glycerol 4x sample buffer</i>
<i>5'NUC</i>	<i>Snake venom 5'-nucleotidase</i>
<i>Agk c</i>	<i>Agkistrodon contortrix contortrix (USA)</i>
<i>AK</i>	<i>Antikörper</i>
<i>AP</i>	<i>Alkalische Phosphatase</i>
<i>BAT</i>	<i>Basophilenaktivierungstest</i>
<i>Bit g</i>	<i>Bitis gabonica gabonica (Burundi)</i>
<i>Bot a</i>	<i>Bothrops asper (Ecuador)</i>
<i>cast</i>	<i>Cellular antigen stimulations test</i>
<i>CCD</i>	<i>Kreuzreagierende Kohlenhydrat-Determinanten</i>
<i>CCR3</i>	<i>C-C-Chemokinrezeptor Typ 3</i>
<i>CD63</i>	<i>Clusters of Differentiation 63</i>
<i>CEA</i>	<i>carcinoembryonalen Antigen-verwandten Zelladhäsionsmolekül 8-ähnlichem Protein (Notechis scutatus)</i>
<i>CVF</i>	<i>Cobra venom factor</i>
<i>Dab r</i>	<i>Daboia russelii russelii (Pakistan)</i>
<i>Den p</i>	<i>Dendroaspis polylepis (Kenya)</i>
<i>Endonuclease</i>	<i>Endonuclease domain-containing 1 protein</i>
<i>ENPP3</i>	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 isoform X5</i>
<i>Fab</i>	<i>fragment antigen binding</i>
<i>GGTA1</i>	<i>Glycoprotein Galactosyltransferase alpha 1, 3 Gen</i>
<i>H₂Oup</i>	<i>Ultrareines Wasser</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>Konz.</i>	<i>Konzentration</i>
<i>LAAO</i>	<i>L-amino acid oxidase</i>
<i>MGW</i>	<i>Molekulargewicht</i>

<i>MOA</i>	<i>Marassmium</i>
<i>Naj h</i>	<i>Naja haje (Morocco)</i>
<i>Naj k</i>	<i>Naja kaouthia (Thailand)</i>
<i>Naj m</i>	<i>Naja mossambica (South Africa)</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
<i>Not s</i>	<i>Notechis scutatus (Australia)</i>
<i>OD</i>	<i>Optische Dichte</i>
<i>OVF</i>	<i>Ophiophagus venom factor</i>
<i>PAMP</i>	<i>Pathogen-assoziierte molekulare Muster</i>
<i>PE</i>	<i>Phycoerythrin</i>
<i>PLA2</i>	<i>Phospholipase A2</i>
<i>PRR</i>	<i>Pattern-Recognition-Rezeptoren</i>
<i>PSG5</i>	<i>Pregnancy Specific Beta-1-Glycoprotein 5 (schwangerschaftsspezifisches beta-1-Glykoprotein 5) (Ophiophagus hannah)</i>
<i>SG</i>	<i>Schlangengift</i>
<i>SVMP, ATR</i>	<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A</i>
<i>SVMP, KAO</i>	<i>Hemorrhagic metalloproteinase-disintegrin-like kaouthiagin</i>
<i>SVMP, MDC</i>	<i>Hypothetisches Protein welches mit dem Zink-Metalloproteinase-Disintegrin-ähnlichen Protein verwandt ist</i>
<i>SVMP, MOC</i>	<i>Snake venom metalloproteinase-disintegrin-like mocarhagin</i>
<i>SVPDE</i>	<i>Venom phosphodiesterase</i>
<i>SVSP</i>	<i>Snake venom serine protease</i>
<i>TBS</i>	<i>Tris-buffered saline</i>
<i>TBST</i>	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
<i>TG</i>	<i>Thyreoglobulin</i>
<i>TGFβ</i>	<i>Transforming growth factor β</i>
<i>TH2</i>	<i>T-Helferzelle vom Typ 2</i>
<i>Treg</i>	<i>Regulatorische T-Zelle</i>

<i>Vip a</i>	<i>Vipera ammodytes ammodytes (Romania)</i>
<i>α-Gal</i>	<i>Galactose-α-1,3-Galactose-Epitop</i>
<i>α1,3GT</i>	<i>alpha-1,3-Galactosyltransferase</i>

1 Einleitung

1.1. Schlangenbisse - eine vergessene Krankheit

Es ist nicht unüblich beim Anblick einer Schlange sowohl in eine instinktive Angstreaktion als auch in eine unbändige Faszination für diese oft hochgiftigen Lebewesen zu verfallen. Seit Juni 2017 gehören Schlangenbisse erneut der Liste der vernachlässigten Tropenkrankheiten der WHO („WHO's list of neglected tropical diseases“) (Chippaux, 2017) an. Bissreaktionen sind unterschiedlich und gefährlich, sie reichen von einfachen lokalen Reaktionen bis hin zu schweren systemischen Reaktionen mit 81 000–138 000 Todesfällen pro Jahr (Chippaux et al., 2019). Die jährlich 300 000 Überlebenden leiden teils unter schweren Entstellungen und bleibenden Behinderungen.

Die unterschiedliche pathogene Wirkung der Schlangengifte resultiert aus den Zusammensetzungen der Toxine in den Giftstoffen. Diese variieren sowohl zwischen als auch innerhalb der Arten abhängig vom Lebensraum, Alter, Geschlecht und der Beute der Tiere (Oliveira et al., 2022, Tasoulis and Isbister, 2017). Einige verursachen lokale Gewebeschäden, während andere systemische Wirkungen mit neurotoxischen Erscheinungen hervorrufen, u.a. Atemlähmungen, Blutungen, akute Nierenschäden, Rhabdomyolyse, Kardiotoxizität, autonome Hyperaktivität oder Thrombosen (Gutierrez et al., 2017). Die gefährlichsten Arten gehören zu den Familien Viperidae (echte Vipern und Grubenottern) und Elapidae (Elapiden, beispielsweise Kobras, Kraits, Mambas und Seeschlangen). Die Gifte der Schlangen aus der Familie der Viperidae verursachen lokale Schäden wie auch systemische Manifestationen in Verbindung mit Blutungen, Koagulopathien und hypovolämischem Schock, welche unter anderem auf Phospholipasen (PLA2) und Metalloproteinasen (SVMP), C-type lectin-artige (CTL) Proteine und Hyaluronidasen zurückzuführen sind. Schlangengifte der Familie der Elapidae (Elapiden) rufen vorwiegend neurotoxische Erscheinungen hervor, wie z. B.

neuromuskuläre Lähmungen (Warrell, 2010). Dabei spielen vor allem α -Neurotoxine (ein Dreifingertoxin) und β -Neurotoxine (wie die klassische PLA2) eine Rolle. Die Verteilung der unterschiedlichen Giftkompositionen lässt sich nach Oliveira, A. L., et al. in einer groß angelegten Analyse der bekanntesten Schlangengattungen wie folgt einteilen: Absteigend in der Häufigkeit finden sich in der Familie der Elapidae vor allem Dreifingertoxine (3FT), Phospholipasen (PLA2), „Kunitz-type serine protease inhibitor“ (KSPI), Metalloproteinasen (SVMP), „cysteine-rich secretory protein“ (CRiSP), L-Aminooxidasen (LAAO) und Serinproteasen (SVSP). In der Familie der Vipern sind es vor allem (der Häufigkeit nach absteigend): SVMP, PLA2, SVSP, CTL/SNACLEC (C-type lectin und C-type lectin-like protein), LAAO, Natiuretic Peptide (NP), Disintegrin (DIS), CRiSP und Defensine (DEF) (Oliveira et al., 2022).

Ein weiterer wichtiger hämoaktiver Bestandteil in Kobragiften ist der Cobra Venom Factor (CVF). CVF ist komplementaktivierendes Protein mit einer ungefähren Masse von $M_r \sim 149\,000$ Da und Analogie zur Komplementkomponente C3 (Vogel and Fritzinger, 2010). Seit über vier Jahrzehnten gilt es als wichtiges Forschungsobjekt im Zusammenhang mit Wirkungen und Krankheiten im Komplementsystem und dient als Leitsubstanz für die Herstellung von humanen C3-Derivaten mit CVF-ähnlichen Funktionen als experimentelles Therapeutikum zur Komplementdepletion bei Krankheiten mit Komplementpathogenese (humanisierte CVF genannt). CVF kommt in Giften einiger Kobraarten vor wie *Naja kaouthi*, *N. naja*, *N. nivea*, *N. haje*, *N. nigrocollis* und *N. melanoleuca* (Vogel and Fritzinger, 2010).

1.1.1. Behandlung/Herausforderung – Gegengifte

Eine weitere Herausforderungen stellt die Behandlung der Schlangenbisse dar. Diese visiert mehrere Faktoren an und ist u.a. abhängig von der Schlangen(gift)art, der applizierten Giftmenge und der Symptomatik des Patienten. Ein wichtiger Bestandteil der Therapie sind die seit über 100 Jahren eingesetzten Gegengifte. Diese können Immunglobuline oder auch Teile von

Immunglobulinen sein, welche aus Plasma von mit Schlangengiften immunisierten Tieren gewonnen werden. Sie binden und neutralisieren Gifte bzw. deren Wirkung. Ihre parenterale Therapie ist neben supportiven Maßnahmen die Haupttherapie bei Schlangenbissverletzungen (Gutierrez et al., 2009). Unerwünschte Nebenwirkungen werden von der WHO in Frühreaktionen (pyrogene und anaphylaktische Reaktionen) und Spätreaktionen (Serumkrankheit) unterteilt (Leon et al., 2013). Pyrogene Reaktionen treten in der ersten Stunde nach Gegengiftapplikation auf und werden v.a. durch Verunreinigungen der Produkte hervorgerufen, während anaphylaktische Reaktionen IgE und Nicht- IgE- vermittelt auftreten können (Leon et al., 2013, Stone et al., 2013). Hierbei reagieren Patienten der IgE- vermittelten Reaktion auf tierische Proteine in Gegengiften, bei der am häufigsten auftretenden nicht - IgE- vermittelte Reaktionen werden beispielsweise eine antikomplementäre Aktivität des Antivenoms und das Vorhandensein von heterophilen Antikörpern als Erklärungsversuch herangezogen, wobei weiterhin Ungewissheit herrscht (Leon et al., 2013). Bei Spätreaktionen richtet sich das Immunsystem mittels IgG-basierte Antikörperreaktion gegen heterologe Proteine des Gegengifts. Eine Reaktion kann 5 – 20 Tage nach Applikation auftreten (Leon et al., 2013).

1.1.2. Gifte sind selbst in der Lage Allergien hervorzurufen

IgE- vermittelte allergische und anaphylaktische Reaktionen, wie u.a. Urtikaria, Angioödeme und Bronchialobstruktion, konnten für Patienten nach Giftexposition mit Viperarten nachgewiesen werden. Ein Nachweis der spezifischen IgE Antikörper erfolgte mittels RAST und Hauttest (Reimers et al., 2000). Allergische Reaktionen auf Schlangengifte können bis zum Stadium einer Anaphylaxie reichen, die Problematik wird aufgrund der Rarität weiterhin vernachlässigt - zumal auch echte allergische Reaktionen von der eigentlichen Giftwirkung schwer abzugrenzen sind. (Weinstein et al., 2022, Prescott and Potter, 2005, Schmutz and Stahel, 1985, Leon et al., 2013, Mittendorf and Winskog, 2024). Die zuvorige Sensibilisierung stellt ein weiteres Erschwernis

dar, da ein wiederholter Kontakt mit Schlangengift obligatorisch scheint. Allergische Reaktionen wurden vereinzelt nach Aerosolkontakt mit dem Gift von Speikobras beschrieben (Prescott and Potter, 2005). Die gebildeten IgE-Antikörper erhöhen die Empfindlichkeit und Reaktionsfähigkeit von Mastzellen gegenüber spezifischen Antigenen und können somit angeborene Resistenz gegen Gifte verstärken (Galli et al., 2020, Starkl et al., 2016). Profet, Metz et al. und Palm et al. spekulieren, dass IgE-Antikörper auch eine schützende Rolle bei der erworbenen Resistenz gegen Gifte spielen könnte (Profet, 1991, Metz et al., 2006, Palm et al., 2012).

1.2. Allergien und die Toxinhypothese

1.3. Allgemein

Allergien sind weltweit verbreitete Krankheitsbilder, welche saisonbedingt mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad auftreten und zu lebensgefährlichen Reaktionen führen können. Das vereinzelt überschießende Vorgehen des menschlichen Immunsystems gegen bestimmte Allergene verbleibt weithin nicht vollständig geklärt und ist intensiver Gegenstand rezenter Forschung. Wurden Allergene bis ins 20. Jahrhundert noch als Giftstoffe verstanden, so verleiht man ihnen nun einen komplett neuen Stellenwert, der nicht ausschließlich negativ behaftet ist.

1.3.1. Die Toxinhypothese

Die Evolutionsbiologin Margie Profet vertrat 1991 die Theorie, dass allergische Reaktionen einen möglichen Selektionsvorteil durch die Elimination aufgenommener Toxine bieten (Profet, 1991). Die beschriebene Toxinhypothese stützt sich auf die Theorie, dass die innerhalb von Minuten bis Stunden auftretenden, durch IgE hervorgerufenen allergischen Reaktionen des Körpers

wie beispielsweise Erbrechen, Diarrhö, Husten, Tränenfluss, Rhinitis, Niesen und Kratzen dem Körper dabei helfen, toxische Substanzen zu eliminieren und schnellstmöglich wieder auszusondern. Ein supprimierter Blutdruck, wie er zum Beispiel bei starken allergischen Reaktionen vorkommt, verhindert hierbei eine fatale Zirkulation der schädigenden Toxine. Im Laufe weiterer Anpassungsvorgänge hätte ein Individuum einen Überlebensvorteil, welches sich des Toxins schnell entledigen und eine Aggravation verhindern könnte. Profets Toxinhypothese als Verteidigungsmechanismus des Körpers gegen Gifteinwirkungen stützt sich auf mehrere Eigenschaften von schädlichen Substanzen, wie ihr beispielsweise allgegenwärtiges Auftreten. Sie können sowohl einen akuten Schaden erzeugen als auch über längere Zeit kumulativ schädlich auf den Körper einwirken wie es bei mutagenen oder karzinogenen Substanzen der Fall ist. Die Fähigkeit exogener Substanzen, kovalente Bindungen mit Serumproteinen einzugehen, beschreibt Profet als korrelierenden Triggerfaktor für allergische Reaktionen. Derartige kovalente Bindungen korrelieren neben der Allergenität auch mit ihrer Toxizität, Mutagenität und Karzinogenität.

Einen ähnlichen Ansatz vertreten auch Daschner und Fernandez. Sie greifen erneut Profet's Toxintheorie auf und vereinen diese mit dem Gefahrenmodell nach Matzinger (Matzinger, 2002) um einen evolutionsbiologischen Zusammenhang zwischen der Entwicklung allergischer Reaktionen und einer Anpassung an Schadstoffe herzustellen (Daschner and Gonzalez Fernandez, 2020).

Belege für ihre Toxinhypothese fand Profet unter anderem im Auftreten von besonders häufig vorkommenden Allergenen. Diese Allergene schließen Charaktereigenschaften wie ein niedermolekulares Gewicht und die Fähigkeit zur kovalente Bindung mit Serumproteinen ein oder sie sind nichttoxische Carrier-Proteine, welche niedermolekulare Toxine transportieren können. Weitere häufige Allergene wären hierbei spezifische hochmolekulare Proteine, die über einen langen Zeitraum der Koexistenz direkten Schaden in Säugetieren anrichten

und einen selektiven Druck auf die Spezies ausüben können. Dies ist beispielsweise der Fall bei Schlangengiften.

1.3.2. Das Toxin als Allergen

Neue Studien konnten eine Toxin-induzierte TH2 abhängige Resistenzentwicklung in Mäusen gegenüber Bienen- und Schlangengift nachweisen (Tsai et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass IgE Antikörper in Mäusen eine Immunität sowohl gegenüber Bienengift als auch einzelnen Giftkomponenten, wie z.B. dem im Bienengift enthaltenen Enzym PLA₂, ermöglichen (Tsai et al., 2015, Galli et al., 2016). Dieser adaptive Vorgang der Resistenzentwicklung könnte die Hypothese einer protektiven allergischen Reaktion als evolutionsbiologischen Anpassungsprozess bekräftigen. In einer Folgestudie wurde Mäusen das Toxin der Kettenviper (*Daboia russelii*) injiziert und der positive Aspekt von IgE, FcεRI und Mastzellen für das Überleben der vergifteten Mäuse nachgewiesen, eine unter normalen umständen letale Dosis kann von den sensibilisierten Mäusen eher überlebt werden (Starkl et al., 2016). Die Antigen-spezifischen IgE- Antikörper gelten dabei als sensibles, spezifisches, schnelles und leistungsfähiges Modul der erworbenen Immunität. Durch diese IgE-vermittelte Resistenz, welche dem Säugetier einen Überlebensvorteil hinsichtlich der Giftexposition des Toxin-produzierenden Lebewesens gewährleistet, verdeutlicht die Koevolution zwischen den genannten Spezies und den positiven Selektionsdruck, der auf die Allergie-ausbildenden Lebewesen wirkt.

Es ist denkbar, dass allergische Reaktionen von Menschen auf ein bestimmtes Allergen ein Relikt eines lange zurückliegenden Anpassungsprozesses auf Toxine sind. Dazu müssten potente Allergene, welche heutzutage vermehrt allergische Reaktionen auslösen, unter anderem in Giften von Tieren nachweisbar sein, die einen signifikant langen Zeitraum mit uns bzw. unseren näheren Vorfahren koexistierten. Auch hier bietet sich das Schlangengift als beispielloses Versuchsobjekt an. Es gilt weiterhin herauszufinden, welche

immunogenen Oberflächenstrukturen für ein derart allergenes Potential verantwortlich gemacht werden könnten.

1.3.2.1. α -Gal als Allergen

Mit einem ungefähren Anteil von 1% der Immunglobuline ist Anti-Gal der am häufigsten natürlich vorkommende Antikörper des menschlichen Organismus (Galili et al., 1984). Die Produktion des dem Blutgruppe B -Antigen ähnlichen Epitops galactose- α 1,3-galactose- β 1-4-GlcNAc-R Epitop (kurz α -Gal), erfolgt kontinuierlich durch ununterbrochene Stimulation der B-Zellen durch Bakterien und die physiologische Flora im Magen-Darm-Trakt (Galili et al., 1988a, Galili et al., 1993, Galili, 2023a). Der Anti- α -Gal-Antikörper kommt darüber hinaus nur in Schmalnasenaffen (oder auch: Altweltaffen), Menschenaffen und Menschen als natürlicher Antikörper vor (Galili et al., 1987, Galili, 2023b). Das α -Gal Epitop hingegen findet man als häufigen Vertreter in Kohlenhydratketten von Glykolipiden und -proteinen bei allen übrigen nicht-primatenartigen Säugetieren, einschließlich Halbaffen und Breitnasenaffen (auch: Neuweltaffen) (Galili et al., 1988b, Galili et al., 1987, Galili, 2023a). Die Glykosylierung der Glykolipide und -proteine mit dem resultierenden α -Gal Epitop wird durch die α 1,3galactosyltransferase (α 1,3GT) katalysiert. Das zugehörige Gen nennt sich α 1,3GT Gen (oder auch *GGTA1*). Dieses Enzym bzw. Gen konnte in Breitnasenaffen, Halbaffen und anderen Nicht-Primaten-Säugetieren nachgewiesen werden, wohingegen Schmalnasenaffen, Menschenaffen und Menschen keine Expression der α 1,3GT mehr aufweisen. Der Verlust des Enzymes und das geschätzte erste Auftreten von Anti-Gal vor ca. 28 Millionen Jahren wird für den Verlust der Immuntoleranz gegenüber dem α -Gal Epitopes verantwortlich gemacht (Galili, 1993, Galili and Swanson, 1991, Galili, 2023b). Welcher Selektionsdruck dazu führte, dass sich diese Individuen ohne Immuntoleranz gegenüber dem α -Gal Epitop weiterentwickelten und welchen Vorteil sie dadurch erlangt haben könnten, wird derzeit diskutiert. Analog zu Profet's Toxinhypothese könnte ein selektiver Vorteil für Menschenaffen darin bestanden haben, dass sie manche pathogene Erreger, welche ein α -Gal

Epitop exprimieren wie beispielsweise Viren (Takeuchi et al., 1996, Galili et al., 1996, Repik et al., 1994, Welsh et al., 1998), Bakterien (Han et al., 2012) und Protozoen (Almeida et al., 1994), schneller erkennen und unschädlich gemacht haben könnten. Dieser Überlebensvorteil könnte durch die verlorengegangene Immuntoleranz gegenüber α -Gal und einer resultierenden und vielleicht protektiven α -Gal-Allergie zustande gekommen sein.

1.3.3. α -Gal, Cetuximab und Zecken

Die Kehrseite dieser überaus praktisch erscheinenden Antikörperfunktion ist jedoch durch eine Vielzahl an immunologischen Krankheiten behaftet, u.a. ausgelöst durch IgE Anti-Gal. Darunter fällt auch die Allergie gegen bereits etablierte Antikörpertherapien oder auch auf Nahrungsmittel wie beispielsweise rotes Fleisch (Commins et al., 2009, Morisset et al., 2012, Chung et al., 2008). Eine wegweisende Entdeckung des spezifischen IgE gegen α -Gal ging aus den allergischen Reaktionen gegen den chimären monoklonalen Antikörper Cetuximab hervor (Chung et al., 2008). Chung und Mirakhur et al. fanden heraus, dass Hypersensibilitätsreaktionen gegen Cetuximab durch bereits zuvor existierende IgE Antikörper vermittelt werden. Diese IgE Antikörper richten sich gegen die chimärische schwere Kette der Fab' Antikörperregion, genauer gesagt gegen das Oligosaccharid α -Gal auf dem Asparagin an Position 88 im schweren Kettenabschnitt (Qian et al., 2007), und führen zu teils schweren Immunreaktionen (u.a. zu Anaphylaktischem Schock). Das geographische Auftreten dieser allergischen Reaktionen auf Cetuximab beschränkt sich in den USA hauptsächlich auf die südöstlichen Staaten Amerikas, analog zur Ausbreitung spezifischer IgE Antikörper für α -Gal (O'Neil et al., 2007, Chung et al., 2008). Es konnte eine Verbindung zwischen Zeckenstichen in den USA, Stockholm und Sydney und einer α -Gal Sensibilisierung hergestellt werden. Dabei führen nach dem Zeckenkontakt gebildete IgE Anti-Gal entweder zu Urtikaria, Angioödemem oder Anaphylaxie bei Fleischallergikern und zu Urtikaria oder Anaphylaxie bei einer allergischen Reaktion auf Cetuximab (Steinke et al.,

2015). Die Symptome der auftretenden Erkrankung im Hinblick auf die allergische Reaktion gegen α -Gal werden auch als α -Gal Syndrom zusammengefasst (Fischer and Hilger, 2017, Chakrapani et al., 2022). Betrachtet man die Verbreitung der Amerikanischen Buntzecke und vergleicht diese mit dem Auftreten von Allergien auf Cetuximab und auf rotes Fleisch so stellt man wie bereits erwartet eine Überlappung fest (Steinke et al., 2015). Die Verbreitung einer nachweislich zum α -Gal Syndrom führenden Zeckenart, das geographische analoge Auftreten von α -Gal-behafteten Allergien (z.B. Cetuximab und rotes Fleisch) und der Nachweis stattgefundenener Zeckenstiche in meist adulten Patienten, die zuvor keine suspekten Unverträglichkeiten hatten, führten dazu, dass Zecken als einer der wichtigsten Überträger des α -Gal-Syndroms nicht mehr wegzudenken sind. Dieses komplexe, durch IgE-Antikörper gegen α -Gal ausgelöste Krankheitsbild findet aktuell als „Red Meat Allergy“ immer mehr Einzug in die lokalen Medien.

1.3.4. α -Gal, Zecken und Fleischallergie

Die Pathophysiologie hinter der „Rotfleischallergie“ erklärt sich über die α -Gal-Expression, welche reichlich auf Zellen und Geweben von nicht-primatenartigen Säugetieren stattfindet, dabei insbesondere auf Thyroglobulin (Spiro and Bhoyroo, 1984). Eine allergische Reaktion, z.B nach Rindfleischverzehr, kann im Zusammenhang mit einer IgE Anti-Gal getriggerten Immunreaktion stehen, welche sich gegen α -Gal behaftete Bestandteile in Fleisch von Säugetieren richtet. Bei der Untersuchung allergischer Reaktion gegen Rind-, Schweine- und Lammfleisch von IgE Anti-Gal positiv getesteten Patienten konnten bis zu 3-6 Stunden verzögerte systemische Reaktionen wie Anaphylaxie, Angioödeme und Urtikaria bei fehlenden akuten oralen Reaktionen nach Nahrungsaufnahme gefunden werden (Commins et al., 2009, Chakrapani et al., 2022). Als Ursache für die bereits vorhandenen IgE Antikörper gegen α -Gal kamen mehrere Theorien zustande. Bei Befragung der Patienten von Commins und Satinover zeigten diese analog zu australischen Forschungsgruppen (Van Nunen et al.,

2009) einen möglichen Zusammenhang zu Zeckenstichen. 80% der Patienten konnten einen Zeckenstich angeben bevor derartige allergische Reaktionen nach Fleischverzehr auftraten (Commins et al., 2009). Diese allergischen Reaktionen auf Zeckenstiche können vielfältig sein. Sie umfassen unter anderem lokale Reaktionen wie schmerzhaftes Rötungen und Schwellungen um die Stichstelle aber auch systemische Reaktionen wie Allergien auf rotes Fleisch und Anaphylaxie (van Nunen, 2015). Zeckenstiche könnten wie bereits benannt vor allem in den südöstlichen Staaten Amerikas als Verursacher der IgE Produktion gegen α -Gal im Wirt und einer daraus resultierenden Allergie auf rotes Fleisch aufgegriffen werden (Commins et al., 2011). Dabei wird während des Zeckenstiches neben der Allergeninjektion auch eine Allergieanfälligkeit induziert, welche durch einen modifizierten Zytokinausstoß eine IgE Anti-Gal Produktion begünstigen könnte (van Nunen, 2015). Eine Veränderung der stimulierten T- Subpopulation z.B. Richtung TH₂- Zytokinprofil, wie sie von Ferreira und Silva in Mäusen nach Stich der Braunen Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus*) nachgewiesen wurde (Ferreira and Silva, 1999), wäre als begünstigender Faktor der Allergie auf α -Gal nach dem Zeckenstich denkbar. Hinzu kommt, dass abhängig von diesem veränderten Immunmilieu ein Antikörperklassenwechsel zwischen IgG und IgE stattfindet. Dabei werden Anti-Gal produzierende B-Zellen gelegentlich einem Isotopenwechsel unterzogen sodass IgE Antikörper gebildet werden (Galili, 2013, Commins et al., 2011). Auch Rispens et al beschrieb die Bildung beider Anti-Gal Antikörperklassen aufgrund des in der natürlichen Darmflora vorkommenden α -Gal-Antigens (Rispens et al., 2013).

1.3.4.1. Pathophysiologie der α -Gal- Sensibilisierung

Weitere Daten lassen vermuten, dass nicht der Zeckenstich an sich oder der Stich einer bestimmten Zeckenart dazu führt, dass eine α -Gal Sensibilisierung stattfindet. Vielmehr wird diskutiert, ob der Kontakt mit Speichelproteinen der Zecken eine Anti-Gal IgE Produktion auslöst, eine vorherige Mahlzeit der Zecke und daraus resultierende mitgeführte Glykoproteine oder -lipide vorhanden sind

und eine Reaktion auf α -Gal induzieren oder ein anderer Organismus in der Zecke wie z.B. Borrelien oder Rickettsien das α -Gal Epitop präsentiert (Steinke et al., 2015). In den USA konnten mehrere Zeckenarten mit α -Gal in Verbindung gebracht werden wobei vor allem Gattungen der Schildzecke wie die Amerikanische Buntzecke (*Amblyomma americanum*) und die Hirschzecke (*Ixodes scapularis*) von Crispell und Commins identifiziert wurden (Crispell et al., 2019). Sie akzentuieren mit ihren Versuchen die Annahme, dass nach Beginn der Fütterung von einem tierischen als auch menschlichen Wirt α -Gal im Speichel und den Speicheldrüsen der Zecken vorhanden ist und stellen neue Szenarien in den Raum, wie es zur Synthese von α -Gal kommen könnte, sei es durch ein unentdecktes Enzym in den Zecken, eine stattfindende Modifizierung während der Fütterung oder Galaktosyltransferase-Enzyme die von Bakterien mit ins Spiel eingebracht werden (Crispell et al., 2019). Während in den USA vor allem die Amerikanische Buntzecke und Hirschzecke für die Fleischallergie verantwortlich gemacht wird, konnten in Australien die Australische Lähmezecke (*Ixodes holocyclus*) (Van Nunen et al., 2009) und in Schweden Übertragungen vor allem mit dem Gemeinen Holzbock (*Ixodes ricinus*) assoziiert werden (Gronlund et al., 2009, Hamsten et al., 2013b, Hamsten et al., 2013a). In Japan wurden Neuseeländische Rinderzecken (*Haemaphysalis longicornis*) mit dem Auftreten von Allergien gegen rotes Fleisch in Verbindung gebracht, da auch ein Stich von *H. longicornis* eine IgE Anti-Gal Produktion induziert (Chinuki et al., 2016). In Brasilien kreierten Araujo et al einen genetisch manipulierten Mausstamm welcher über keine α 1,3GT verfügt und sich nach einem Zeckenstich einer Art der Cayenne-Zecken (*Amblyomma sculptum* oder auch *Amblyomma cajennense complex*) auf α -Gal sensibilisieren lies (Araujo et al., 2016).

1.3.4.2. α -Gal, Transplantate und Gummibärchen

Eine ähnliche verzögerte allergische Reaktion, wie sie nach Schweinefleischverzehr auftritt, konnte bei Rinder- oder Schweineklappenbioprothesen festgestellt werden (Mozzicato et al., 2014).

Kasimir et al beschrieben das erste Mal das Vorkommen des α -Gal Epitops in Schweineherzklappen (Kasimir et al., 2005). Sie entwickelten ein Dezellularisierungsverfahren, welches eine vollständige Zellreduktion und damit eine komplette Reduktion des α -Gals verspricht, um mit dem gewonnenen Gerüst Gewebe ohne α -Gal Expression zu züchten und somit die Immunreaktion gegen das Transplantat und damit ein Transplantatversagen zu verhindern. Analog dazu beschrieben Konakci et al. einen signifikanten Anstieg von IgM Anti-Gal Antikörpern in Patienten nach dem chirurgischen Einsetzen der Schweineklappen im Vergleich zu mechanischen Klappenprothesen (Konakci et al., 2005). Sie konnten außerdem nachweisen, dass vorbehandelte Xenotransplantate, die ein deutlich verringertes Vorkommen von α -Gal aufweisen, eine herabgesetzte Immunantwort auf das Bioprothesenmaterial nach sich ziehen. Als Beispiele für die Vorbehandlung der Bioprothesenmaterialien schlagen sie ein enzymatisches Vorgehen mit einer α -Galaktosidase oder ein genetisch verändertes Xenotransplantat, welches kein α -Gal mehr exprimiert, vor.

Weitere schwere anaphylaktische Reaktionen wurden bei Verzehr von Schweine- und Rindernieren gefunden und konnten mit α -Gal bzw. IgE Anti-Gal in Verbindung gebracht werden (Morisset et al., 2012). Dabei war die allergische Reaktion deutlich stärker ausgeprägt als bei normalem Fleischverzehr. Hilger und Fischer konnten 2 Metalloproteinasen als führende α -Gal tragende Enzyme detektieren, welche in der Schweineniere maßgeblich für die starken allergischen Reaktionen verantwortlich sein dürften (Hilger et al., 2016). Derartige Reaktionen auf Fleisch bzw. Innereien nach Zeckenstichen wurden auch in Deutschland beschrieben (Fischer and Biedermann, 2016).

Es besteht zusätzlich die Gefahr, dass Allergiker auf rotes Fleisch auch eine Sensibilisierung gegen Gelatine aufweisen, welches α -Gal enthält (Mullins et al., 2012, Caponetto et al., 2013). Eine Produktion von IgE Anti-Gal könnte auch hier für die Reaktivität gegen Gelatine verantwortlich sein und birgt die Gefahr schwerer systemischer Reaktionen, da Gelatine nicht nur in Lebensmittel wie z.B. Gummibärchen, sondern beispielsweise auch in direkt in

den systemischen Kreislauf implizierten Impfstoffen und Plasmaexpandern vorkommt. Dabei unterscheiden sich die Reaktionen vor allem in ihrem zeitlichen Auftreten. Während Gelatine-behaftete Vaginalkapsel, Impfantikörper und die Gabe von kolloidalen Infusionslösungen zu einer Reaktion innerhalb der ersten 30 Minuten führen, werden bei der oralen Aufnahme eher mit späteren Reaktionen gerechnet (Stone et al., 2019, Stone et al., 2017, Vidal et al., 2016, Caponetto et al., 2013, Mullins et al., 2012).

1.3.4.3. α -Gal und Schlangengift

In Giftkompositionen konnte das α -Gal-Epitop bereits 1992 im Cobra Venom Factor (CVF) der *Naja kaouthia* nachgewiesen werden (Gowda et al., 1992), wobei das immunogene Potential des α -Gal Epitops zu diesem Zeitpunkt noch deutlich weniger Aufmerksamkeit erregt hat. CVF ist ein bekannter und bereits ausgiebig erforschter Glykoproteinbestandteil des Kobragiftes und Studien zeigten, dass Kohlenhydrateinheiten des CVF nicht nur indirekt an dessen Komplement-aktivierender Funktion beteiligt sind, sondern auch als Antigen und Bindestelle der natürlich vorkommenden anti- α -Gal-Antikörper im menschlichen Serum dienen (Gowda et al., 1994, Gowda et al., 2001). α -Gal wurde darüber hinaus im CVF weiterer Schlangenarten wie der Chinesischen Kobra (*Naja atra*) und auch in Snake Venom Metalloproteinasen (SVMP) der Monokelkobra (*Naja kaouthia*) nachgewiesen (Huang et al., 2015).

1.4. Ziel der Arbeit und experimentelles Design

Es stellt sich die Frage, ob der Zucker α -Gal ein relevantes Epitop im Bereich der Toxine ist und im Rahmen einer Toxineliminierung eine Rolle spielen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es, α -Gal als Epitop auf Giften verschiedener Schlangengiftspezies nachzuweisen. Vorversuche beschäftigten sich mit der

Untersuchung toxischer Effekte von Schlangengift auf Blutzellen und Immunglobuline. Ausgehend von den Daten intensiver hämatologischer und toxikologischer Forschungsarbeiten wurde bereits α -Gal auf Giftkomponenten nachgewiesen. Ein allergologischer Blickwinkel diesbezüglich fehlt und soll im Rahmen dieses Projektes ausgearbeitet werden.

Um zu zeigen, dass α -Gal als Epitop auf Proteinen von Schlangengiften zu finden ist, wurde mittels WesternBlot, ImmunoCAP und eigens entworfenem ELISA gearbeitet. Eine Identifizierung der gefundenen Proteine erfolgte durch Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF. Ein Spezifitätsnachweis soll im Inhibitions- ELISA gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1. Material

Alle weiteren Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, die benutzt wurden, jedoch nicht in der Liste stehen, gehören zur Standardausrüstung eines jeden Labors.

2.1.1. Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
NanoPhotometer	Implen, Version 7122 v2.1.0
ImmunoCAP™ o215/ bovines	Thermo Fischer Scientific
Vertikale Elektrophoresekammer Criterion™, Criterion™ Dodeca™	BIO RAD
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	BIO RAD
Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific
1. MALDI-TOF/TOF (2019):	
<ul style="list-style-type: none"> Database: NCBIprot 20190113 (184305200 sequences; 67247245388 residues) Taxonomy: Other lobe-finned fish and tetrapod clade (2832806 sequences) Taxonomy: lobe-finned fish and tetrapod clade (79825 sequences) 	
2. MALDI-TOF/TOF (2021):	

- Database: SwissProt 2019_11
(561568 sequences;
201997950 residues)
- Taxonomy: lobe-finned fish
and tetrapod clade (79825
sequences)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1. Schlangengifte

Schlangengifte wurden von der Firma Latoxan (#L1104-L1351) bezogen und befinden sich bei Lieferstatus in gefriergetrocknetem Zustand, für die Versuche wurden diese je 100 mg/ gelöst in 500 µl PBS-Puffer bei +4° C aufbewahrt. Zu Versuchsbeginn erfolgte jeweils eine langsame Erwärmung bis 25°C im Wasserbad.

Viperidae

Schlangengift	Nummer	Herkunft	Referenz
<i>Bitis gabonica gabonica</i>	1	Burundi	L1104A
<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	2	Romänien	L1117F
<i>Daboia russelii russelii</i>	3	Pakistan	L1132A
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	4	USA	L1202
<i>Bothrops asper</i>	5	Ecuador	L1209A

Elapidae

Schlangengift	Nummer	Herkunft	Referenz
---------------	--------	----------	----------

<i>Dendroaspis polylepis</i>	6	Kenia	L1309A
<i>Naja mossambica</i>	7	Südafrika	L1320B
<i>Naja kaouthia</i>	8	Thailand	L1323
<i>Notechis scutatus</i>	9	Australien	L1329
<i>Naja haje</i>	10	Marokko	L1351

2.1.2.2. Patientenserumproben

Die Serumproben setzen sich aus α -Gal sensibilisierten Individuen zusammen. Aus vorherigen Projekten besteht eine Serothek des Labors für Allergologie und spezielle Dermatologie Tübingen, welche Seren von α -Gal sensibilibisierten Patienten archiviert hat. Es handelt sich dabei um Restmaterial, die Einwilligung für eine Folgenutzung in weiteren Projekten liegt für jede einzelne Probe vor. Für Teile dieser Versuchsreihe (ImmunoCAP, ELISA, Immunoblot) wurden Seren gepoolt um eine größere Menge mit konstanten Eigenschaften in verschiedenen Versuchen zu generieren. Seren von bis zu 20 Patienten wurden gemischt und für die Versuche relevanten Parameter erneut im ImmunoCAP bestimmt.

Die Aufbewahrung erfolgt bei -20° C als Aliquots à 1,0-1,5 ml.

Material

Gepooltes α -Gal-Patientenserum
(Ch.B: 1/2019)
Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™
Precast Protein Gels, 15-well, 15 μ l

Hersteller

Serothek; Aufbewahrung bei -20° C
als Aliquots à 1,0-1,5 ml
BIO RAD #456-9036

Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 7 cm IPG/prep well, 450 µl	BIO RAD #456-9031
Immobilon-P Transfer Membranes (PVDF)	Merck Millipore P-15552
Whatman® Filterpapier	Merck
GelAir Drying Frames	BIO RAD #1651775
GelAir Cellophane Support	BIO RAD #1651779
Gel Drying Solution	BIO RAD #1610752
MicroWell™ 96-Well-Platten, Nunc- Immuno™	Thermo Fisher Scientific 735-0083
Sealing Tape for 96-Well Plates	Thermo Fisher Sc 15036
EDTA Vollblut von Patienten mit α- Gal Sensibilisierung: BAT Z20-73,-79,-81,-82,-83,-84,-86,- 89	Serothek, Aufbewahrung bei 2-8°C bis 48 Stunden
Superdex™ 75 Increase 10/300 GL Säulen	cytiva #29148721

2.1.3. Reagenzien und Antikörper

2.1.3.1. Reagenzien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BIO RAD 500-0006
Thyreoglobulin	Sigma-Aldrich #T1001-100mg Aufbewahrung bei + 4° C, nach Auflösen bei -20° C
Tris-HCL	Gibco® #15504-020

SDS (Lauryl Sulfat)	Sigma-Aldrich L-4509
Acrylamid/Bis Lösung 40% 37.5:1 (2,6% C)	BIO RAD #161-0148
TEMED	Gibco® 15524-010
Ammonium persulfat	BIO RAD #161-0700
Isobutanol (Butanol-2) (Merck #9630
Pyronine G	
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich #B-5525
Glycerol (87%)	Merck #1.04094.1000
2-Mercapto-Ethanol	LKB #1830-401
Glycine	Merck #5.00190.1000
Methanol	Merck #1.06009.1000
Eisessig	Merck #1.000.63.1000
Gel Code Blue Stain Reagent	Thermo, Pierce #24590
Ponceau S concentrate	Sigma #P-7767
Tween-20	Merck #8.22184.0500
BSA	Sigma-Aldrich #A-9647
BCIP/NBT Color Substrate // oder: NBT/BCIP	BCIP/NBT Color Substrate (Promega #S-3771) // oder: NBT/BCIP REF #11681451001 von Roche
SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad-Range	BIO RAD #161-0317
beta-mercapto-glycerol 4x sample buffer	BIO RAD Laemmli sample buffer catalog #161-0737
Substrate Reagent Pack	R&D Systems #DY999
Stop Solution 2N Sulfuric Acid	R&D Systems #DY994
PNPP	Sigma-Aldrich N-2770
ABTS	Roche #1 112 422
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck #1.06580.1000
KH ₂ PO ₄	Merck #1.04873.1000
KCl	Sigma #P-9541

NaCl	Merck #1.06404.1000
Tris	Invitrogen #15504-020
Streptavidin-HRP	R&D Systems #DY998
AKP Streptavidin	BD Pharmingen™ # 554065

2.1.3.2. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Rat Anti-Mouse IgM – alkaline Phosphatase	Southern Biotech #1140-04 – alkaline Phosphatase
M86 – α -Gal Epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) monoklonaler Antikörper	Enzo #ALX-801-090
MOA-Biotin Conjugated Marasmiium oreades agglutinin Lectin (mushroom)	EY Laboratories #BA-9001-1
Goat Anti-Human IgE (ϵ chain) Antibody, Biotin Conjugate, cross-adsorbed (for long term storage diluted in 50% glycerol and storage at -20°C)	novex® # A18803
Mouse Anti-Human IgE Fc, BIOT conjugate, store at 2-8°C	Southern Biotech -BIOT conjugate, # 9160-08
Mouse Anti-Human IgE Fc, AP	Southern Biotech #9160-04
Anti-mouse IgG HRP	Sigma-Aldrich #A2554
Anti-mouse IgG AP	Sigma-Aldrich #A2429

2.1.4. Medien und Puffer

10x Elektrophoresepuffer	• 30,3 g Tris base (250 mM)	BIO RAD #161-0732
--------------------------	-----------------------------	-------------------

	<ul style="list-style-type: none">• 144,1 g Glycine (1,92M) 10 g SDS auf 1 Liter mit H ₂ O _{up} auffüllen pH Wert auf 8,3 einstellen
Transferpuffer mit SDS:	<ul style="list-style-type: none">• Glycine 5,8 g• Trisma base 1,2 g• MeOH (15%) 60 ml• SDS (0,05%) 2 ml auf 400 mL mit H ₂ O _{up} auffüllen
PBS 10x	<ul style="list-style-type: none">• Na₂HPO₄ x 2 H₂O_{dd} 90,3g• KH₂PO₄ 10g• KCl 10g• NaCl 400g Mit H ₂ O _{dd} auf 5 Liter auffüllen pH Wert zwischen 7,2-7,4 einstellen
TCM-Puffer	<ul style="list-style-type: none">• Tris 12,50g• NaCl 17,50g• MgCl₂ 0,50 g• KCl 0,75 g• CaCl₂ 0,375g mit ddH ₂ O auf 2,5 l auffüllen pH-Wert auf 7,4 einstellen Aufbewahrung bei + 4°C

SDS-PAGE Probenpuffer mit Glycerol (4xMG)	<ul style="list-style-type: none"> • Tris-HCl 1M pH7 500 μl • Glycerol 2 ml • SDS 10% 2 ml • BPB 1% 50 μl • Pyronine G 1% 50 μl • Mercapto 500 μl Total: 5 ml
---	---

2.2. Methoden

2.2.1. Immunoblot

2.2.1.1. Bradford Assay

Um die genaue Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Schlangengiftproben zu bestimmen wird ein Bradford Assay durchgeführt. Für jedes Gift werden 3-4 Ansätze mit jeweils 800 μ l H₂O_{dd} und 200 μ l rotes Reagent (BIO RAD Protein Assay Dye Reagent Concentrate #500-0006) in einem Reagenzröhrchen präpariert. Die Giftproben werden 1:50 (Viperidae; Nr. 1-5) oder 1:20 (Elapidae, 6-10) in H₂O_{up} verdünnt.

Es wird nach folgendem Schema vorgegangen: jeweils 1 μ l Giftprobe wird in das erste Reagenzröhrchen gegeben und die Proteinkonzentration gemessen, 2 μ l in das zweite, 3 μ l in das dritte und entsprechend 4 μ l in das vierte Reagenzröhrchen mit nachfolgender Messung. Lässt sich aufgrund einer zu geringen Proteinkonzentration keine Messung vollziehen werden additional Reagenzröhrchen mit höheren Volummenmengen des entsprechenden Giftes präpariert.

2.2.1.2. Blue Stain-Gel

Zur Vorbereitung des Blue Stain Gels wird das benötigte Volumen je Giftprobe ausgerechnet, damit eine einheitliche Menge von je 20 µg Proteine durch das Gel läuft. Hierfür wurde das benötigte Volumen für 20 µg Schlangengift mittels der bestimmten Proteinkonzentrationen durch das oben beschriebene Bradford Assay wie folgt bestimmt:

Bsp. Gift Nummer 1 (*Bitis gabonica gabonica*) hat eine Proteinkonzentration von 141 µg/µl:

$$141 \mu\text{g} \rightarrow 1 \mu\text{l}$$

$$20 \mu\text{g} \rightarrow x \mu\text{l}$$

mit einer Verdünnung von 1:50 (um ausreichend benötigtes Volumen zu generieren):

$$141 \mu\text{g}/50 \rightarrow 1 \mu\text{l}$$

$$20 \mu\text{g} \rightarrow x \mu\text{l}$$

⇒ **20 µg** bei einer 50fachen Verdünnungsstufe entsprechen **7,1 µl**.

Zuerst wurden die bestimmten Verdünnungen der Gifte hergestellt (1:50 bei den Giften 1-5 bzw. 1:20 für 6-10):

Venom 1-5: **50 µl H₂Oup + 1 µl Venom**

Venom 6-10: **20 µl H₂Oup + 1 µl Venom**

Danach wurde das berechnete Volumen je Gift (siehe Tabelle) mit der berechneten Menge des 4fachen Puffers beta-Mercapto-Glycerol (4xMercaptoglycerol; Laemmli sample buffer catalog #161-0737) in ein Eppendorfröhrchen gegeben, für 2 Sekunden gevortext und kurz (2 sek) abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min bei 95°C in Wärme gestellt, wieder kurz (2 sek) gevortext und das gesamte Volumen für ein Proteingemisch in eine der 15 Geltaschen des Fertiggels (Mini-PROTEAN® TGX Precast Gels von BIO RAD) gegeben. In die 1. Geltasche des Gels wurde

10 µl Marker (SDS-PAGE Molecular weight standards, Broad Range catalog #161-0317 von BIO RAD) gegeben. Bei den ersten Durchgängen betrug die Gellaufzeit 10 min bei 100 V und 40 min bei 200 V. Diese wurde im Rahmen der weiteren Versuche adjustiert, da bereits Proteine mit kleinerem Molekulargewicht die Gele passiert hatten und ausgelaufen waren. Die schlussendlich verwendete Gellaufzeit betrug :

1. Durchgang 100 V für 10 min
2. Durchgang 200 V für 35 min

Nach dem Durchlauf des Gels wurde dieses 4 mal für 5 min in H₂O gewaschen und danach in 20 ml Coomassie blue (GelCode® Blue Stain Reagent nr. 24590 von THERMOscientific) für 2 Stunden auf dem Schüttler belassen.

Danach wurde das Gel aus der Lösung genommen, einmal kurz mit H₂O gespült und in eine zuvor zusammengestellte Entfärber-Lösung aus 10% Ethanol + 7.5% Essigsäure gegeben. Zur Archivierung des Gels wurde dieses zwischen zwei zuvor angefeuchtete Zellophanfolien in einem Trockenrahmen (von BIO RAD) aufgespannt und über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur aufgestellt.

2.2.1.3. Immunoblot mit 2 verschiedenen anti-α-Gal-Antikörpern

Zur Durchführung des Immunoblots mit den verschiedenen Schlangengiften und 2 verschiedenen detektierenden Antikörpern werden 4 Miniprotean Precast Gele prepariert. Die Schlangengiftproben werden wie folgt verdünnt:

- SG 1-5: **50 µl H₂O + 1 µl SG**
- SG 6-10: **20 µl H₂O + 1 µl SG**

Es folgt die Zugabe des 4xMG Puffers (4xMercaptoglycerol; Laemmli sample buffer catalog #161-0737) unter dem Schutzabzug. Die Berechnung des benötigten Volumens der Giftproben sowie das Pipettierschema ist in Tabelle 1 dargestellt.

SG	Prot.konz. [µg/µl]	Protein-lösung [µl]	Probenpuffer (4x)	Tot. Volumen [µl]	Protlösung 50/20x verdünnt (1 gel) [µl]
1	141	0,1	3,5	14	7,1-> <u>6,1</u>
2	158	0,1	3,5	14	6,3
3	163	0,1	3,5	14	6,1
4	187	0,1	3,5	14	5,3
5	206	0,1	3,5	14	4,9
6	56	0,4	3,5	14	7,1-> <u>8,7</u>
7	93	0,2	3,5	14	4,3-> <u>8,7</u>
8	46	0,4	3,5	14	8,7
9	74	0,3	3,5	14	5,4
10	43	0,5	3,5	14	9,3

Tab.1: Tabelle zur Berechnung der benötigten Giftvolumen für die Gelpreparation als Pipettierschema

Das in Vorversuchen, in denen die Proteine in mehreren Versuchen im Bluestain und Silverstain aufgetrennt wurden, ermittelte unterschiedliche Laufverhalten sowie die unterschiedlich starke Bandenausprägung der einzelnen Proben führt zu einer adjustierten Volumenentnahme der betroffenen Giftproben (Tab.1 unterstrichene Werte: SG 1 mit sehr starker Bandenausprägung sowie vermehrter Streuung und entsprechend nach unten

adjustierter Volumenentnahme, SG 6&7 mit schwächer ausgeprägten Banden - entsprechend wird mehr Volumen entnommen).

Die Proben werden nach Präparation bei 95 °C für 5 min in Wärme gestellt. Währenddessen erfolgt die Vorbereitung der 4 Mini-Precast-Fertiggele. In den Folgeschritten werden die ersten Geltaschen mit jeweils 8 µl Broadrangemarker (SDS-PAGE Molecular weight standards, Broad Range catalog #161-0317 von BIO RAD) und den verschiedenen Giften beladen. Die Laufzeiten betragen 10 min bei 100 V und anschließend 40 min bei 200 V.

Die durchgelaufenen Gele werden entnommen, durch Markierung der Ecken kenntlich gemacht (0-3 abgetrennte Ecken für 4 Gele) und 2 x 5 min in ca. 25 ml Transferpuffer gewaschen. Zeitgleich werden PVDF Membrane kurz in Methanol aktiviert bevor sie 3 min in H₂O₂ gewaschen werden. Die Membrane und die Whatmanpaper® werden separat in Transferpuffer gegeben und für 5 min (Membrane) oder bis zum Transfer 5-15 min (Whatmanpaper®) im Transferpuffer belassen.

Das Blotting wird nach folgendem Schema durchgeführt (Abb.1):

Zuerst werden 2 der gut durchtränkten Whatmanpaper auf den Anodenteil des Blottinggerätes präpariert. Mit einer Miniwalze lassen sich die Blottingbestandteile glätten und die überschüssige Flüssigkeit wird entfernt. Den Whatmanpaper wird die PVDF Membran sowie das Gel werden nacheinander möglichst ohne Luftblasen aufgelegt. Zur Kathode hin wird mit einem weiteren Whatmanpaper abgeschlossen.

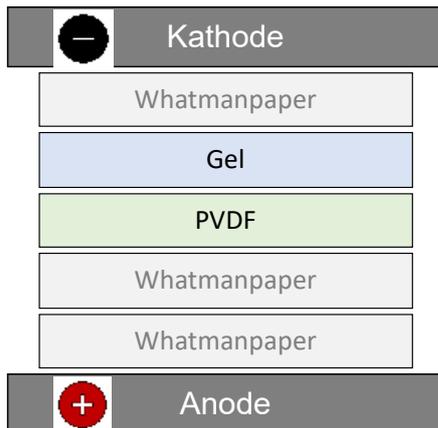


Abb. 1: Blottingschema des Immunoblots mit verschiedenen Schlangengiften

Geblottet wird bei 14 V für 40 min.

Danach wird die Kathode vorsichtig abgehoben, die Gele in H₂O_{dd} gelegt und die Paper verworfen. Vor der Überführung der Membranen in H₂O_{up} sollten diese anhand der abgeschnittenen Ecken mit einem wasserfesten Stift beschriftet werden (Nr. **1**-MOA, **2**-M86, **3**-MOA Kontrolle und **N**- Kontrolle M86). Durch die Raumlichtspiegelung bereits sichtbare Bandenreihen entsprechen den aufgetragenen Markern, welche mit einem sauberen Skalpell abgeschnitten und ebenfalls beschriftet werden (M1,2,3 und N). Die abgeschnittenen Marker werden zusammen mit den fertig geblotteten Gelen in Coomassie Blue gegeben und angefärbt.

Zum Blockieren der proteinfreien Stellen auf den Membranen verwenden wir 3%iges BSA (in TBST). Die Membranen verbleiben im 3%igen BSA für 2 Stunden auf dem Schüttler. Die Antikörper werden währenddessen 1:10 (M86 (anti- α Gal-IgM- Antikörper)) und 1:100 (MAO- Biotin) jeweils in 3%igem BSA verdünnt.

Die 2 Kontrollmembranen (N und M3) verbleiben über Nacht in 3%igen BSA auf dem Schüttler, während je eine der zwei weiteren Membranen mit dem jeweils spezifischen Antikörper angefärbt werden (Abb. 2):

Membranen		Procedere	
Kontrolle	N M3	BSA 3%	 1 x 10 min mit TBS waschen
α-Gal Detektion	M2	M86 (anti-αGal-IgM-Antikörper) (1:10)	4 x 5 min in TBST waschen
	M1	MOA- Biotin gelabelt (1:100)	
Broad Range Marker	N _{Marker}	Coomassie Blue	<ul style="list-style-type: none"> In „Destaining solution“ (50% Methanol & 7% Essigsäure) waschen bis sich Membranen entfärben 2 x 5 min mit normalem Wasser waschen
	M3 _{Marker}		

Abb. 2: Präparierschema der Membranen für den Immunoblot mit 2 verschiedenen Antikörpern

Nach der Übernachtung auf dem Schüttler schließen sich mehrere Waschschritte an. Die Waschpuffer TBST, TBS sowie die Destaining Solution aus 50%igem Methanol und 7%iger Essigsäure werden vor Beginn der Waschschritte angesetzt. Die Antikörpermembranen werden 4 x 5 min in TBST und die Kontrollmembranen 1x 10 min in TBS gewaschen, während die Markermembranen in eine „Destaining Solution“ gegeben werden bis sie sich entfärben um anschließend 2 x 5 min mit H₂O gewaschen zu werden.

Während die Gele in ein Wasserbecken gegeben werden schließt sich bei den Antikörpermembranen nun die Antikörperdetektion an. Hierfür erfolgt die 1:1000 Verdünnung des Streptavidin AKP in BSA (3%), welches an den Biotin-gelabelten MOA bindet, sowie die 1:1000 Verdünnung (in 3%igem BSA) des Anti-Mouse IgM AP Antikörpers für die Bindung an den anti-α-Gal Antikörper M86. Zusammen mit den jeweiligen Kontrollmembranen werden die Antikörpermembranen 2 Stunden in den Verdünnungen belassen. Es folgen 4 weitere Waschgänge in TBST für jeweils 5 min sowie die Trocknung der Marker.

Für die nächsten Schritte wird die Substratvorbereitung vorgeschaltet, welche sich aus 15 ml des Alkaline-Phosphatase-Puffers und 300 µl NBT/BCIP Substrat (Roche REF 116 81451001) zusammensetzt.

Die Membranen werden im Substrat belassen bis Banden sichtbar werden, dann einmal kurz für 1 min und einmal für 30 min in TBS gewaschen. Die geblotteten Gele werden getrocknet und dienen jetzt zum Vergleich des Bandenabdrucks. Die Trocknung der Gele erfolgt mit 2 Folien (BIO RAD GelAir Cellophane Support), einer Drying solution (BIO RAD) und einer Spanner Vorrichtung (BIO RAD GelAir Drying Frames) unter Vermeidung von Luftblasen zwischen den Folien und unter Lichtschutz.

2.2.2. Präparative Gele

2.2.2.1. Präparatives Gel mit Gift der *Naja mossambica* und Patientenserum

Der Versuchsaufbau richtet sich nach dem Immunoblot (siehe oben) mit einigen folgend genannten Adjustierungen. Nach Herstellung von 65 µl einer im Vergleich zum Vorversuch schwächeren 1:10 Verdünnung des SG Nr. 7 (*Naja mossambica*) und Hinzugabe des Probenpuffers (30 µl 4xMG) wird die Probe nach dem Wärmebad im gesamten Volumen in eine große Geltasche eines Precastgels aufgeladen.

Der Geldurchlauf erfolgt nach obigem Schema bei 10 min für 100 V und 30 min bei 200 V.

Nach Herstellung des Transferpuffers und Membranaktivierung wird nach obigem Schema geblottet.

Nach dem Blotten werden die einzelnen Streifen präpariert. Dabei werden die ersten 2 Streifen erfahrungsgemäß verworfen um eventuell nicht verwertbar geblottete Ränder nicht im Folgeversuch einzubeziehen. Der nun erste Streifen bildet den sogenannten „Marker“ und entspricht der einfachen Giftauftragung ohne folgende Seruminkubation. Dieser wird nach 5 Waschschritten für je 5 min in TBST im Coomassie Blue wie gehabt gefärbt und nimmt am weiteren

Versuchsablauf nicht teil. Blockiert wird mit 5%iger Milch auf den Streifen Nr. 1-17 und mit 3%igem BSA auf Streifen Nr. 18 und 19 für 2 Stunden.

Die restlichen Streifen werden nach folgendem Schema präpariert (Übersicht in Abb. 3):

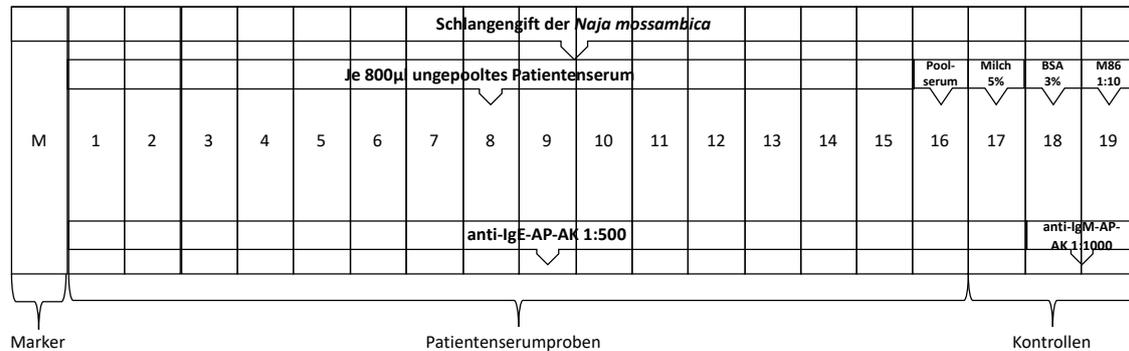


Abb. 3: Präparationsschema des Präparativen Gels mit Gift der *Naja mossaambica* und Patientenserum

Die Streifen 1-15 werden in je 800 µl ungepooltem 1:5 (in 5%iger Milch) verdünnten Patientenserum gegeben, der Streifen Nr. 16 in 800 µl ungepooltes 1:5 (in Milch) verdünntes Patientenserum. Streifen 17 bildet die Negativkontrolle der Patientenserumproben und wird in 5% iger Milch eingelegt, ggf. im Blockingpuffer (Milch) belassen. Streifen Nr. 18 entspricht der Negativkontrolle des M86 mit BSA. Der 19. Streifen wird mit dem anti- α -Gal Antikörper M86 in 10facher Verdünnung inkubiert und entspricht der Positivkontrolle des Versuchsaufbaus.

Die präparierten Streifen werden über Nacht auf dem Schüttler belassen.

Entsprechend beschriebener Waschschriffe des Immunoblots werden die Streifen nach Inkubation 4x5 min mit TBST gewaschen und parallel die Verdünnungen der Antikörper angesetzt. Der anti-IgE-AP-Antikörper wird 1:500 in 5%iger Milch verdünnt während der anti-IgM-AP-Antikörper 1:1000 in 3%igem BSA angesetzt wird. Die Streifen 1-17 werden im anti-IgE-AP Antikörper für 2 Stunden und die Streifen 18 und 19 ebenfalls für 2 Stunden im anti-IgM-AP-Antikörper inkubiert.

Es folgen 4 weitere Waschschriffe je 5 min mit TBST und die Präparation und Hinzugabe (siehe Immunoblot) des BCIP/NBT bis Banden sichtbar werden.

Danach erfolgt die letzte Waschung mit TBST 2x2 min und die Membranen werden unter Lichtschutz getrocknet.

2.2.3. Immunoblot mit allen Giften und dem Poolserum

Der Ansatz zweier Membranen (Kontroll- und Antikörpermembran) des Immunoblots und das Blotting entspricht dem Immunoblot wie gehabt (siehe oben), aufgetragen werden statt nur einer Giftprobe nun alle 10 Schlangengiftproben. Die Inkubation erfolgt hierbei nur in der gepoolten Patientenserumprobe (1:5 in 5%ger Milch verdünnt). Der anti-IgE-AP-Antikörper wird in gewohnter 1:500 Verdünnung in 5%iger Milch hinzugegeben (siehe oben).

2.2.4. Proteinanalyse mittels MALDI-TOF

Ein neues Gel wird entsprechend dem Protokoll des Immunoblots angesetzt (siehe oben).

Aus den Schlangengiftproben werden die 3 vielversprechendsten Gifte mit α -Gal Nachweis aus den vorausgegangenen Immunoblots ausgewählt: Nr. 7 (*Naja mossambica*), Nr. 8 (*Naja kaouthia*) und Nr. 10 (*Naja haje*). Diese werden doppelt und jeweils mit eigenem Marker entsprechend Abb. 4 aufgetragen.

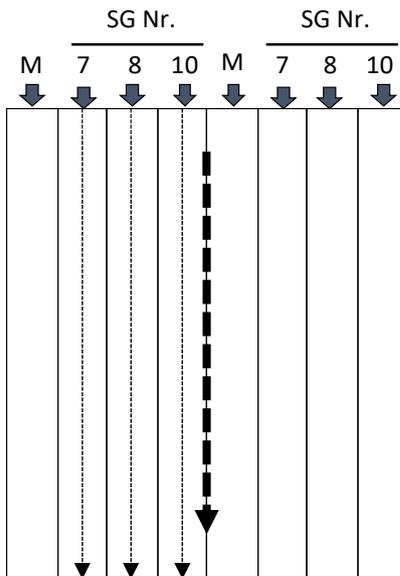


Abb. 4: Schema der Gelpräparation für die MALDI-TOF Analyse

Die Laufzeiten werden geringfügig erhöht um vor allem bei den größeren α -Gal-haltigen Proteinen eine weitere Auftrennung zu erzielen. Die Durchlaufzeiten des Gels betragen somit 10 min bei 100 V, 35 min bei 200 V und additional 3 min bei 200 V.

Nach dem Durchlaufen des Gels wird dieses in 2 Teile geschnitten (siehe Abb. 4).

Die erste Hälfte wird wie gewohnt geblottet, wobei die Streifen der Schlangengiftproben jeweils nochmals unterteilt werden. Ein Teil wird dem Marker folgend in Coomassie ohne Antikörperhinzugabe angefärbt, während der andere Streifenteil mit M86 inkubiert wird.

Aus der 2. Hälfte des Gels wird ein „SYPRO Ruby Stain Gel Stain“ mit dem das Picken der Banden für die MALDI-TOF Analyse möglich wird. Dafür folgt eine Fixierung des Gels in einer Fixierungslösung aus 50% Methanol und 7% Essigsäure. Über 2 Tage wird dieses im Kühlschrank bei 4-6°C belassen, nachfolgend gewaschen und für 30 min in ein Bad aus 10% Methanol + 7% Essigsäure gegeben. Es folgt ein Scan mit dem TYPHOON, welcher mit Blaulicht die Protein-Banden der 2. Gelhälfte sichtbar werden lässt. Dadurch wird ein Ausstanzen in einzelnen Banden möglich, welcher im Idealfall ausschließlich das gewünschte α -Gal tragende Protein beinhaltet. Mit dem Vergleich der geblotteten Proteinbanden aus der ersten Gelhälfte und der α -Gal angefärbten

Banden kann anhand des Markers die Größe der α -Gal positiven Proteine bestimmt werden welche im Sypro Ruby Stain Gel gepickt werden sollten. In vorgegebenen Fall sollte das Wunschvolumen $2 \times 1 \text{ mm}^3$ betragen und wird mit einer Pipettenspitze ausgegastzt.

Die gestanzten Banden werden in kleine Tubes für die Massenspektromie überführt und entsprechend nummeriert. Bei zu großem gepicktem Volumen kann eine weitere separate kleinere Probe gepickt und eingeschickt werden.

Der Versuch wurde mit den Gifffractionen der *Naja mossambica* (7.1-7.3;), der *Naja kaouthia* (8.1-8.3) sowie der *Naja haje* (10.1-10.3) wiederholt.

2.2.5. ELISAs

2.2.5.1. ELISA der *Naja kaouthia*

Im ELISA mit Gift der *Naja kaouthia* wird mit $5 \mu\text{g/ml}$ pro Well auf einer 96 Well-Platte beschichtet („Coating“). Die entsprechende Verdünnung der Schlangengiftprobe sowie des TGs ist vorneweg in PBS herzustellen. Die Negativkontrolle wird ebenso mit der Schlangengiftprobe beschichtet, die Positivkontrolle mit Thyreoglobulin (TG). Die beschichtete Platte wird über Nacht bei Raumtemperatur für mindestens 18-22 Stunden inkubiert. Es schließen sich 5 Waschschrirte mit 0,05%igem TBST für je 5 min an. Die Wells werden daraufhin jeweils mit $300 \mu\text{l}$ 1%igem HSA für 1 Stunde blockiert. Hieran schließen sich wiederrum 3 Waschschrirte mit TBST (0,05%, je 5 min).

Die Inkubation erfolgt für 2 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in verdünntem Poolserum unter foliertem Verschluss der ELISA-Platten. Die Verdünnung erfolgt in 2er Schritten in 1%igem HSA von purem bis 1:508 verdünntem Poolserum (Abb. 5).

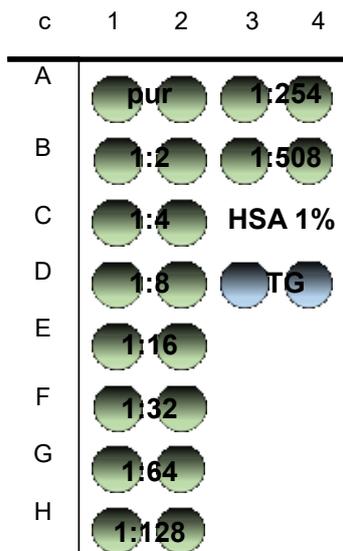


Abb. 5: Pipettierschema der Poolserumverdünnungen auf der ELISA-Platte (mit *Naja kaouthia* ge-coated)

Nach Inkubation mit der Poolserumverdünnungsreihe folgen abermals 5 Waschschrirte in 0,05%igem TBST. Der anti-IgE-Biotin-Antikörper (Goat anti-human IgE Biotin, novex A18803) wird 1:1000 im Blockingpuffer HSA (1%) verdünnt und zu 100 µl pro Well aufgetragen. Nach 1 Stunde Inkubation folgen 5 Waschschrirte mit 0,05%igem TBST. Nach Herstellung einer Streptavidin-HRP Verdünnung von 1:40 in dem blockingpuffer HSA (1%) werden davon jeweils 100µl pro Well hinzugegeben und unter Lichtschutz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgen 3 Waschschrirte mit 0,05%igem TBST und die Substrathinzugabe von TMB H₂O₂. Je nach Farbentwicklung wird die Reaktion nach 30 min mit 50 µl der „Stopsolution“ abgestoppt und die Messung der Optischen Dichte bei 450 nm kann erfolgen.

2.2.5.2. ELISAs mit fraktionierten Schlangengiftproben

Weitere ELISAs mit fraktionierten Giftproben werden nach obigem Schema durchgeführt. Die Fraktionierung findet in Luxembourg im LIH („Luxembourg Institute of Health“) statt und setzt sich aus den Schlangengiftproben der Nummern 5, 6, 7, 8, 9 und 10 zusammen. Die Fraktionierung der Schlangengifte erfolgte mittels Superdex™ 75 Increase 10/300 GL Säulen zur gröÙenausschlusschromatographischen Auftrennung. 5 mg des jeweiligen

Schlängengiftes wurden in 250µl PBS totales Volumen verdünnt und mit der Flussgeschwindigkeit 0,5 ml/min aufgetragen.

2.2.5.3. Inhibitions-ELISA

Bei den Inhibitions-ELISAs werden die Fraktionen der Schlangengiftproben Nr. 5.1, 9.1, 7.1-3, 8.1-3 und 10.1-3 entsprechend des oben genannten ELISA-protokolls beschichtet („Coating“). Parallel dazu werden Poolserumproben in 10facher Verdünnung mit TG in 5 verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 1000 µg/ml) im Serum inkubiert. Positivkontrollen erfolgen mit reinen 10fach verdünnten Poolserumproben (0 µg/ml TG). Coating sowie Inkubation des Serums erfolgen über Nacht, blockiert wird wie bereits beim ELISA beschrieben. Bei nachfolgender Inkubation werden nun anstatt der Serumverdünnungen 100 µl der vorinkubierten Poolserumproben mit TG hinzugegeben und für 2 Stunden bei 37°C wie gehabt inkubiert. Antikörperhinzugabe und Detektion erfolgt ebenfalls nach obigem Schema.

2.2.6. CAP-Inhibition mit Schlangengiften

Vorab werden mindestens 24 Stunden vor Versuchsbeginn je 100 mg der Schlangengiftproben in 500 µl PBS-Puffer gelöst und dann bei +4°C aufbewahrt. Die so gewonnene Stammlösung hat eine Konzentration von 200.000 µg/ml. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird diese im Wärmeschrank für ungefähr 10 min bei 25°C belassen. Parallel werden das gewünschte TG und das anti-α-Gal-Patientenserum aufgetaut.

Nach Beschriftung der ImmunoCAP-Röhrchen und Anlegen der ImmunoCAP-Daten im Computer wird mit dem Ansetzen der Verdünnungsreihen begonnen. Dabei wird die Patientenpoolserumprobe in den verschiedenen Reaktionsansätzen entweder unverdünnt oder 1:10 in TCM-Puffer verdünnt mit den Schlangengiftproben angesetzt. Ein Ansatz mit einer Schlangengiftprobe stellt sich dementsprechend aus 9 µl purem Poolserum mit 41 µl TCM-Puffer und

50 μl Schlangengiftprobe zusammen. Aus diesem Ansatz werden 10 μl Probe entnommen und in ein weiteres Reagenzröhrchen mit vorbereiteten 90 μl 1:10 verdünntem Poolserum (in TCM) überführt. Daraus werden wiederum 10 μl Probe entnommen und in ein weiteres vorpräpariertes Reagenzröhrchen mit 1:10 verdünntem Poolserum überführt. Diese Verdünnungsreihe setzt sich jeweils über 5 Schritte fort (s. Abb. 6).

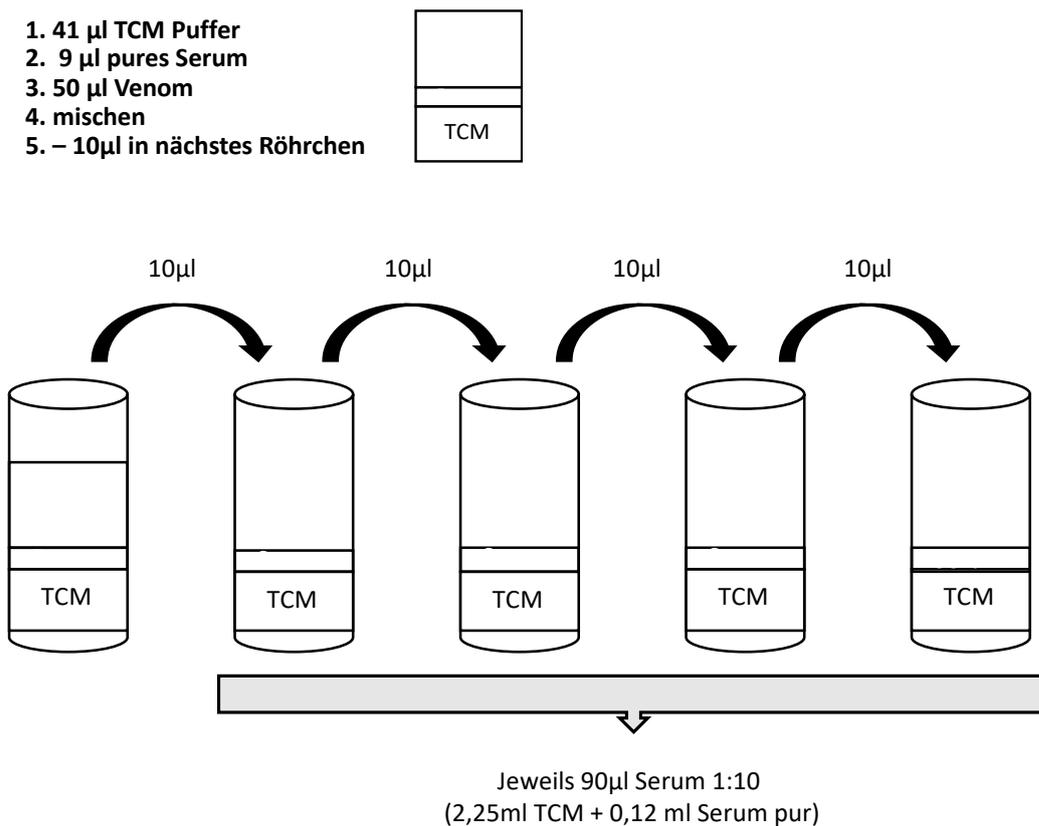


Abb. 6: Pipettierschema für die ImmunoCAP-Verdünnungsreihen

- (1) 9 μl **Serum (pur!)** + 41 μl **TCM** + 50 μl **Venom** 200.000 $\mu\text{g/ml}$
 → Endkonz. = 100.000 μg , mischen
- (2) 90 μl Serum (1:10) + 10 μl aus Röhrchen (1)
 → Endkonz. = 10.000 μg , mischen
- (3) 90 μl Serum (1:10) + 10 μl aus Röhrchen (2)
 → Endkonz. = 1.000 μg , mischen
- (4) 90 μl Serum (1:10) + 10 μl aus Röhrchen (3)

- Endkonz. = 100 µg, mischen
- (5)** 90 µl Serum (1:10) + 10 µl aus Röhrchen **(4)**
- Endkonz. = 10 µg, mischen
- (6)** 90 µl Serum (1:10) + 10 µl aus Röhrchen **(5)**
- Endkonz. = 1 µg, mischen

Für den Ansatz mit TG werden 10 µl einer TG Stammlösung (10 000 µg/µl) in 90 µl 1:10 Poolserumverumverdünnung gelöst und entsprechend obigem Schema in 4 Schritten verdünnt:

- (1)** 90 µl Serum (1:10) + 10 µl **Thyreoglobulin** 10.000 µg/ml
- Endkonz. = 1.000 µg, mischen
- (2)** 90 µl Serum (1:10) + 10 µl aus Röhrchen **(1)**
- Endkonz. = 100 µg, mischen
- (3)** 90 µl Serum (1:10) + 10 µl aus Röhrchen **(2)**
- Endkonz. = 10 µg, mischen
- (4)** 90 µl Serum (1:10) + 10 µl aus Röhrchen **(3)**
- Endkonz. = 1 µg, mischen

Nach Beenden der Verdünnungsreihen werden die Röhrchen verschlossen und über Nacht in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert, bevor diese am nächsten Tag im ImmunoCAP™ o(215/ bovines) gemessen werden.

3 Ergebnisse

3.1. Immunoblot

3.1.1. Bradford-Assay

Die Ergebnisse der im Bradford-Assay ermittelten Proteinkonzentrationen der einzelnen Schlangengiftproben sind fundamental für die Volumenberechnung zur Gelbeladung der Immunoblots oder der Beschichtungskonzentrationen in den ELISAs.

SG Nr.	Prot.konz. [µg/µl]
1	141
2	158
3	163
4	187
5	206
6	56
7	93
8	46
9	74
10	43

Tab. 2: Ergebnisse der ermittelten Proteinkonzentrationen für 1 µl der verschiedenen Schlangengifte

Die unterschiedliche Konzentration an Proteinen der Giftproben benötigt eine spezifische Abstimmung und genaue Berechnung jeder einzelnen Giftprobe für Folgeversuche. Unterschiedliches Laufverhalten im Gel sowie verschieden starke Bandenausprägung ziehen Adjustierungen der berechneten Volumenmengen nach sich. Die Schwierigkeit hierbei besteht in der adäquaten Auftrennung der Bandenmuster im Gel, um einer Verdeckung möglicherweise α -Gal tragenden Proteinen entgegenzuwirken.

3.1.2. Blue Stain Gel

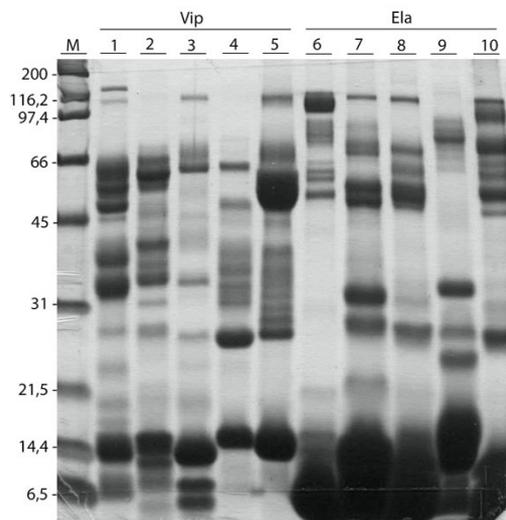


Abb. 7: Blue Stain Ergebnisse: Auftrennung der Proteine der verschiedenen Schlangengifte; ein Großteil der Giftkomponenten der Elapidae besteht aus Proteinen mit kleiner Molekülmasse; Vip – Viperidae, Ela – Elapidae, M – Marker mit Molekülmassenangaben in kDa (Kilodalton)

Der korrekte Aufbau eines Immunoblots erfordert unter anderem Vorkenntnisse über das Laufverhalten der einzelnen Proteinbestandteile der Proben. Die Auftrennung in den SDS-Gelen ist u.a. abhängig von der Proteingröße und Ladung sowie der unterschiedlichen Zusammensetzung in den verschiedenen Schlangengiften. Die Schwierigkeit hierbei ist es u.a. eine scharfe und adäquate Bandenauftrennung der sterisch großen Proteine zu erzielen ohne dabei kleinere Molekülmassen zu verlieren. Im Blue-Stain-Versuch konnte gezeigt werden, dass bei zu schnellem Laufverhalten über 40 min die kleineren Proteine bereits aus dem Gel gelaufen sind. Diesbezüglich wurde in den folgenden Immunoblots eine Laufzeit nicht über 35 min gewählt, da es sonst

zum Verlust von potentiell α -Gal tragenden Proteinen mit kleineren Molekülmassen kommen könnte.

In den nächsten Schritten gilt nun herauszufinden, welche Proteine überhaupt das α -Gal Epitop tragen.

3.1.3. Immunoblot mit 2 verschiedenen Antikörpern

Zur Evaluation, ob in den Schlangengiften α -Gal tragende Proteine vorkommen, wurde ein Immunoblot mit α -Gal detektierenden Antikörpern aufgesetzt. Hier bei wurden 2 unterschiedliche anti- α -Gal Antikörper verwendet, welche bereits in rezenten Forschungsarbeiten etabliert sind.

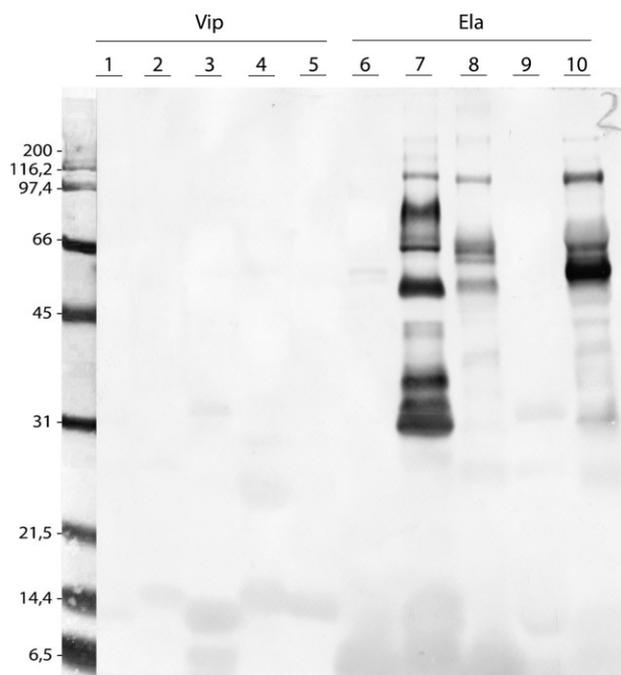


Abb. 8: Immunoblot mit Schlangengiften der Familien der Viperidae (Vip) und Elapidae (Ela); Als detektierender anti- α Gal Antikörper wurde M86 verwendet

In Abb. 8 ist der Immunoblot mit den verschiedenen Schlangengiftproben und dem α -Gal-detektierenden Antikörper M86 dargestellt. Hierbei konnten in 3 der 10 Schlangengiftproben α -Gal tragende Proteine nachgewiesen werden. Proteine der Nr. 7 (*Naja mossambica*), Nr. 8 (*Naja koathia*) sowie Nr. 10 (*Naja haje*) lassen sich vor allem im Größenordnungen über 30 kDa positiv auf α -Gal-

tragende Proteine testen. Eine Gemeinsamkeit ist die Verwandtschaft der Schlangen (Naja-„Echte Kobras“) mit Zugehörigkeit zu den Elapidae (Giftnattern).

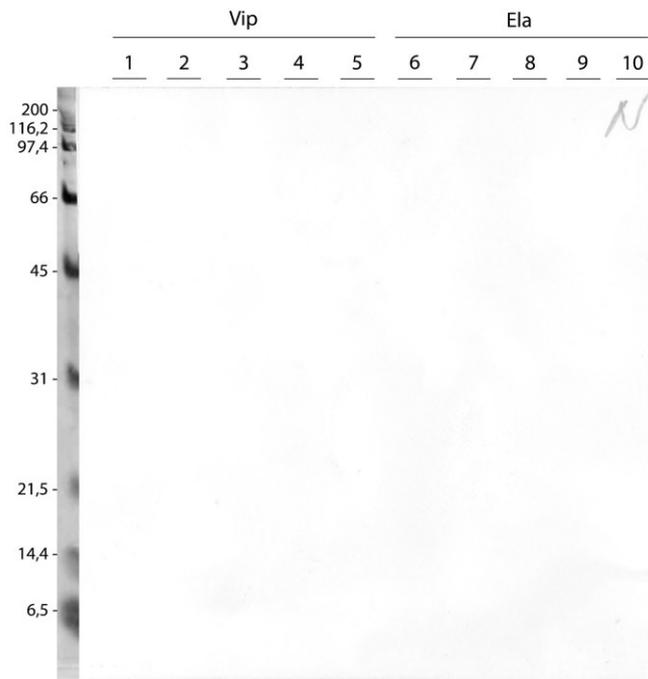


Abb. 9: Immunoblot mit Schlangengiften: Negativkontrolle zur Untersuchung des anti- α -Gal Antikörpers M86

Die in Abb. 9 dargestellte Negativkontrolle weist keinerlei Bandenmuster und somit unspezifische Bindung des M86 Antikörpers auf Schlangengiften nach.

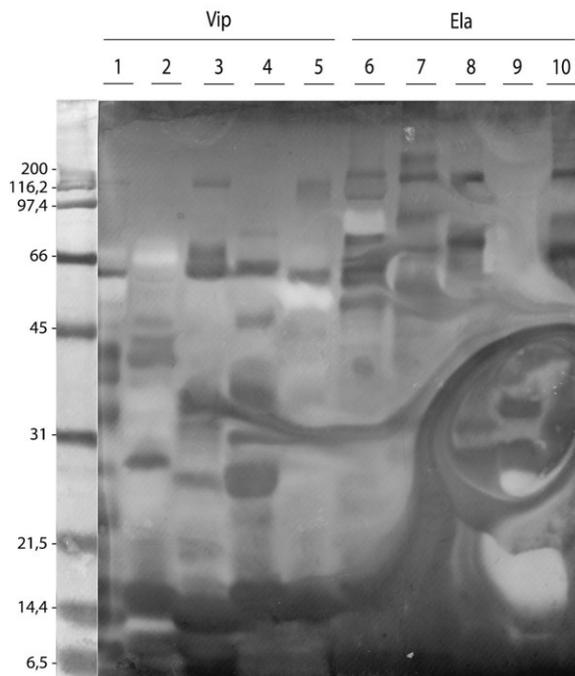


Abb. 10: Immunoblot mit Schlangengiften; als anti- α Gal Antikörper wurde MOA verwendet

Abb. 10 zeigt den selben Immunoblot-Ansatz wie Abb. 6, jedoch mit MOA als α -Gal detektierenden Antikörper. Die multiplen unspezifischen Bindungen machen diesen Antikörper ungeeignet für diesen Versuchsaufbau.

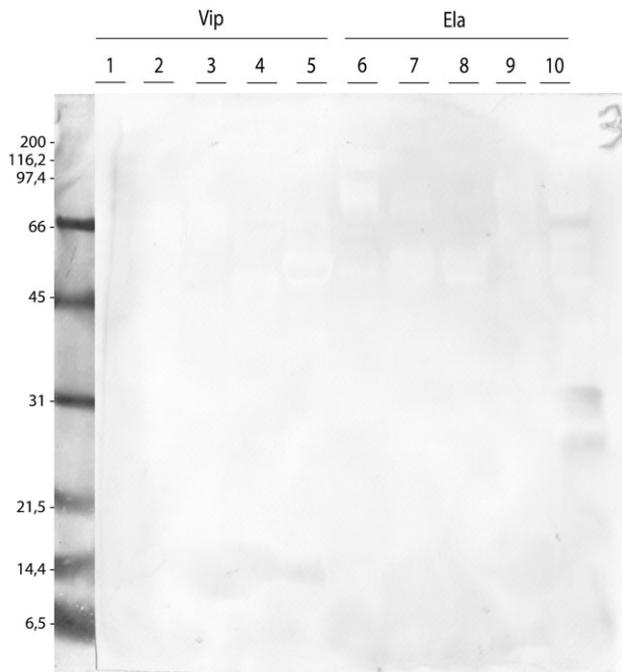


Abb. 11: Immunoblot mit Schlangengiften; Negativkontrolle zur Untersuchung des anti- α -Gal Antikörpers MOA

Die Negativkontrolle des α -Gal detektierenden Antikörpers MOA zeigt keine unspezifischen Bindungen. Die unspezifischen Bindungen (Abb. 10) gehen somit höchstwahrscheinlich nicht auf einen Fehler im Versuchsablauf, sondern auf die nicht weiterführenden Bindungseigenschaften des Antikörpers zurück.

Für die weiteren Versuche wird nach diesen Ergebnissen der M86 als α -Gal detektierender Antikörper verwendet, der anti- α -Gal-Antikörper MOA scheidet aufgrund der unspezifischen Bindungseigenschaften aus.

Die Versuchsergebnisse zeigen außerdem eine α -Gal-Expression auf Schlangengiften der *Naja*'s, welche der Familie der Elapidae angehören, während sich bei den Viperidae keinerlei positive α -Gal tragende Proteine nachweisen lassen. Ob dies an artenspezifisch unterschiedlich gebildeten Toxinkomponenten liegt und welche Proteine genau α -Gal exprimieren soll mittels Massenspektrometrie herausgefunden werden. Hierbei soll mittels MALDI-TOF eine Identifizierung der α -Gal tragenden Proteine in den positiv getesteten Schlangengiften erfolgen.

Negative Ergebnisse der Viperidae könnten auch an der Detektionsgrenze des Versuchs liegen. Um diesen limitierenden Faktoren zu umgehen schließen sich weitere Versuche wie eine ImmunoCAP und ELISAs an.

3.2. MALDI-TOF

3.2.1. Immunoblot

In Abb. 12-14 sind Gelhälften der MALDI-TOF Präparation zu sehen, welche als Immunoblot neben dem SYPRO Ruby Stain Gel fungieren. Die Schlangengiftproben der Nr. 7, 8 und 10 sind jeweils einmal pur (ohne Inkubation) oder mit dem α -Gal detektierenden Antikörper M86 inkubiert worden und zum Vergleich nebeneinander aufgetragen. Diese Auftrennung und gemeinsame Vorlage dient zum direkten Vergleich der Bandenmuster der Schlangengifte und der α -Gal tragenden Proteine und ermöglicht durch die örtliche Orientierung unter dem TYPHOON Scan das Picken der spezifischen α -Gal tragenden Proteine.

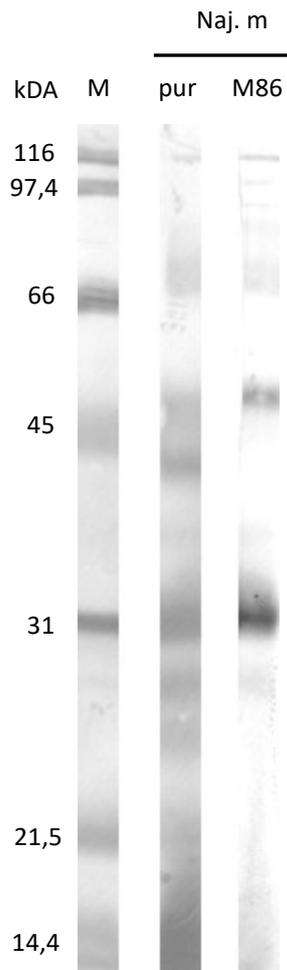


Abb. 12: Immunoblot Gift Nr. 7 - *Naja mossambica*; Auftrennung der Proteine im Schlangengift ohne (pur) und mit (M86) detektierendem α -Gal- Antikörper
M - Marker, pur - nur Giftprobe und M86 - M86-Antikörper (anti- α Gal-IgM)

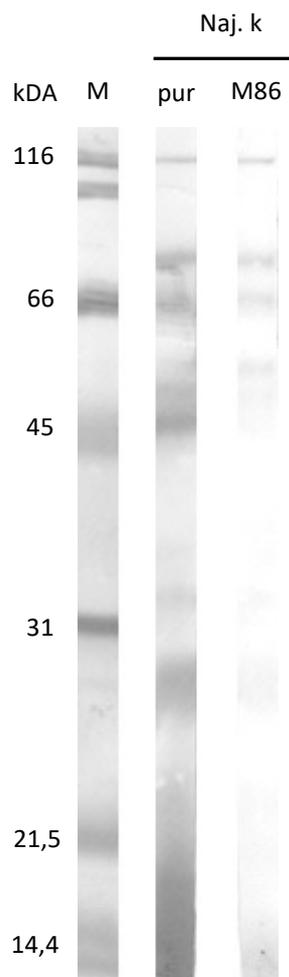


Abb. 13: Immunoblot Gift Nr. 8 - *Naja kaouthia*; Auftrennung der Proteine im Schlangengift ohne (pur) und mit (M86) detektierendem α -Gal- Antikörper
M - Marker, pur - nur Giftprobe und M86 - M86-Antikörper (anti- α Gal-IgM)

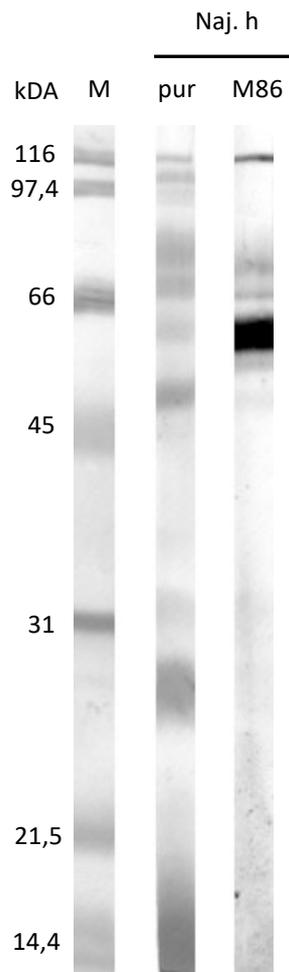


Abb. 14: Immunoblot Gift Nr. 10 - Naja haje; Auftrennung der Proteine im Schlangengift ohne (pur) und mit (M86) detektierendem α -Gal- Antikörper
M - Marker, *pur* - nur Giftprobe und *M86* - M86-Antikörper (anti- α Gal-IgM)

3.2.2. SYPRO Ruby Stain

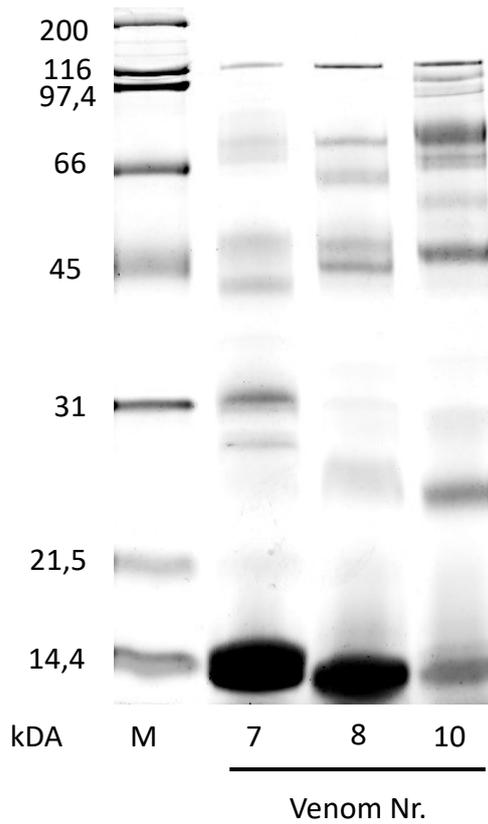


Abb. 15: : SYPRO RUBY Stain 25.03.2019
TYPHOON Scan des Gels vor der Ausstanzung

Abb. 15 zeigt das Ergebnis des präparierten Gels mit den verschiedenen Proteinbanden vor der Ausstanzung (dem „Picking“).

3.2.2.1. Picking und MALI-TOF Analyse

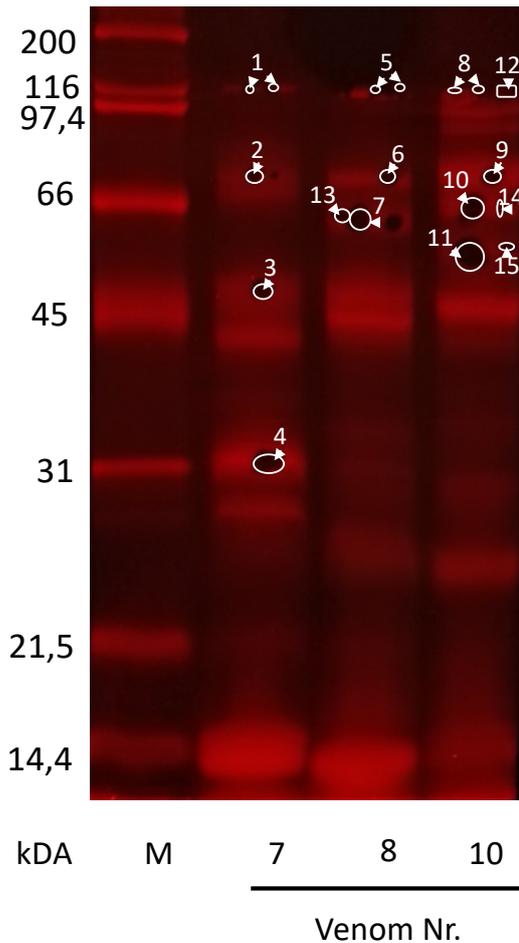


Abb. 16: SYPRO RUBY Stain - TYPHOON Scan des Gels nach dem Ausstanzen

In Abb. 15 & 16 ist das SYPRO RUBY Stain Gel vor und nach dem Bandenausschnitt dargestellt. Durch den Abgleich mit dem Immunoblot werden die gewünschten Banden mit α -Gal tragenden Proteinen ausgewählt und ausgestanzt. Die Analyse folgt im MALDI-TOF. Es zeigen sich vor allem Proteine mit größeren Molekülmassen α -Gal positiv, sodass hier vor allem Stenzen in den Proteinbanden mit höherer Molekülmasse zu sehen sind. Manche Stenzen sind vergleichsweise groß (Nr. 4 und 11) und könnten unspezifisch weitere Proteine erfasst haben. Abb. 17 stellt das 2. SYPRO RUBY Stain Gel des selben Versuchsaufbaus mit den fraktionierten Giften nach dem Ausstanzen dar.

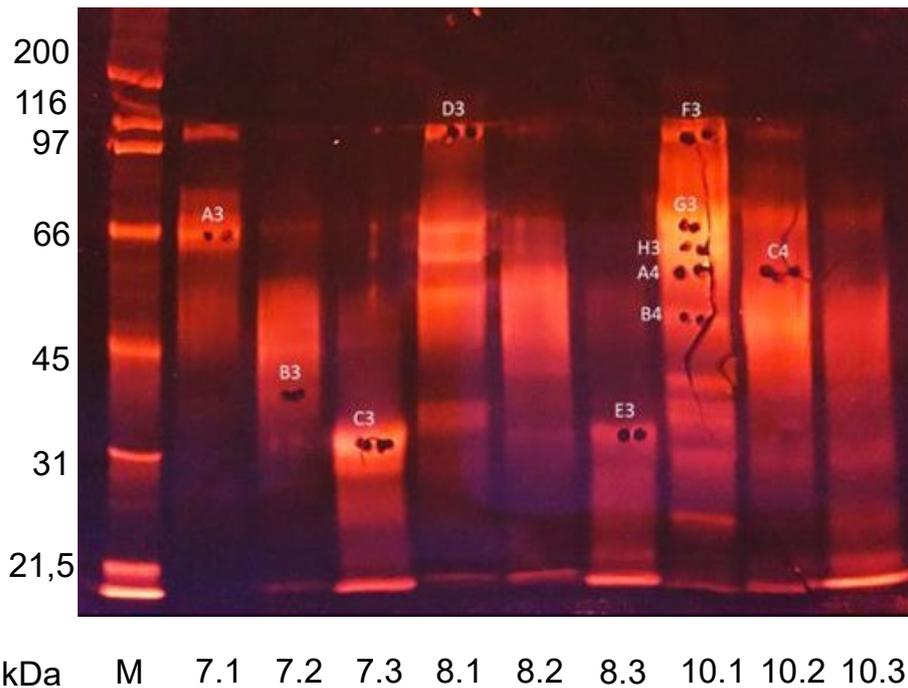


Abb. 17: SYPRO RUBY Stain - TYPHOON Scan des Gels nach dem Picking, verschiedene Giffraktionen (7.1-7.3 *Naja mossambica*, 8.1-8.3 *Naja kaouthia*, 10.1-10.3 *Naja haje*)

Auch in den Giffraktionen wurden vor allem Proteinbanden mit größerem Molekulargewicht ausgestanzt, unter 30 kDa zeigen sich keine α -Gal tragenden Proteine. Durch die Fraktionierung und damit feinere Auftrennung wird versucht, eine mögliche sterische Behinderung durch große α -Gal-negative Proteine zu verringern. Kleinere Proteine mit α -Gal oder auch Proteine mit im Verhältnis geringerer Epitopenausprägungen sollen detektiert werden und bei der Ausstanzung zu einem genaueren Ergebnis des α -Gal tragenden Proteins führen.

MGW im Gel	Protein	Abkürzungen	Schlangenspezies
70 kDa	L-amino acid oxidase (A-Kette)	LAO	Naja mossambica
50 kDa	Snake venom metalloproteinase-disintegrin-like mocarhagin	SVMP,MOC	
116 kDa	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 isoform X5	ENPP3	Naja kaouthia
60 kDa	L-amino acid oxidase (A-Kette)	LAO	
60 kDa	L-amino-acid oxidase	LAO	
60 kDa	Snake venom 5'-nucleotidase	5'NUC	Naja haje
70 kDa	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 isoform X5	ENPP3	
60-66 kDa	Cobra venom factor	CVF	
60-66 kDa	5' nucleotidase, partiell	5'NUC	
50-60 kDa	Snake venom metalloproteinase-disintegrin-like mocarhagin	SVMP,MOC	
60 kDa	Hemorrhagic metalloproteinase-disintegrin-like kaouthiagin	SVMP,KAO	

Tab. 3: α -Gal exprimierende Proteine in Giften der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia* und *Naja haje* (MALDI-TOF Versuch Nr. 1, 2019)

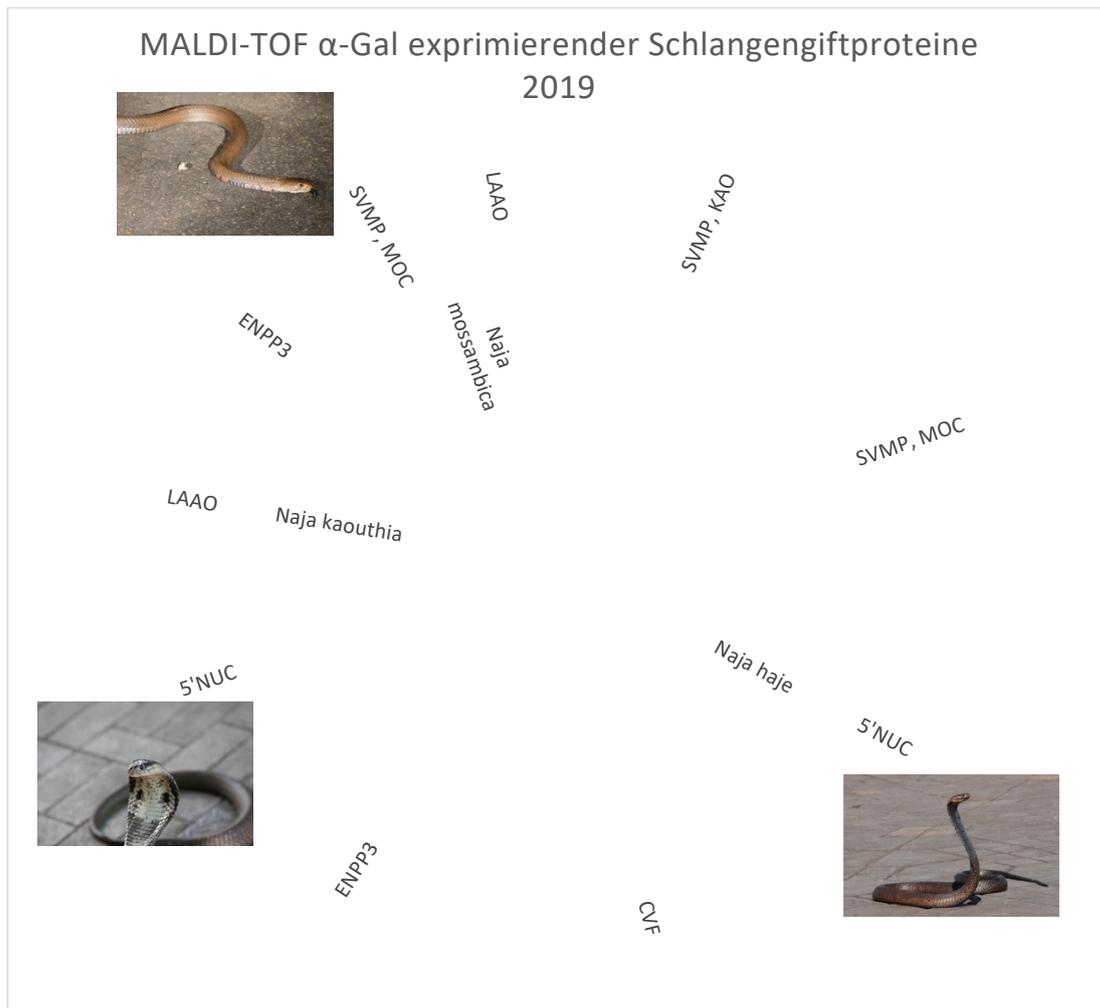


Abb. 18: Durch Massenspektrometrie identifizierte α -Gal exprimierende Proteine in Giften der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia* und *Naja haje* (MALDI-TOF Versuch Nr. 1, 04/2019)
Bildmaterial ist unter unter der Creative Commons Attribution 2.0 Generic Lizenz lizenziert (die genaue Quellenangabe ist dem Abbildungsverzeichnis zu entnehmen)

Tabelle 4 und Abbildung 18 zeigen die Ergebnisse der ausgestanzten Banden mit den Proteinanalyse in den gespeicherten Datenbanken. In manchen Stanzen ließen sich mehrere Proteine finden, sodass sich eine genaue Aussage über die α -Gal-Expression eines oder beider Proteine in den Banden nur durch genauere Auftrennung und feinere Ausstanzung erreichen lässt. Im Gift der *Naja mossambica* ließen sich größere Proteine wie L-Aminooxidasen (LAAO) und Metalloproteinasen (SVMP) finden. Zu den eruierten Proteinen der *Naja kaouthia* zählen Ektonukleotide (ENPP3), Nukleotidasen (5'-NUC9) und ebenfalls die LAAO. α -Gal-exprimierende Proteine der *Naja haje* waren neben

ebenfalls Ektonukleotiden, Metalloproteinasen und Nukleotidasen auch der CVF.

MGW im Gel	Protein	Abkürzungen	Fraktion	Schlangenspezies
65kDa	Snake venom 5'-nucleotidase (Fragment)	5'NUC	7,1	Naja mossambica
59kDa	L-amino-acid oxidase (Fragment)	LAAO	7,1	
50,65 kDa	Snake venom 5'-nucleotidase (Fragment)	5'NUC	7,2	
38 kDa	Hypothetisches Protein, partiell; Das identifizierte Peptid/Protein stimmt zu 88 % mit dem carcinoembryonalen Antigen-verwandten Zelladhäsionsmolekül 8-ähnlichem Protein (Notechis scutatus) und zu 79 % mit dem schwangerschaftsspezifischen beta-1-Glykoprotein 5 (Ophiophagus hannah) überein, beide vorhergesagte Proteinfragmente < 30 kD	88%CEA; 79%PSG5	7,2	
38 kDa	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 5 [Ophiophagus hannah]	PSG5	7,2	
32 kDa	Hypothetisches Protein, partiell [Micrurus spixii] Das identifizierte Peptid/Protein ist mit dem Zink-Metalloproteinase-Disintegrin-ähnlichen Protein verwandt.	SVMP, MDC	7,3	
100 kDa	Venom phosphodiesterase	SVPDE	8,1	Naja kaouthia
50kDa	Cobra venom factor	CVF	8,1	
34kDa	Endonuclease domain-containing 1 protein	Endonuclease	8,3	
100 kDa	Venom phosphodiesterase	SVPDE	10,1	Naja haje
66 kDa	L-amino-acid oxidase (Fragment)	LAAO	10,1	
55 kDa	Ophiophagus venom factor	OVF	10,1	
55 kDa	Snake venom metalloproteinase-disintegrin-like mocarhagin	SVMP,MOC	10,1	
50 kDa	Cobra venom factor	CVF	10,1	
55 kDa	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-A	SVMP,ATR	10,2	
50 kDa	Snake venom 5'-nucleotidase (Fragment)	5'Nuc	10,1	

Tab. 4: α -Gal exprimierende Proteine in Giffraktionen der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia* und *Naja haje* (MALDI-TOF Versuch Nr. 2, 2021)



Abb. 19: Durch Massenspektrometrie identifizierte α -Gal exprimierende Proteine in Giftfractionen der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia* und *Naja haje* (MALDI-TOF Versuch Nr. 2, 02/2021)
Bildmaterial ist unter der Creative Commons Attribution 2.0 Generic Lizenz lizenziert (die genaue Quellenangabe ist dem Abbildungsverzeichnis zu entnehmen)

In der Massenspektrometrieanalyse der fraktionierten Gifte lassen sich weitere α -Gal-tragende Proteine eruieren (Tab. 5 und Abb. 19). In den Fraktionen der *Naja mossambica* zeigen sich schon bekannte Proteine wie die LAO, 5'NUC und verwandte Metalloproteinasen der SVMP. Es zeigen sich außerdem kleinere Proteine wie das karzinoembryonale Zelladhäsionsmolekül (CEA) und das schwangerschaftsspezifische beta-1-Glykoprotein 5 (PSG5) als α -Gal-exprimierende Proteine. In der Giftfraction der *Naja kaouthia* zeigten sich neben der Schlangengiftphosphodiesterase (SVPDE) außerdem der CVF und eine deutlich kleinere Endonuklease. Proteine der *Naja haje* mit α -Gal-Expression

waren ebenso SVPDE, LAAO, SVMP, CVF, Fragmente einer Nukleotidase (5'Nuc) sowie Subtypen des CVF's („Ophiophagus venom Faktor“, OVF).

3.3. Preparatives Gel mit Gift der *Naja mossambica* und Patientenserum

Der Versuchsaufbau stützt sich auf die bereits ausgebildeten IgE- Antikörper gegen α -Gal in sensibilisierten Patienten. Das anti- α -Gal-IgE im Serum dieser Patienten soll mit α -Gal-tragenden Proteinen der Schlangengifte reagieren und so Aufschlüsse auf die Reaktion der sensibilisierten Patienten auf die Gifte geben. Die in Abb. 20 sichtbaren Banden der Streifen Nr. 2, 5, 7, 10, 11, 12, 14 und 16 zeigen Konformitäten mit dem Bandenmuster des anti- α -Gal-Antikörpers M86 (Positivkontrolle- Streifen Nr. 19). Die sIgEs der Patientenserumproben erkennen und binden an die α -Gal tragenden Proteine der entsprechenden Giftproben.

Der Probestreifen Nr. 16 (Poolserum) weist die größte Übereinstimmung mit M86 auf. Eine Kongruenz mit dem anti- α -Gal-Antikörper M86 ist wünschenswert und spricht für eine spezifische Bindung an das α -Gal-Epitop auf den Schlangengiftproteinen, das beste Ergebnis liefert hierbei das Patientenpoolserum mit Streifen Nr. 16.

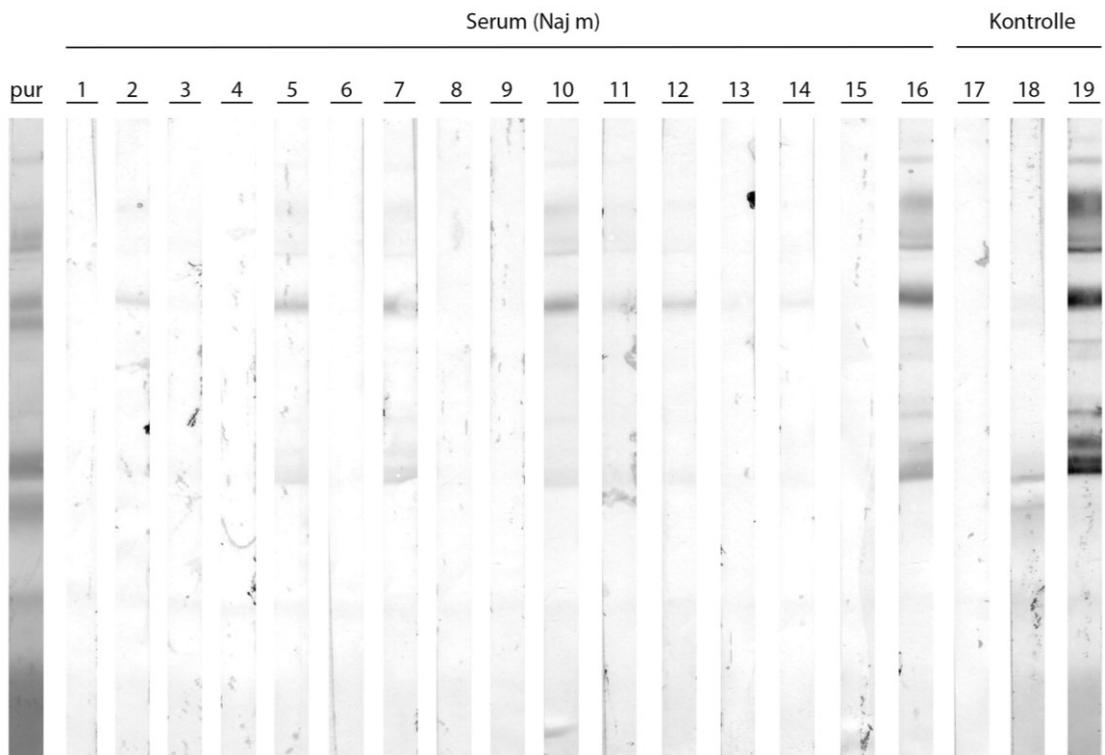


Abb. 20: Preparatives Gel mit Gift der *Naja mossambica* und Patientenseren 1-16; 17 Negativkontrolle ohne Serum, 18 Negativkontrolle ohne α -Gal , 19 Positivkontrolle mit M86

3.4. Immunoblot mit allen Giften und Poolserum

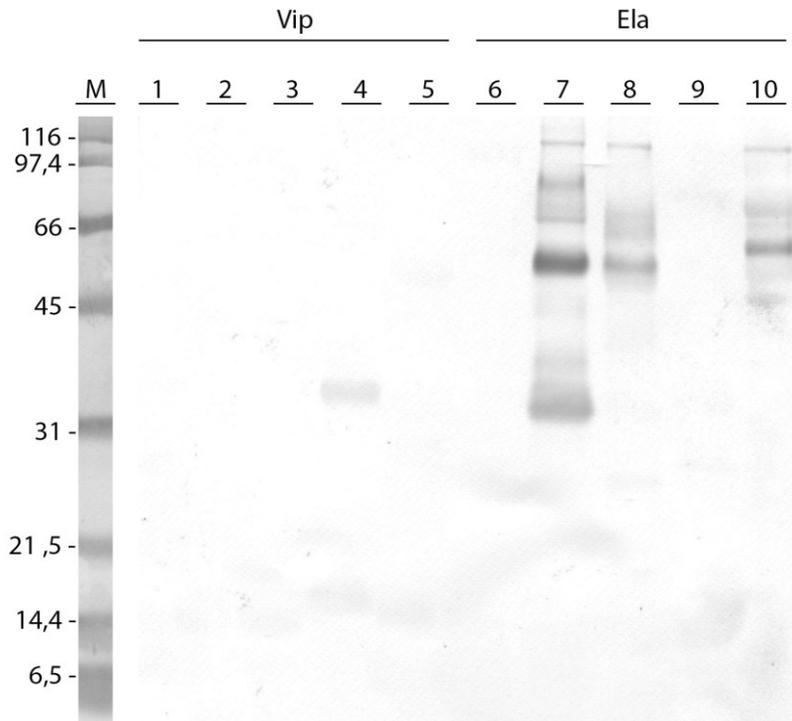


Abb. 21: Immunoblot zur Detektion α -Gal tragender Proteine in Schlangengiftproben 1-10 und Poolseruminkubation

In Abb. 21 werden die 10 Schlangengiftproben, welche mit Poolserum inkubiert wurden, dargestellt. In Similarität zu dem vorgeschalteten Immunoblot mit M86 sind hier wiederholt die Giftproben Nr 7. (*Naja mossambica*), Nr. 8 (*Naja kaouthia*) und Nr. 10 (*Naja haje*) positiv auf α -Gal tragende Proteine, welche durch die IgEs des Patientenpoolserums erkannt werden. Die Bandenmuster stimmen mit dem des M86-Antikörpers überein.

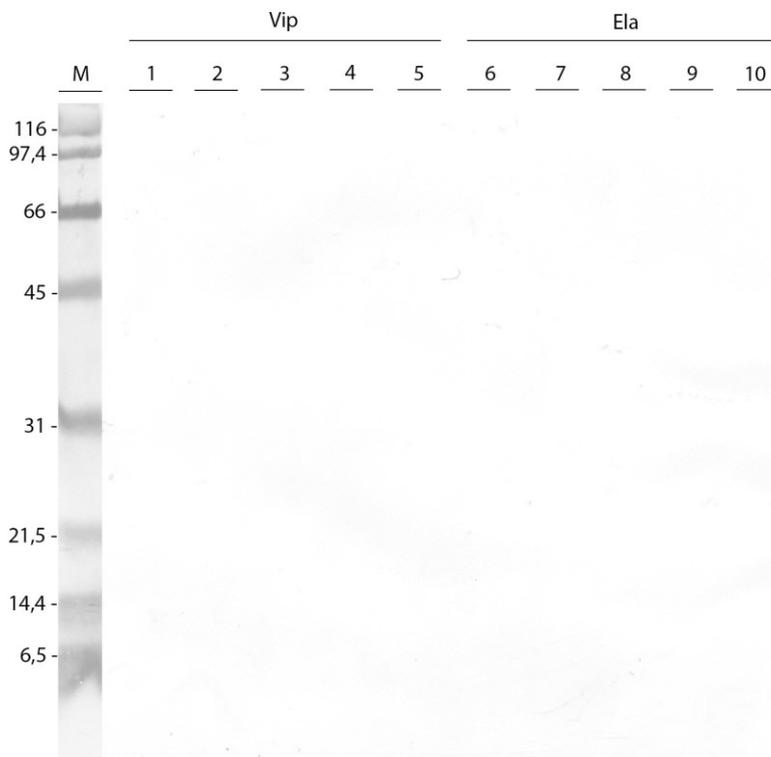


Abb. 22: Immunoblot zur Detektion α -Gal tragender Proteine in Schlangengiften 1-10 und Poolseruminkubation, Negativkontrolle

Die Negativkontrolle des Immunoblots der Schlangengiftproben, welche mit Patientenpoolserum inkubiert wurden, weisen keine unspezifische Bindung auf.

Vor allem die Gifte Nr. 7 (*Naja mossambica*), 8 (*Naja kaouthia*) und 10 (*Naja haje*) zeigen die erwarteten Bandenmuster der positiven Bindungsreaktionen durch anti- α -Gal-IgE im Patientenserum.

3.5. CAP-Inhibition mit α -Gal positiven Schlangengiften

3.5.1. Effekte von Schlangengift auf IgE

Bei der Cap-Inhibition wird Schlangengift als Inhibitor in hohen Konzentrationen eingesetzt. Um mögliche proteolytische Aktivität und den Effekt von Schlangengift auf IgE zu testen wurde ein Vorversuch vorangeschaltet (s. Abb 23).

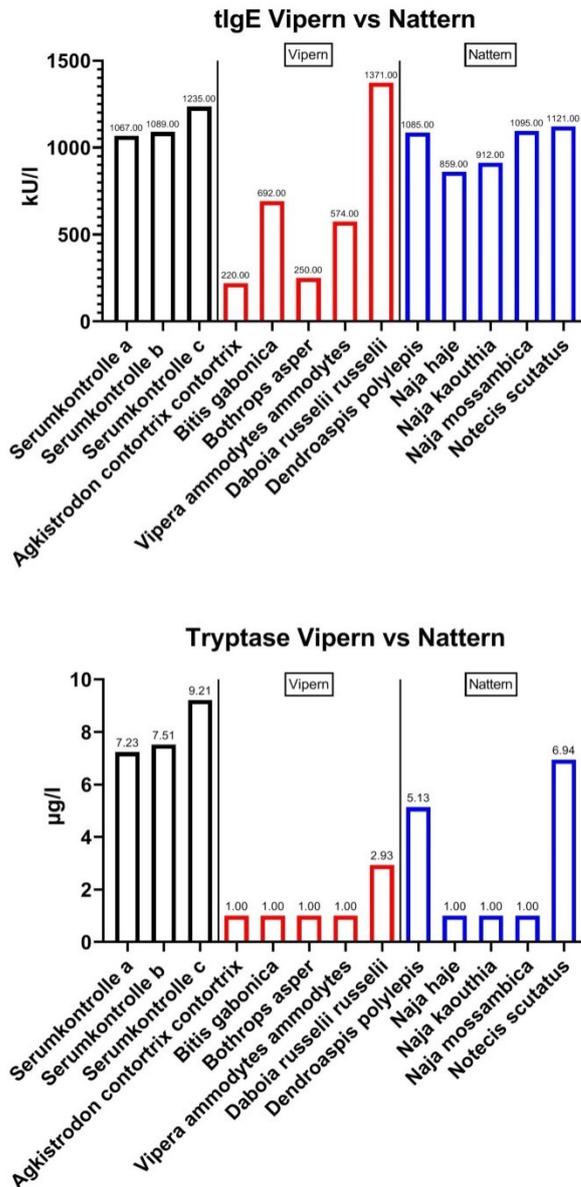


Abb. 23: Darstellung des gesamt- IgEs (tIgE) und der Tryptasen im Serum- Schlangengiftgemisch und des proteolytischen Abbaus durch die Gifte im ImmunoCAP.

Bei den Vipern lässt sich (mit Ausnahme der *Daboia russelii russelii*) ein deutlicher Abfall des gesamten IgEs feststellen, wohingegen die Nattern einen bedeutend geringeren bis nicht vorhandenen Abfall aufweisen.

Trypsase ist nur in einigen Schlangengiften (*Daboia russelii russelii*, *Dendroaspis polylepsis*) gering vorhanden und nur in bei einer Art (*Notecis scutatus*) signifikant erhöht. Messungenauigkeiten sind hiermit weitestgehend auszuschließen.

Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere bei den Vipern die Ergebnisse der ImmunoCAP nicht verwertbar sind da ein unspezifischer IgE Verdau stattfindet und zu den falsch positiven Ergebnissen führt.

Der Versuch die im Gift vorhandenen Metalloproteinasen (s. MALDI-TOF), welche vermutlich hauptsächlich für den Verdau verantwortlich sind, durch bspw. Chelatoren und damit verbundenem Substratzug (zweiwertige positive Ionen- in Schlangengiftmetalloproteinasen hauptsächlich Zink) zu inaktivieren, scheiterten. Als probatorische Chelatoren wurden EDTA, EGTA und 1,10-Phenylanthrolin verwendet (Daten nicht gezeigt).

3.5.2. Immuno-CAP-Inhibition

Mit dieser bereits etablierten Form einer Art Festphasen-ELISA's lassen sich unter anderem bessere quantitative und sensitivere Aussagen zum α -Gal-Gehalt in unseren Proben machen. Schlangengift als Inhibitor zeigt bereits in Abb. 24 mit Proben der *Naja mossambica* die Inhibition der sIgEs im Poolserum. Der Effekt der Gifte auf Messgrößen (hier sIgE des Poolserums) lässt sich in logarithmischen Konzentrationsabfällen darstellen. Eine Inhibition unter 20% des Ausgangswertes an sIgE gilt als vollständig und wird in Giften der *Naja mossambica* (Abb. 24) in beiden Versuchsabläufen erreicht.

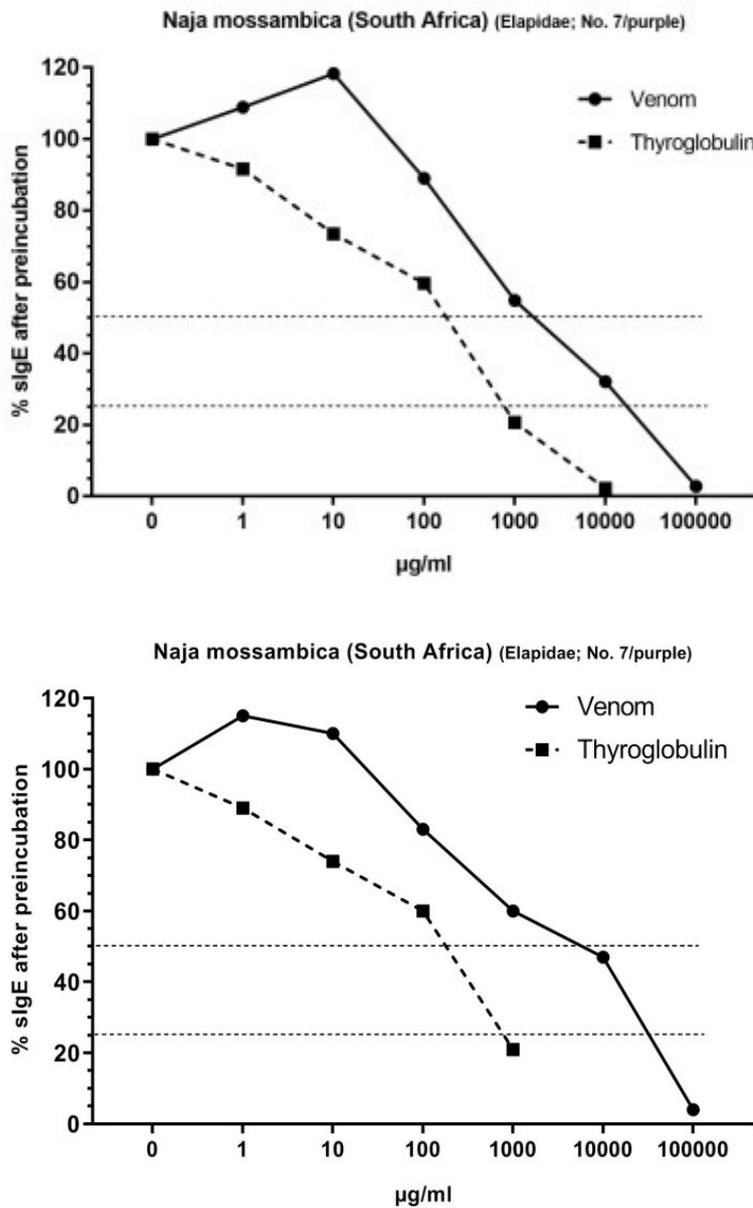


Abb. 24: Durchläufe des Thyroglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit sIgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der *Naja mossambica*, als Kontrolle wurde Bovines Thyroglobulin verwendet.

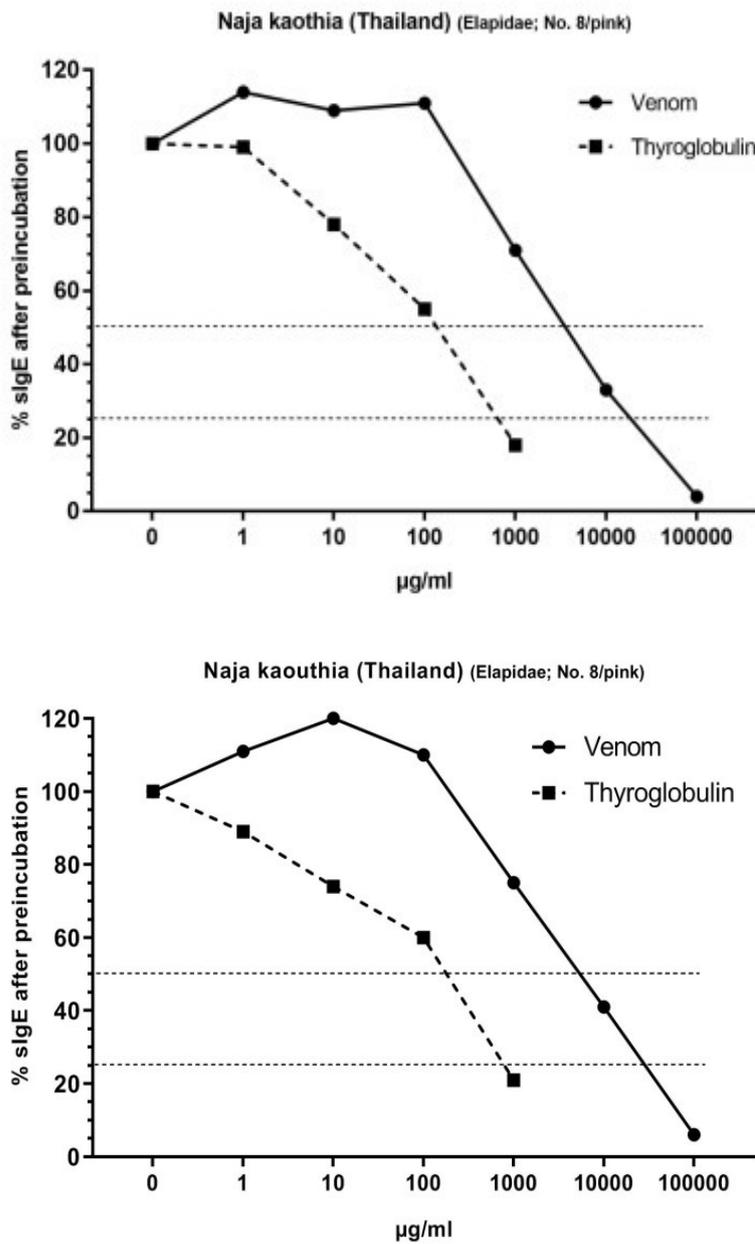


Abb. 25: Durchläufe des Thyroglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit sIgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der *Naja kaouthia*, als Kontrolle wurde Bovines Thyroglobulin verwendet

Auch das Gift der *Naja kaouthia* erreicht in der ImmunoCAP eine vollständige Inhibition (Abb. 25).

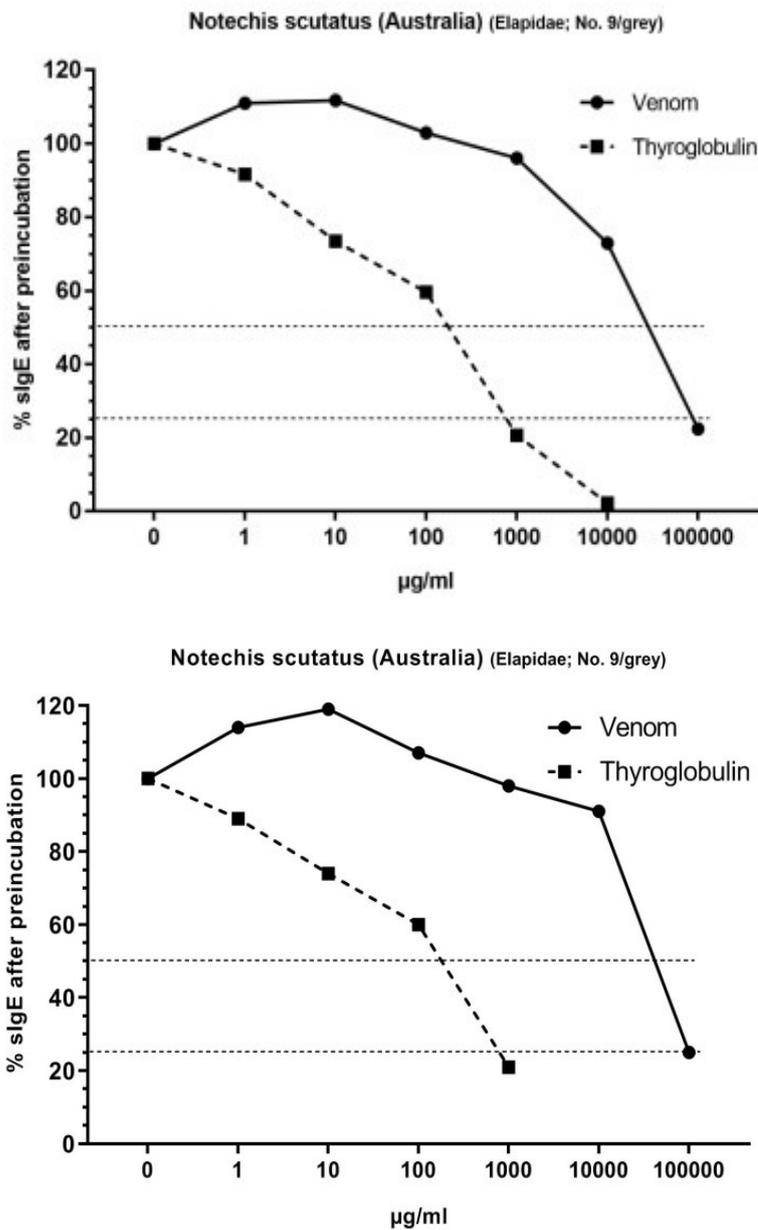


Abbildung 26: Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit sIgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der *Notechis scutatus*, als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.

Das Gift der *Notechis scutatus* zeigt überraschenderweise eine Inhibition im ImmunoCAP, auch wenn vorausgegangene Westernblot-Versuche keinen Hinweis auf α -Gal-exprimierende Proteine aufzeigten.

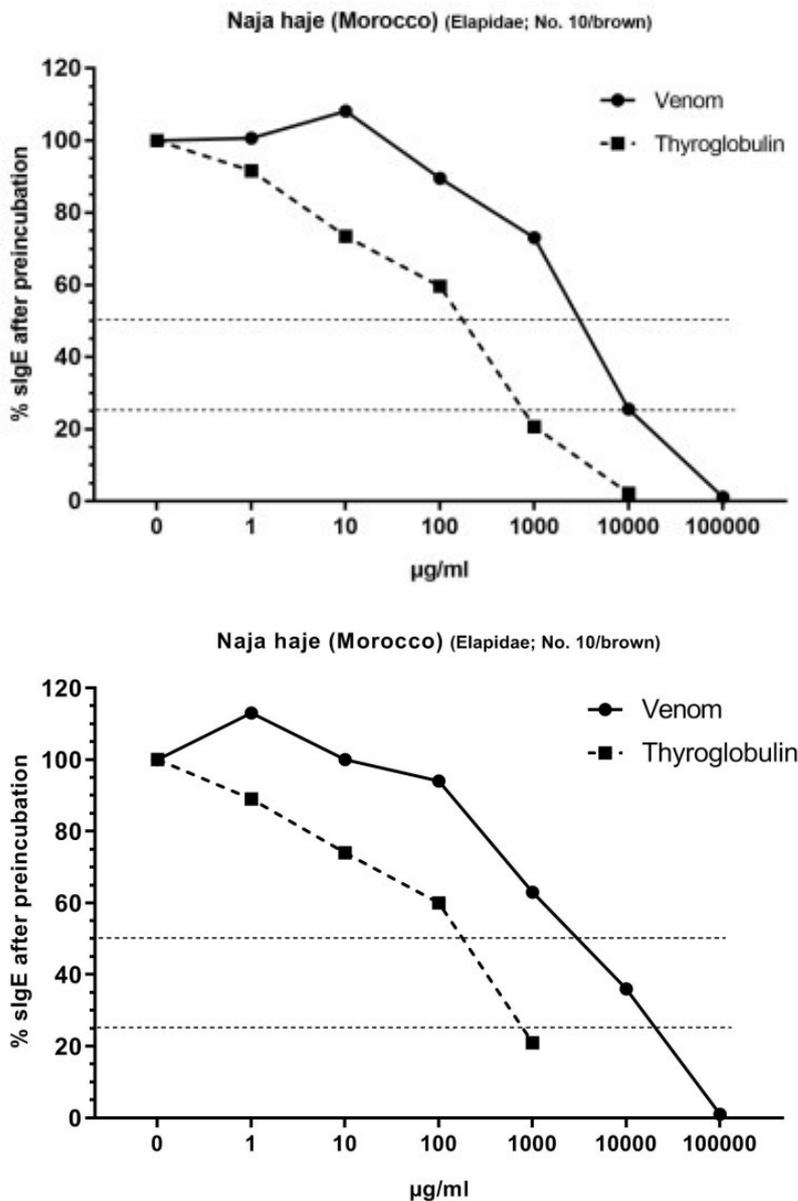
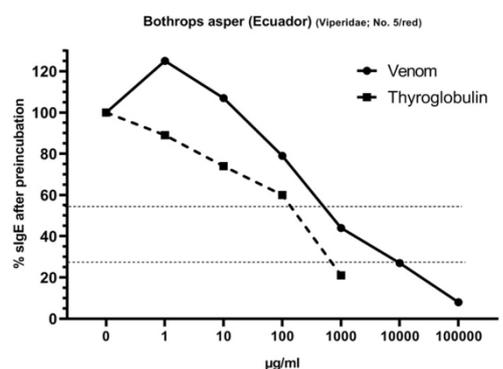
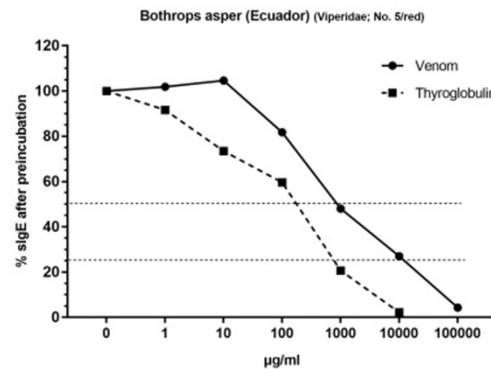
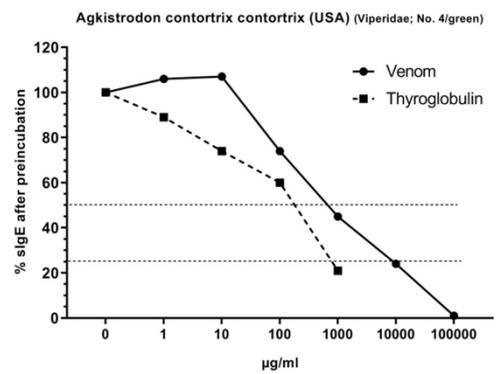
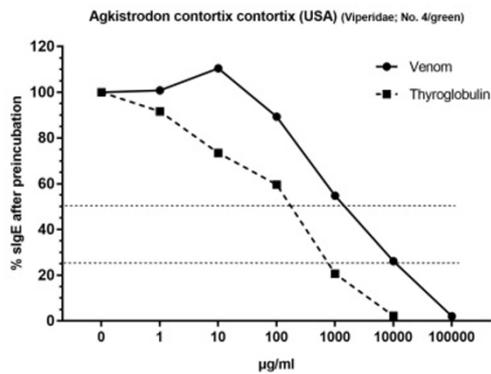
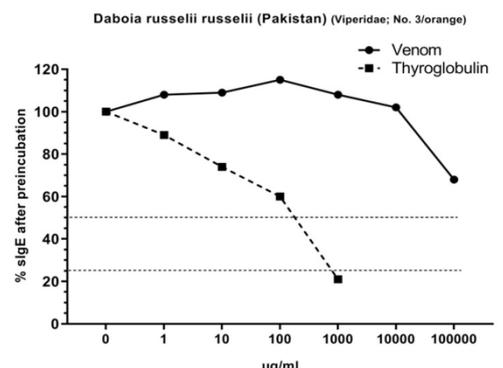
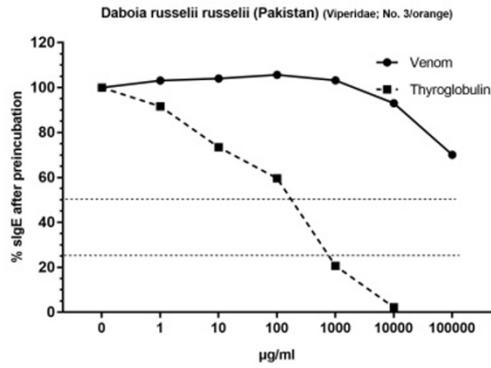
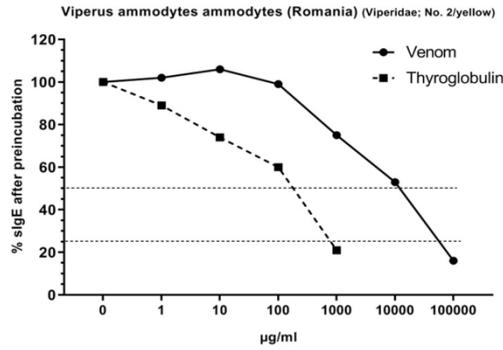
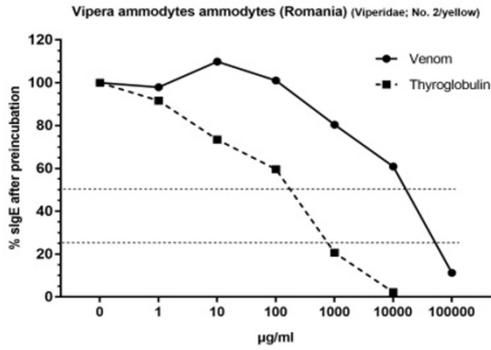
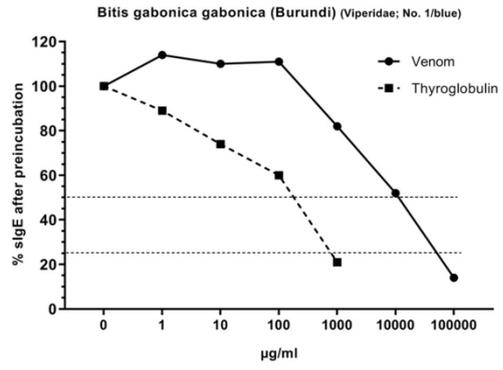
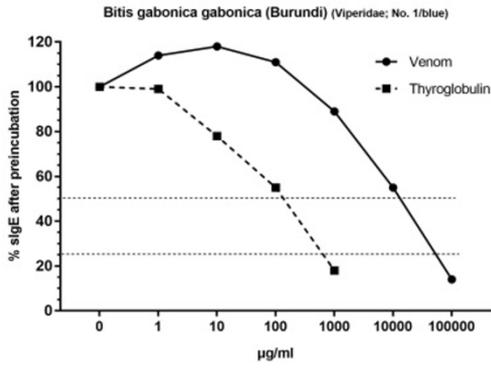


Abb. 27: Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit sIgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der *Naja haje*, als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.

Eine vollständige Inhibition unter 20% des Ausgangswertes an sIgE wird auch mit der Giftprobe der *Naja haje* (Abb. 27) in beiden Versuchsabläufen erreicht.



a

b

Abb. 28: Zusammenfassung der Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit sIgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift en der Familien der Viperidae; als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.

In Inhibitionsexperimenten mit ImmunoCAP hemmen die Giftbestandteile signifikant die Bindung von IgE an o215 (α -Gal). Der Thyroglobulin ImmunoCAP kann mit Schlangengiften der Familie der Elapidae komplett inhibiert werden. Dabei zeigt das Gift der *Naja haje* in beiden Hauptdurchgängen die stärkste Inhibition wobei schon bei geringerer Dosierung die 20% - Marke (und damit komplette Inhibition) erreicht wird, während sich die *Notechis scutatus* am schwächsten inhibieren lässt und mit 22 % knapp eine komplette Inhibition erreicht. Auch Gifte der Viperidae weisen eine fragliche Inhibition im ImmunoCAP auf welche sich inkonkruent zu den Vorversuchen präsentiert (Abb. 28). Diese „Inhibierung“ der gegen α -Gal gerichteten sIgEs ist wahrscheinlich durch die vorab getestete proteolytische Aktivität imitiert.

3.6. ELISAs

3.6.1. Ergebnisse des ELISAs der *Naja kaouthia*, unfraktioniert

Aus den ImmunoCAPs resultierend bedarf es eines neuen Versuchsaufbaus der Inhibition mit neuem Ansatz. Im eigens entworfenen ELISA wurde das Schlangengift ge-coated. Im unfraktionierten Zustand der Gifte zeigt sich ein schwaches aber kongruentes Ergebnis, in welchem sich im Poolserum vorhandene sIgEs in abfallender Konzentration an den ge-coateten α -Gal haltigen Proteinen abfangen lassen (Abb. 29). Um eine Verbesserung und Signalverstärkung zu erreichen wurde der Versuch mit den fraktionierten Giften wiederholt.

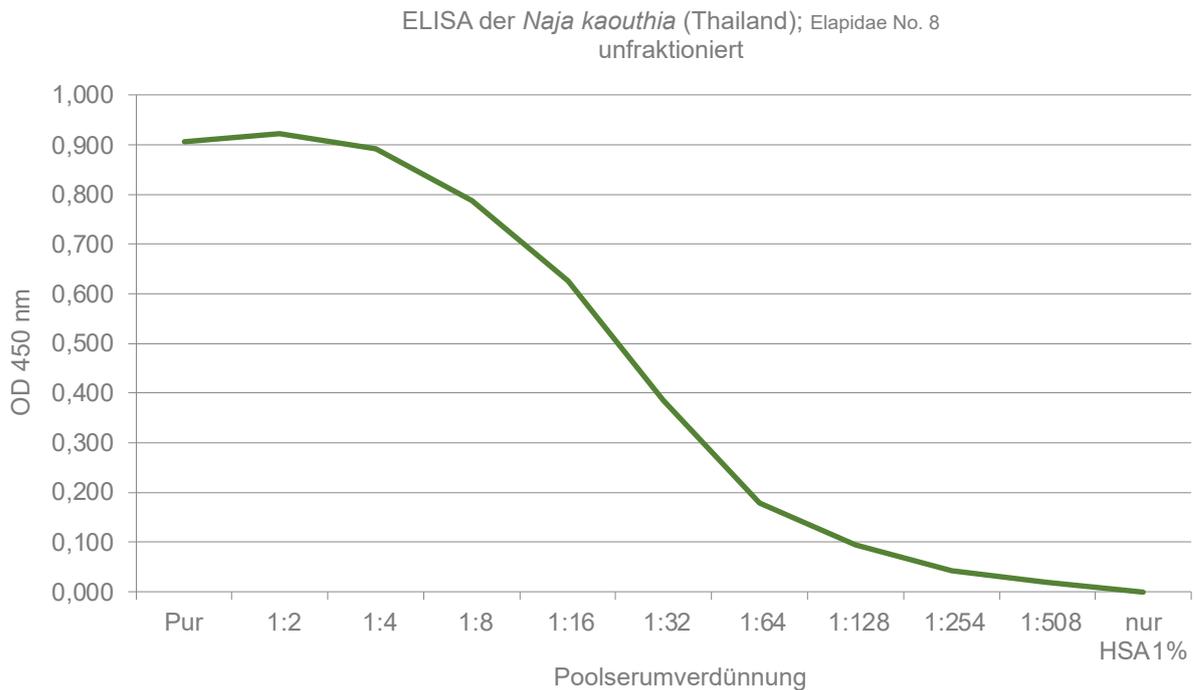


Abb. 29: ELISA mit unfraktionierter Giftprobe der *Naja kaouthia*

3.6.2. ELISA mit diversen Schlangengiftfraktionen

Abb. 30- 33 zeigen die eigens entworfenen ELISAs mit den Gifffractionen der *Naja*'s und der *Notechis scutatus*. Die Fraktionen 9.1 und 9.2 der *Notechis scutatus* zeigen sich überraschenderweise (trotz negativem Immunoblot) im ELISA reaktiv. Das Ergebnis spricht für eine mögliche α -Gal Expression in den oberen Fraktionen der *Notechis scutatus*, die bisher noch nicht aufgedeckt werden konnte. Um nach dieser Entwicklung des idealen, für diesen Versuch abgestimmten ELISAs genau zu prüfen, ob die Reaktionen tatsächlich auf α -Gal zurückzuführen sind, schließen sich Inhibitions-ELISAs im vorgearbeiteten Versuchsaufbau an.

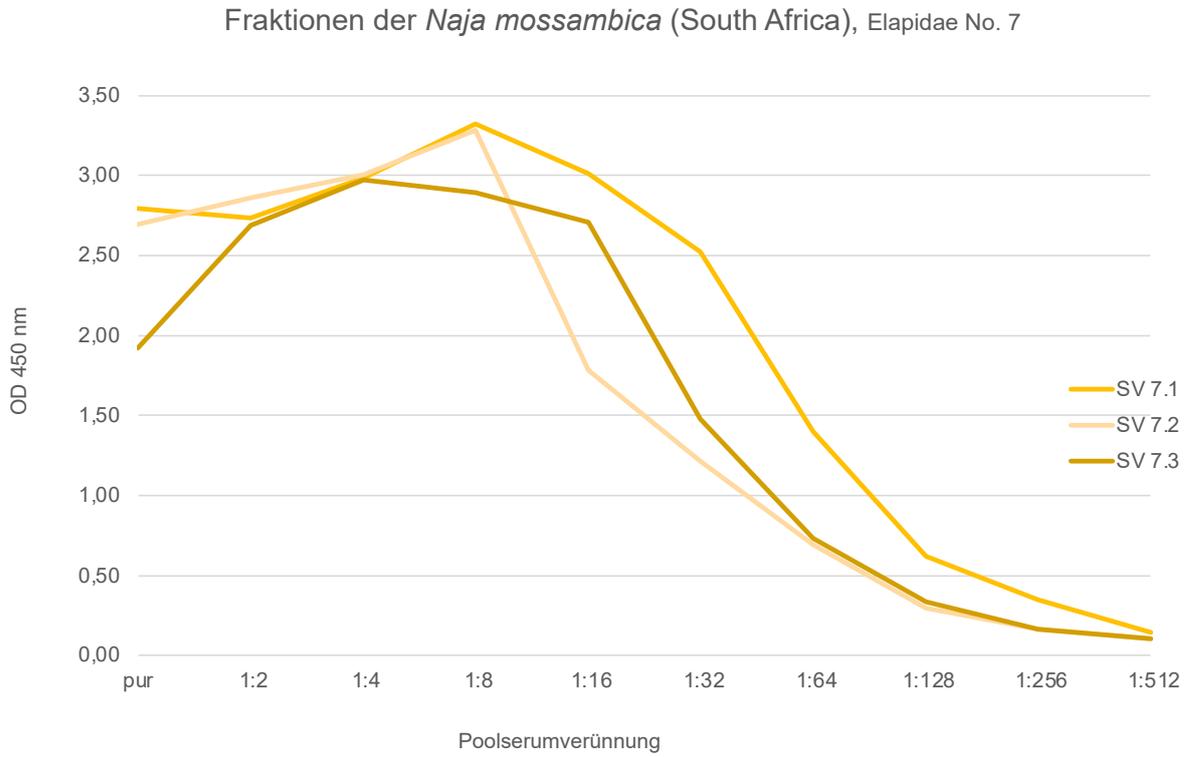


Abb. 30: ELISAs der Fraktionen 7.1-3 der *Naja mossambica*

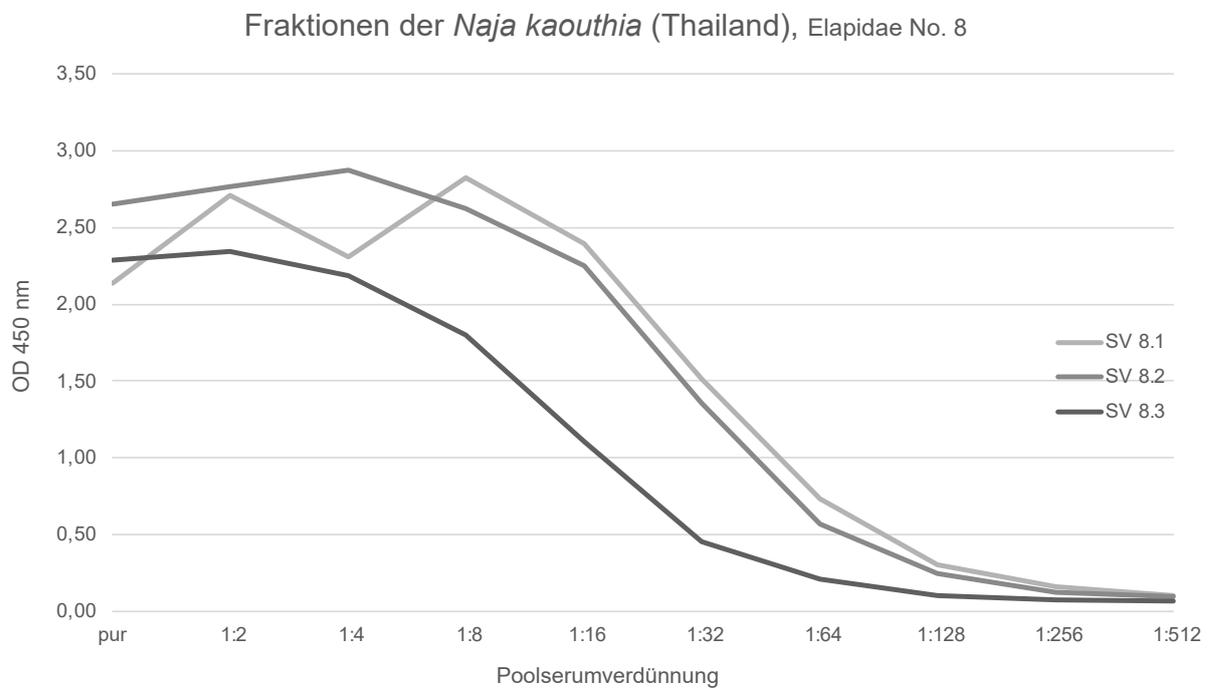


Abb.31: ELISAs der Fraktionen 8.1-3 der *Naja kaouthia*

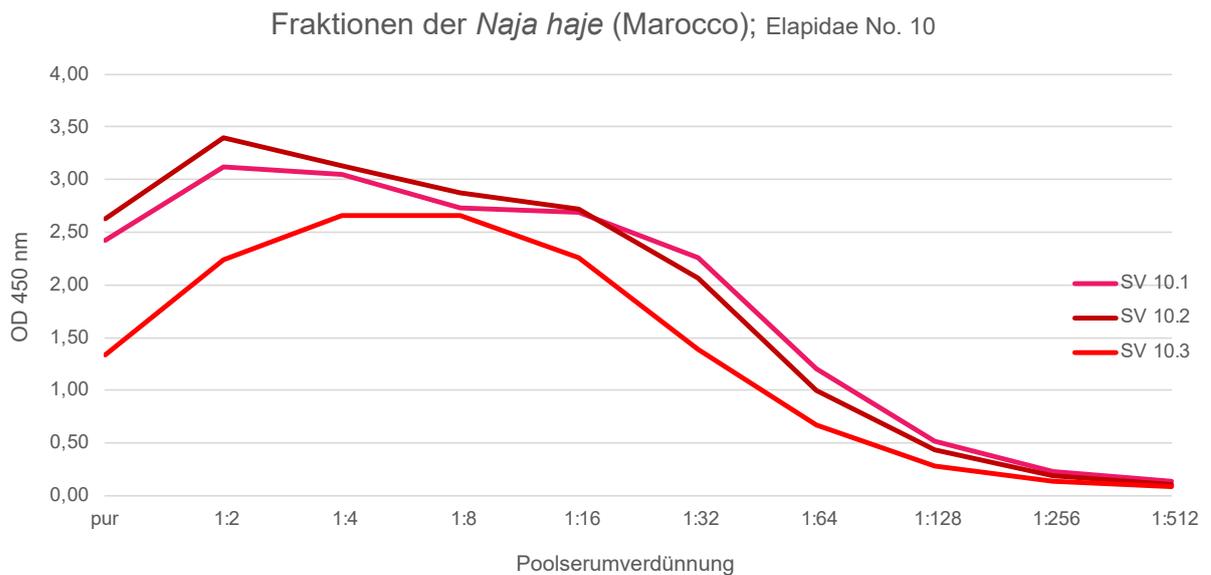


Abb. 32: ELISAs der Fraktionen 8.1-3 der *Naja haje*

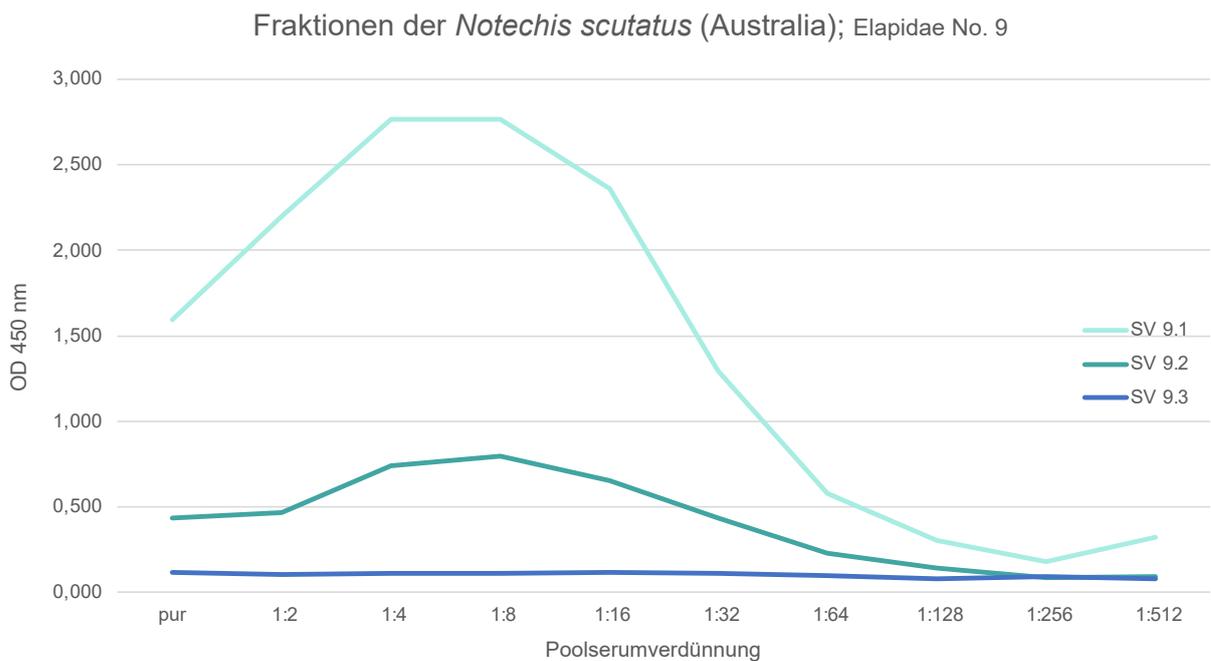


Abb. 33: ELISAs der Fraktionen 9.1-3 der *Notechis scutatus*

3.6.3. Inhibitions-ELISA mit diversen Schlangengiftfraktionen

In der Patientenpoolserumprobe werden sich zwangsläufig weitere spezifische Bindungseigenschaften finden. IgEs, welche an CCD Epitope binden, könnten auch an Komponenten der Schlangengifte binden. Ein kompetitiver ELISA dient

dazu aufzuzeigen, dass die Reaktivität tatsächlich auf α -Gal zurückzuführen ist und dient somit zum Nachweis der Spezifität. Nach Einbezug vorheriger Immunoblots, bei denen sich α -Gal vor allem auf größeren Proteinen nachweisen lies, wurden Fraktionen mit Fokus auf den oberen kDa Bereich aufgetrennt.

Es lies sich somit ein deutlich stärkeres Signal des fraktionieren ELISAs im Vergleich zum unfraktionierten Gift zeigen (Abb. 34-39) und die Inhibition konnte in fast allen Fraktionen mit Ausnahme der 5.1 (*Bothrops asper*) gezeigt werde.

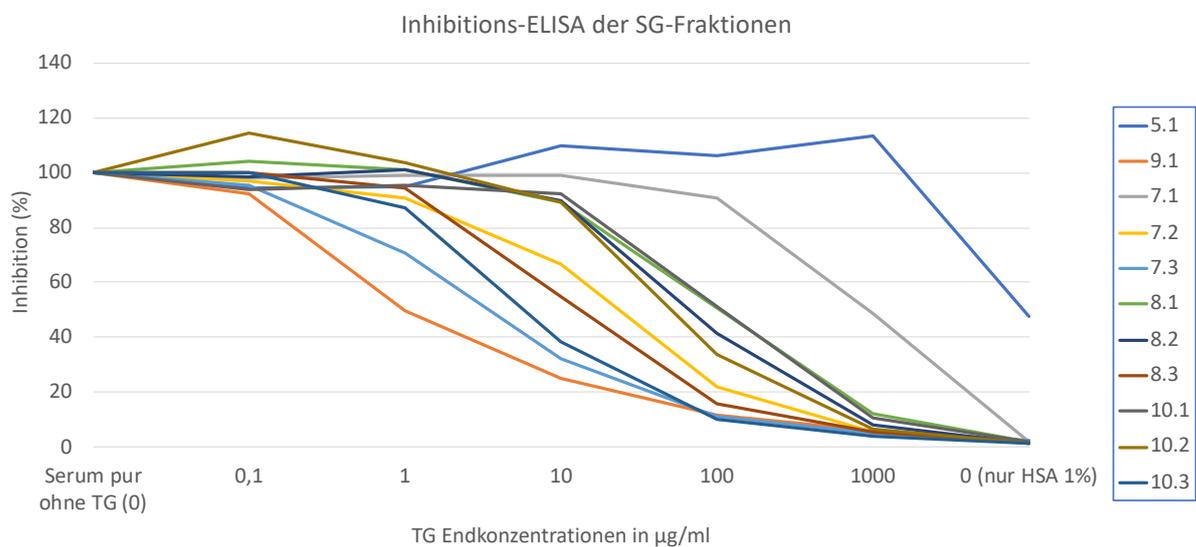


Abb. 34: Grafische Darstellung aller Fraktionen und deren Inhibitionen: Alle getesteten Fraktionen mit Ausnahme der Fraktion 5,1 (*Bothrops asper*) ließen sich komplett inhibieren (unter die Inhibitionsmarke 20%).

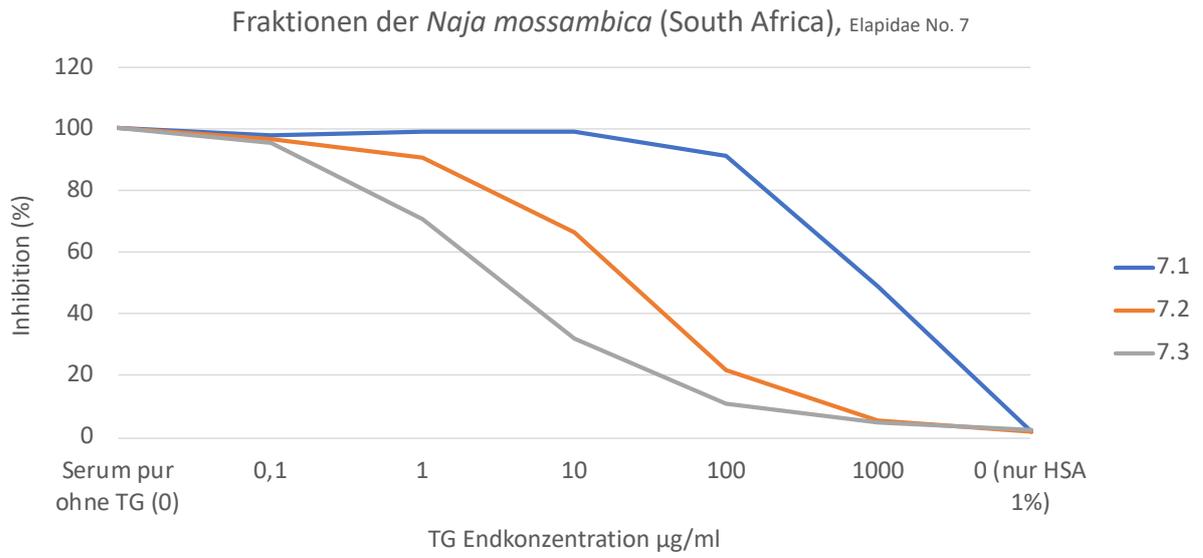


Abb. 35: Inhibitions-ELISA des fraktionierten *Naja mossambica*-Gifts

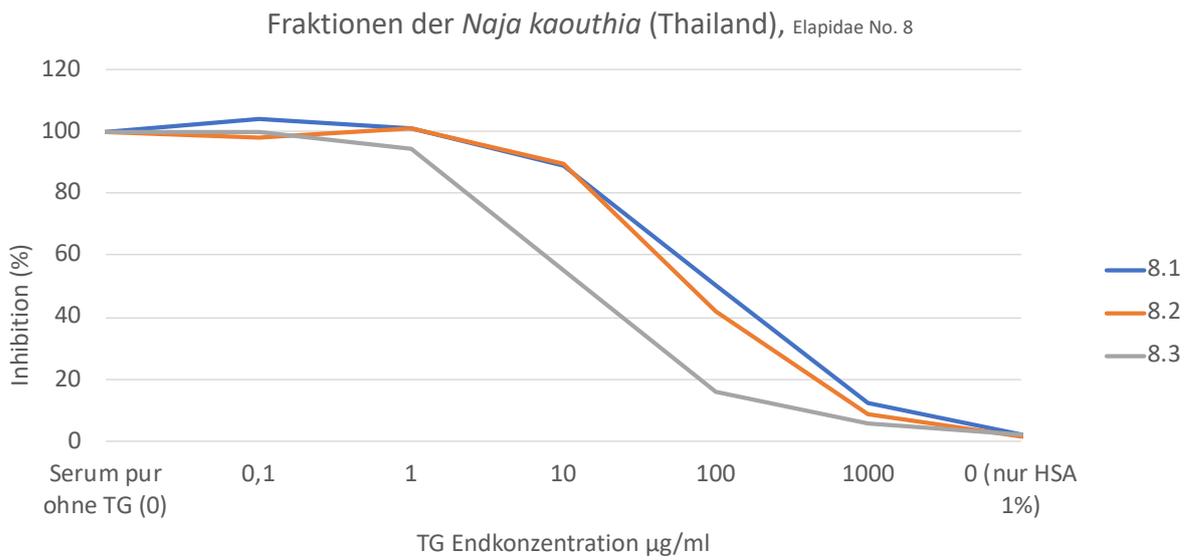


Abb. 36: Inhibitions-ELISA des fraktionierten *Naja kaouthia*-Gifts

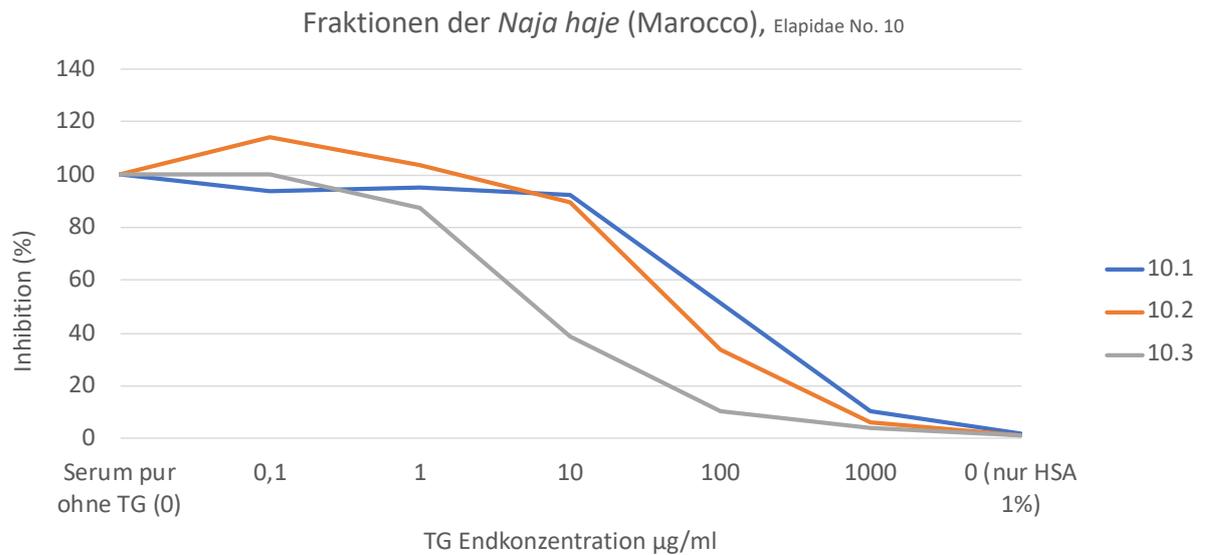


Abb. 37: Inhibitions-ELISA des fraktionierten *Naja haje*-Gifts

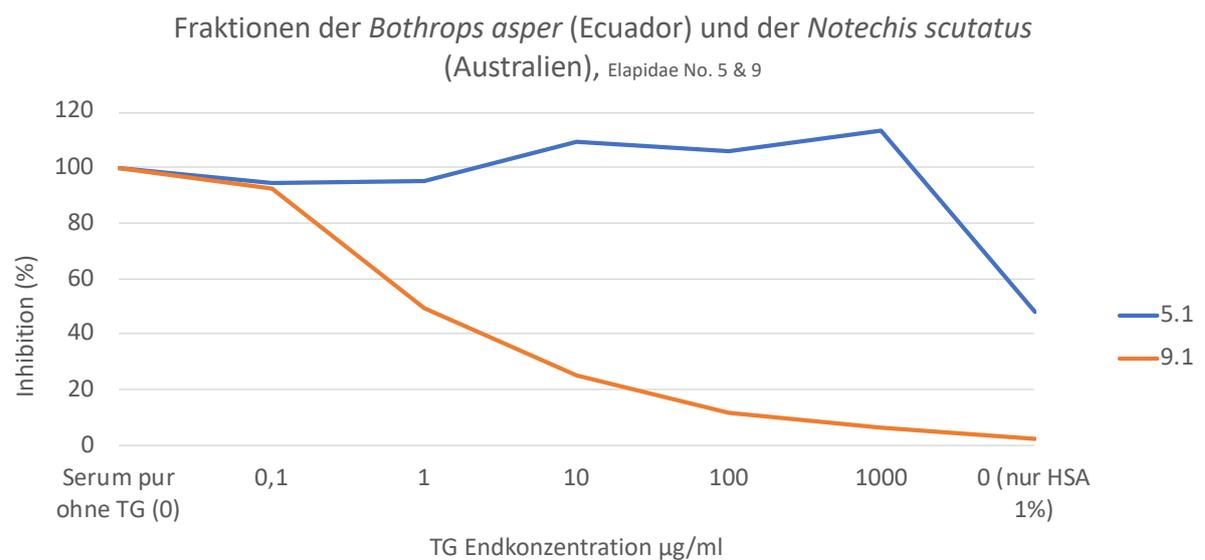


Abb. 38: Inhibitions-ELISA der Fraktionen 5.1 (*Bothrops asper*) und 9.1 (*Notechis scutatus*)

Erwartungsgemäß lässt sich die Fraktion der *Bothrops asper* (Fraktion 5.1) bei vorausgegangenen negativem α -Gal-Nachweis nicht inhibieren. Dahingegen ist eine Inhibition der Fraktion 9.1 der *Notechis scutatus* unter 20% erreichbar und erneut hinweisend auf α -Gal-tragende Proteine in dieser Fraktion.

Die verschiedenen Gifffraktionen erreichen erwartungsgemäß bereits in niedrigeren Verdünnungsstufen die Inhibition unter 20%. Das Signal der ELISAs

mit Giffractionen ist im Vergleich zum Signal mit dem unfraktionierten Gift fast dreifach Verstärkt. Die verbesserte Güte unseres ELISAs lässt sich probatorisch am Beispiel der *Naja kaouthia* zeigen. Hierbei liegt die erreichte OD (450 nm) unfraktioniert bei ca. 1 und fraktioniert in Fraktion 8.1 bei 2,5, in Fraktion 8.2 bei 3 und in Fraktion 8.3 bei 3 (s. Abb. 39).

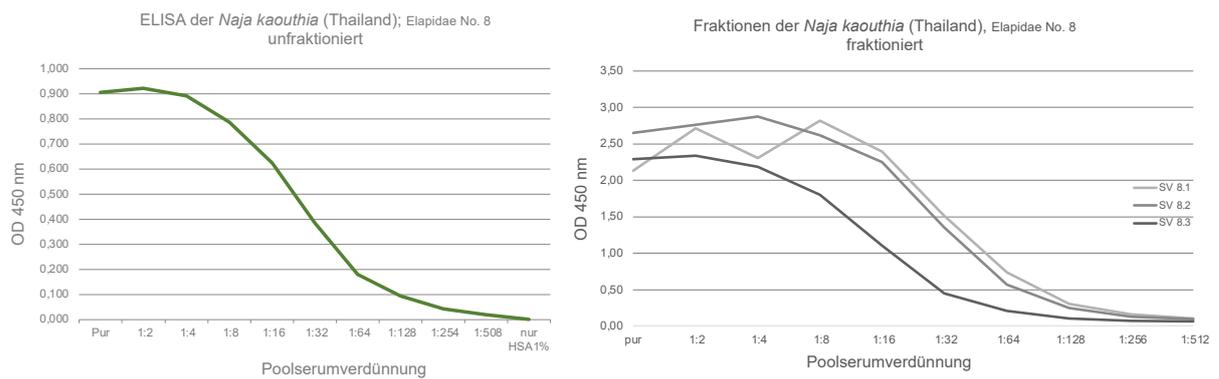


Abb. 39: Vergleich der Optischen Dichte (OD) im ELISA von fraktionierten und unfraktionierten Giften der *Naja kaouthia*

4 Diskussion

Die vielfältigen Aufgaben des Immunsystems schließen sowohl erwünschte als auch unerwünschte Reaktionen ein. Erwünschte Effekte inkludieren unter anderem die spezifische und unspezifische Infektabwehr. Bricht man die spezifische Immunantwort auf 2 Modalitäten herunter, zeigt sich einerseits eine TH1 induzierte Infektantwort, welche vor allem auf die Elimination von Bakterien abzielt, und andererseits eine TH2 induzierte Antwort, welche vor allem auf die Parasiteneliminierung und Wiederherstellung der Homoöstase nach Giftweirwirkung ausgerichtet ist.

Allergiebedingte Krankheiten zählen zu den eher unerwünschten Reaktionen des Immunsystems, wobei Entstehung sowie ein konträrer Nutzen schon lange diskutiert werden. Wann das menschliche Immunsystem auf verschiedene Erreger eine angemessene Reaktion zur Krankheitsabwehr zeigt und dabei harmlose Erreger abgrenzt, und wann es zu überschießenden Reaktionen mit Ausbildung allergiebedingter Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen kommt, ist weiterhin eines der größten Rätsel der rezenten Forschung. Ein erhöhter IgE-Spiegel geht dabei nicht unbedingt mit einer erhöhten Rate an allergischen Reaktionen einher.

Das gehäufte Auftreten von Allergien in westlichen und wirtschaftlich entwickelten Ländern im Vergleich zu Entwicklungsländern bestärkt einige Theorien, welche einen Zusammenhang zwischen chronischer Helminthen-, Mikroben- und Protozoeninfektionen und der fehlenden Ausbildung von Allergien sehen (Smits et al., 2010). In Bevölkerungen mit niedriger Prävalenz für klinische Allergien und hohem Aufkommen parasitärer Infektionen beschreibt diese Hypothese, dass ein derartiger immunogener Kontakt eine schützende Funktion gegenüber allergischer Erkrankungen ausübt.

Insbesondere eine chronische Helmintheninfektionen induziert eine Expression von regulatorischen Netzwerken, welche bei der Herunterregulierung allergischer Immunreaktionen auf harmlose Antigene erforderlich sind (Smits et

al., 2010). Das sog. Helminthenparadoxon beschreibt dabei die durch eine chronische Helmintheninfektion induzierte TH2 Immunantwort mit erhöhtem IgE-Titer sowie einer Eosinophilie, jedoch ohne Ausbildung einer allergischen Erkrankung. Das induzierte Netzwerk an herunterregulierenden Effektoren im Rahmen der eigenen Überlebensstrategie des Parasiten (sowohl gegen TH2 als auch TH1 gerichtet) wirkt über die Unterdrückung des Wirtsimmunsystems, welche durch die Aktivität von regulatorischen T-Zellen (Treg) und B-Zellen sowie der Modulation des angeborenen Immunsystems über Makrophagen, dendritischen Zellen und lokalen Stromazellen zu einem allgemein entzündungshemmenden IL-10 und TGF β dominierten Umfeld führt (Maizels and Yazdanbakhsh, 2008, Smits et al., 2010).

Eine weitere Theorie setzt sich mit einer allgemeinen Blockade allergenspezifischer IgE-Reaktionen auseinander, welche durch Ausbildung hoher polyklonaler (z.B. parasitenspezifischer) IgE induziert wird. Erhöhte IgE-Reaktionen auf spezifische immunogene Glykane, wie beispielsweise während einer chronischen *Schistosoma mansoni*-Infektion, könnten zu reduzierten allergischen Reaktionen führen (Nkurunungi et al., 2021). Dabei ist ein hoher IgE Spiegel nicht mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Allergie assoziiert. Aber auch die IgE-Produktion der gegen sog. Kreuzreagierende Kohlenhydrat-Determinanten (CCDs), welche sich auf fast allen pflanzenextrakten und Insektengiften von Hymenopteren nachweisen lassen, beschreibt eine mögliche protektive Funktion im Bezug auf die Ausbildung einer Allergie. Ein erhöhter IgE Spiegel nach *Schistosoma heamatobium* -Infektion gegen CCDs führte in Studien zu hohen IgE Spiegeln gegen Ernuss-Allergene, jedoch ohne Nachweis einer IgE-vermittelte Erdnussallergie. Demgegenüber waren die aus Pflanzen gewonnenen CCDs (Bromelain), welche die IgE-Bindung an Erdnussallergene hemmen, im Vergleich zu einem aus Schistosoma-Arten gewonnenen hemmenden Glykoprotein, deutlich schwächer (Amoah et al., 2013).

Ein weiteres Beispiel für ein erhöhte IgE-Aufkommen ohne resultierender allergischer Reaktion findet sich bei Betrachtung der Allergien auf Insektengift. Hierbei herrscht ein diskrepantes Verhältnis von Insektengiftallergikern in der

Bevölkerung (ca. 3%) zur Prävalenz des Insektengift-IgEs (40-50%) vor (Rueff et al., 2023). Im Unterschied zur CCD-Antikörpern stellt hier die primäre Giftkomponente das Epitop der Immunreaktion dar. Bei der IgE-Antikörperreaktion gegen α -Gal sind die Antikörper ebenfalls gegen immunogene Zuckerpeptide gerichtet. Die Entstehung der IgE-Antikörper gegen immunogene Zuckerepitope als Produkt einer immunologischen Auseinandersetzung mit einem Pathogen sind nicht ungewöhnlich und nicht zwangsläufig mit einer pathologischen TH2 Reaktion der IgE-vermittelten Soforttypreaktion assoziiert.

Zu den TH2-induzierten Symptomen gehören unter anderem Juckreiz, Weichteilschwellungen, Schnupfen und Niesen, Husten, Durchfall und Unterleibskrämpfe. Derartige Abwehrmechanismen können als Strategie der ersten Verteidigungslinie zum einen Parasiten eindämmen oder beseitigen, aber auch dazu beitragen, Toxine auszuscheiden oder zu neutralisieren. Für die Entgiftung spielen vor allem Mastzellen und Basophile eine entscheidende Rolle (Hammad et al., 2022). Die Aktivierung der Mastzellen führt über Ausschüttung einer Vielzahl vorgebildeter Substanzen wie Histamin, Glykosaminoglykane, Serin-Proteasen (v.a. Trypsasen), Prostaglandine, Leukotriene und Zytokinen zu einer Signalkaskade, um im besten Falle der Inaktivierung bzw. Neutralisation gewebetoxischer Fremdproteine beitragen. Schlangengifte haben mit ihren gewebetoxischen sowie neuro- und kardiotoxischen Eigenschaften eine hohe Schädigungswirkung. Als therapeutischer Ansatz erfolgt die Gabe eines Antivenins um die Gifteliminierung bzw. die Neutralisation mittels IgG-Antikörpern als Fab-Fragmente zu gewährleisten. Um sich möglichst rasch der unwillkommenen Substanzen zu entledigen, ist die TH2 gerichtete Immunantwort des menschlichen Organismus neben der angeborenen Mastzellabwehr eine der ersten direkten Möglichkeiten, der Giftexposition entgegenzuwirken. Die IgE-Bildung im Rahmen der TH2-vermittelten Reaktion gilt hier als Element der Zusammenarbeit von angeborenem (Mastzellaktivierung) und adaptivem Immunsystem (Antikörperbildung). Durch eine spezifische TH2 vermittelte Immunantwort kann

es aber auch zu gefährlichen anaphylaktischen Reaktionen auf Schlangenbisse kommen (Mittendorf and Winskog, 2024). Im menschlichen Immunsystem finden sich verschiedene Pathways und Teilkomponenten zur Gifteliminierung. Neutralisierende Antikörper und eine Mastzellaktivierung sind hierbei als synergistische Schritte zu sehen.

Das angeborene Immunsystem erkennt gewisse „Danger-Signale“. Damit wird vor allem die Aktivierung des angeborenen Immunsystems über „Pattern-Recognition Receptors“ (PRRs) nach Erkennen von sog. „Pathogen-assoziierten molekularen Mustern“ (PAMPs) aufgefasst, bei denen es sich um körperfremde Zuckermoleküle, Zellwandkomponenten, Peptide oder Proteine von pathogenen Organismen handelt.

Das Konzept eines „Danger-Signals“ ergibt sich aus ubiquitär vorkommenden charakteristischen Strukturmotiven, welche zum essentiellen Bestandteil des jeweiligen Pathogens gehören und dabei innerhalb einer Pathogenklasse evolutionär konserviert sind. α -Gal stellt in diesem Kontext ein interessantes Epitop dar. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens erfüllt es das Konzept eines „Danger-Signals“ zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems, welches auch nach einem erstmaligen Kontakt ohne vorausgegangene Sensibilisierung wirken könnte. Es wirkt damit als körpereigenes universelles Antidot. Noch dazu ist der natürliche Anti-Gal-Antikörper einer der am häufigsten vorkommenden Antikörper des Menschen, dessen kontinuierliche Stimulation durch α -Gal-ähnliche Epitope, welche in bakteriellen Zellwänden des normalen gastrointestinalen Mikrobioms vorhanden sind, aufrecht erhalten wird. Die Ausbildung dieses natürlichen Antikörpers erfolgte als evolutionärer Anpassungsprozess vor ca. 28 Millionen Jahren als Antwort auf den Verlust des glykolysierenden Enzyms und damit dem Verlust der Immuntoleranz gegenüber dem α -Gal Epitopes (Galili, 1993, Galili and Swanson, 1991, Galili, 2023b). Beschriebene pathogene Erreger, welche ein α -Gal-Epitop exprimieren, werden dadurch vom adaptiven Immunsystem erkannt. Dazu zählen Viren (Takeuchi et al., 1996, Galili et al., 1996, Repik et al., 1994, Welsh et al., 1998), Bakterien (Han et al., 2012) und Protozoen (Almeida et al., 1994).

4.1. Die Toxin-Hypothese der Allergie

IgE-vermittelte Reaktionen haben ein kinisch breites Spektrum und reichen von allergischen Rhinitiden bis zur vital bedrohlichen Anaphylaxie. Ab wann eine TH2-vermittelte Antwort im Sinne einer IgE-vermittelten Soforttypreaktion pathologisch wird, hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab und ist nicht vollständig geklärt. In Profet's evolutionsbiologischem Ansatz spielen die allergischen Reaktionen insbesondere als Warnsignal eine überwiegend positive Rolle. Im fiktiven Beispiel einer Nahrungsmittelallergie des als wildbeutenden lebenden Frühmenschen ist eine allergische Reaktion auf eine bestimmte Frucht und ein sich entwickelndes orales Allergiesyndrom keine gefährliche Reaktion. In diesem Sinne ist die Reaktion ein Feedback des Körpers, welches über Missemmpfinden nach dem Verzehr den weiteren Konsum unterbinden soll. Betrachtet man verschiedene Versuche im Tiermodell mit Mäusen, denen ein Bienengift injiziert wurde, stellt die Anaphylaxie eine maximale Körperreaktion bei vitaler Bedrohung dar und wird als solche nicht unbedingt als rein pathologische Reaktion verstanden. Das Tiermodell mit ca. 800-1000 µg Bienengift (4-5 x 200 µg pro Maus, entsprechend einer letalen Dosis des Honigbienengifts und Äquivalent zu 6 Bienenstichen (Starkl et al., 2022, Marichal et al., 2013)) der 18 g schweren Mäuse kann mit dem ungefähr ähnlichen Gefahrenpotential eines Schlangenbisses für den Menschen betrachtet werden. Das Bienengift als solches stellt für den Menschen keine Vergiftung dar, kann jedoch häufiger ein Grund für eine bedrohliche Anaphylaxie sein.

Verschiedene Toxine wie beispielsweise Skorpion-, Honigbienen-, Wespen-, Ameisen-, Schnabeltier-, Eidechsen-, Spinnen und Schlangengifte können zur Aktivierung und Degranulation von Mastzellen führen (Tsai et al., 2015, Palm et al., 2013). Eine IgE- verstärkte Rekrutierung von toxinbekämpfenden Mastzellproteasen kann durch induzierte TH2 Reaktion und ihre einhergehende

IgE-Produktionssteigerung erreicht werden. Es erfolgt eine synergistische Antwort des spezifischen und unspezifischen Immunsystems. Erworbene TH2 Immunreaktionen und beispielsweise deren Entwicklung von giftspezifischen IgE-Antikörpern erhöhen dadurch die Resistenz von z.B. Mäusen gegenüber potenziell tödlichen Dosen eines Giftes. Dies erfolgt unter anderem durch Mastzellrekrutierung und proteolytischen (auch unspezifischen) Abbau der Giftkomponenten (s. Abb. 41).

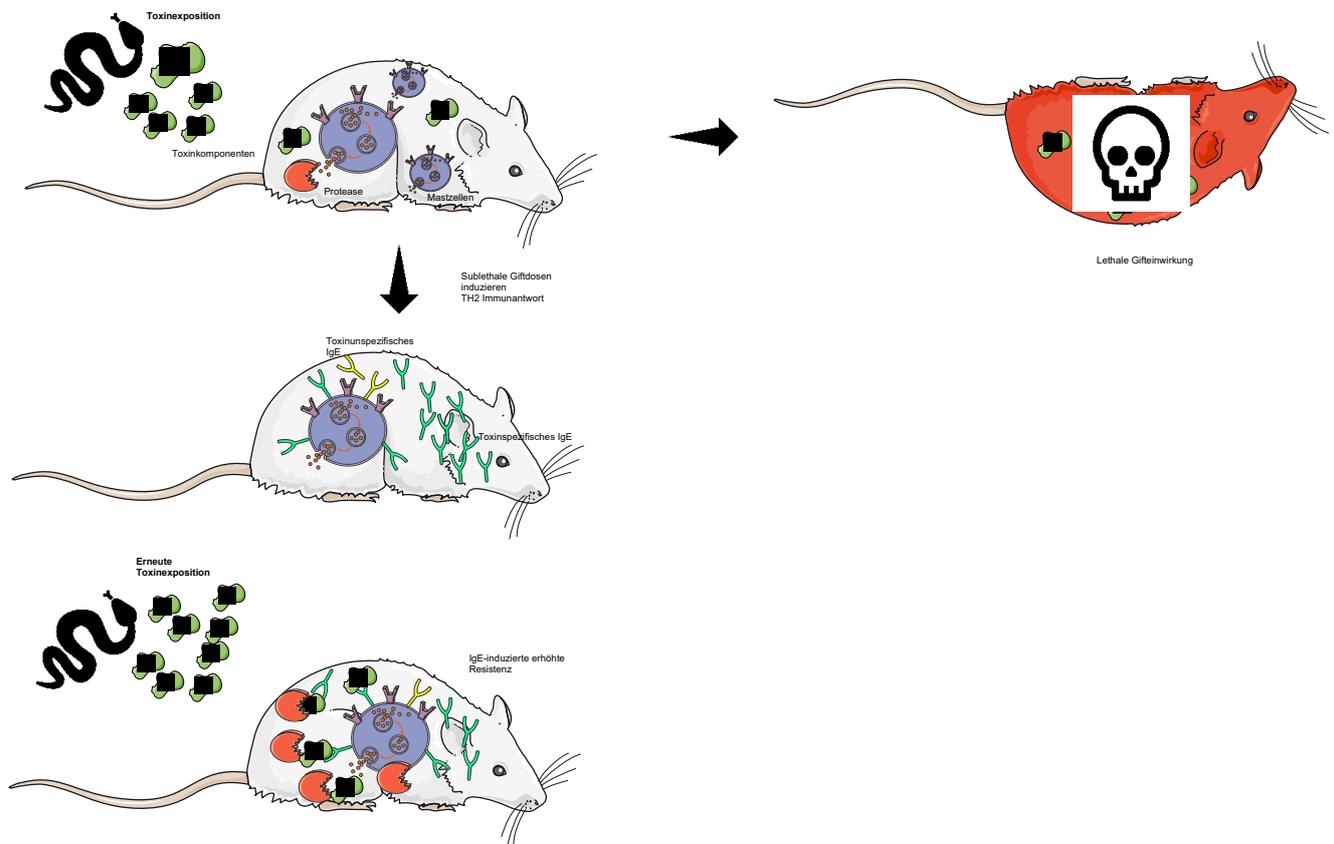


Abb. 40: Schema der TH2-Induzierten Immunantwort nach Toxinexposition (Tsai et al., 2015); Dargestellt ist der erste Kontakt eines Säugetiers mit einem Schlangengift und die dadurch induzierte TH2-abhängige IgE-Produktion (spezifisch und unspezifisch), welche durch rasche Gifteliminierung durch Mastzellrekrutierung und Proteolyse zur erhöhten Resistenz gegenüber mindestens der bekannten Toxinanteilen führt und dadurch einen Überlebensvorteil bietet. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung von Servier Medical Art erstellt, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 unported license

Würde ein Säugetier beispielsweise nach α -Gal Sensibilisierung über Zeckenbisse nun mit Schlangengiften in Berührung kommen, könnte diese IgE-getriggerte, TH2 abhängige Reaktion auf Toxinanteilen zum

proteolytischen Abbau führen, bei tödlicher Giftdosis könnte dies eine Überlebenschance bieten. Abb. 41 veranschaulicht die schematische Darstellung dieser Hypothese, wodurch die TH2-induzierte IgE-Produktion die darauffolgende rasche Gifteliminierung durch Mastzellrekrutierung und Proteolyse bewirkt.

Auf dem heutigen Wissensstand verstehen wir die Wechselbeziehung zwischen TH2-Abwehrreaktionen und Allergien noch nicht, obwohl es eine bedeutsame Schlüsselfrage im Verständnis der Soforttypallergie darstellt. Als eine geeignete Modellerkrankung für diese gegenwärtige Fragestellung steht das α -Gal Syndrom mit seiner einzigartigen Verbindung zwischen umweltinduzierter Erkrankung und einer alltagsrelevanter Allergie.

4.2. α -Gal und Schlangengift

Das Disaccharid α -Gal ist ein für den menschlichen Organismus immunogenes Epitop, welches auf vielen Proteinen im Tierreich vorkommt. Grund für das immunogene Potential ist unter anderem das Immunglobulin Anti-Gal, der häufigste natürlich vorkommende Antikörper des Menschen (Galili et al., 1984). Die durch B-Zellen initiierte anhaltende Produktion wird durch die kontinuierliche Stimulation des physiologischen Darmmikrobioms aufrechterhalten (Galili et al., 1988a, Galili et al., 1993, Galili, 2023a). Sein Vorkommen lässt sich ab der evolutionären Abspaltung der Schmalnasenaffen, Menschenaffen und Menschen nachverfolgen (Galili et al., 1987, Galili, 2023b) und geht wahrscheinlich mit dem Verlust des verantwortlichen Enzyms α 1,3GT vor ca. 28 Millionen Jahren und der daraufhin fehlenden Immuntoleranz bei ausbleibender Expression des α -Gal Epitops einher (Galili, 1993, Galili and Swanson, 1991).

4.2.1. Identifikation α -Gal tragender Proteine in Schlangengiften

In der Vergangenheit wurden Glykane in Schlangengiften bzw. definierten Giftkomponenten analysiert. Dabei wurde auch α -Gal als eine der vorkommenden Zuckerstrukturen in Schlangengiften der *Naja atra* und *Naja kaouthia* (Gowda et al., 2001, Gowda et al., 1992, Huang et al., 2015) beschrieben. Bislang fehlen hierzu Untersuchungen, welche gezielte α -Gal-Vorkommen auf verschiedenen Kontinenten der Schlangenverbreitung und in Schlangenfamilien übergreifend systematisch analysieren. Darüber hinaus bleibt eine allergologische Perspektive des α -Gal Epitops auf Schlangengiften im Kontext mit dem erst seit 15 Jahren bekannten Krankheitsbildes eines α -Gal Syndroms aus.

Mittels Immunoblotting im Westernblot wurden ausgewählte Schlangengifte verschiedener Spezies aufgetragen und untersucht. Hierbei zeigten sich reproduzierbare Bandenmuster mit α -Gal tragenden Proteinen in Giftkompositionen der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia* und *Naja haje*. In den 5 Schlangengiften der Familie der Viperidae lässt sich in unseren Versuchen kein α -Gal im Immunoblot nachweisen, unter den Elapidae zeigt sich in den Giftproben der *Dendroaspis polylepis* und *Notechis scutatus* vorerst kein α -Gal Nachweis.

Die Erkenntnisse ließen sich auch im ELISA reproduzieren. Nach mehreren Wiederholungen der Versuche, unter anderem mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (Verdünnungsstufen), Blockingpuffern, Veränderungen des Laufverhaltens im Gel durch Zeitumstellungen, Veränderung der Inkubations- und Beschichtungszeiten im ELISA, wurden die Gifte beider Schlangenfamilien noch zusätzlich fraktioniert. Diese Fraktionierung soll eine mögliche sterische Behinderung der Inhibition durch große Proteine ohne α -Gal verringern. Eventuell überdeckte kleinere Proteine mit α -Gal oder auch Proteine, welche im Verhältnis zur Proteingröße geringere Epitopenausprägungen zeigen, könnten nun detektiert werden.

Um bisher negative Giftproben genauer untersuchen zu können wurden die Fraktionen der α -Gal negativen Arten der Elapidae (*Dendroaspis polylepis* und *Notechis scutatus*) sowie ein Vertreter der Viperidae (*Bothrops asper*) ebenfalls in den Versuchablauf eingeschlossen. Aufgrund der allgemein höheren Proteinkonzentrationen (von 141- 206 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ im Bradford Protein Assay) der Viperidae wäre nach Fraktionierung eine Demaskierung α -Gal tragende Proteine möglich. Jedoch zeigten die Giftfraktionen der Viperidae-Arten weiterhin keine Inhibition und somit lässt sich weder bei den unfraktionierten noch bei den fraktionierten Giften α -Gal nachweisen. Tatsächlich liesen sich demgegenüber in Fraktionen der *Notechis scutatus* positive Resultate erbringen. Inhibitionen in Fraktion 9.1 und leichte Inhibition bei 9.2 deuten auf mögliche Proteine mit geringer (9.2) bis hoher (9.1) α -Gal-Expression der *Notechis scutatus* hin.

Des Weiteren zeigt sich in den Fraktionen ein bis zu dreifach stärkeres Signal im ELISA durch stärkere Inhibierung. Dies bekräftigt die Theorie der sterischen Inhibition und die Fraktionierung könnte für zukünftiger Versuchabläufe ein wichtiger erster Schritt sein.

Folglich gelingt der α -Gal Nachweis in Giften der Elapidae, während in den Viperidae-Giften der Nachweis des α -Gal Epitops ausbleibt. Bei den positiv getesteten Elapidae handelt es sich v.a. um Naja-Arten in verschiedener geographischer Verbreitung, wobei Spezies aus Südafrika (*Naja mossambica*), Thailand (*Naja kaouthia*), Marokko (*Naja haje*) als auch Vertreter der Tigerottern in Australien (*Notechis scutatus*) α -Gal exprimieren.

In unserer Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF konnte die Reaktivität gegen gewebstoxische Komponenten identifiziert werden. Dort finden sich unter den α -Gal exprimierenden Proteinen der *Naja kaouthia* und *Naja haje* jeweils der CVF, SVMPS finden sich in Giftbestandteilen der *Naja mossambica* sowie der *Naja haje*. Auch Aminosäureoxidasen (L-Aminosäureoxidase, LAAO) konnten als α -Gal tragende Proteine identifiziert werden. Diese Oxidasen kommen sowohl in der Familie der Elapidae als auch Viperidae vor (Hui and Yap, 2020), sind jedoch in unseren Versuchen nur in Giften der *Naja*'s als α -Gal

tragend zu identifizieren. An ihnen wird unter anderem intensiv als Chemotherapeutikum mit zytotoxischen Effekten in Krebszellen geforscht (Hui and Yap, 2020, Tan et al., 2018, Oliveira et al., 2022). Dank der feineren Auftrennung nach Giffraktionierung konnten im zweiten MALDI-TOF weitere α -Gal haltige Proteine identifiziert werden. Diese sind in der bisherigen Literatur nicht als α -Gal haltige Proteine klassifiziert worden. Sie umschließen Nukleidasen (Snake venom 5'-nucleotidase, 5'NUC), Phosphodiesterasen (Snake Venom phosphodiesterase 5, SVPDE und Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 isoform X5 ENPP), Endonukleasen (Endonuclease domain-containing 1 protein), sowie partielle Proteine des schwangerschaftsspezifischen beta-1-Glykoproteins 5 (PSG5), das karcinoembryonalen Antigen-verwandten Zelladhäsionsmolekül 8-ähnlichem Protein (CEA), Schlangengiftphosphodiesterase (SVPDE) und eine deutlich kleinere Endonuklease.

Diese Ergebnisse fügen sich schlüssig in die bisherige Datenlage ein. Bei den in der Literatur beschriebenen α -Gal haltigen Proteinen handelt es sich vor allem um den Cobra Venom Factor (CVF) und die Snake Venom Metalloproteinase (SVMP) (Huang et al., 2015, Gowda et al., 2001). An CVF wurde vor allem im Zusammenhang mit Komplementsystem aktivierender Pathophysiologien geforscht (Vogel et al., 1996). Hierbei wurden bereits Bindungsreaktionen von Humanserum an CVF beschrieben, welche auf natürlich vorkommende IgE-Antikörper gegen α -Gal zurückzuführen waren (Gowda DC, 1994).

Es stellt sich die Frage, ob auf diesen Proteinen in anderen Schlangenspezies ebenfalls eine α -Gal Expression nachgewiesen werden kann und ob sich zwischen den gleichen Spezies neben der Proteinzusammensetzung des Gifts auch eine α -Gal-Expression abhängig von Lebensraum mit verschiedenen Umweltbedingungen, Alter, Geschlecht und Beuteschema unterscheiden lässt.

4.2.2. Allergische Reaktionen auf Schlangengifte durch α -Gal

Schlangengift kann allergische oder anaphylaktische Reaktionen hervorrufen, die auf eine Proteinmischung aus Aminosäuren, toxischen Peptiden, Metalloproteinen, proteolytische Enzyme, Peptidhydrolasen, Phospholipasen A2, Hyaluronidasen und Phosphodiesterasen in ihrem Gift zurückzuführen sind. Die Bestandteile selbst fungieren als Auslöser oder in Verbindung mit gebundenen Serumproteinen (Kounis and Soufras, 2014, Schmutz and Stahel, 1985). Bereits im Jahre 1987 wurden bei einem Patienten mit regelmäßigem Hautkontakt zu Schlangengiften plötzlich auftretende allergische Reaktionen nach dermalen Giftexposition wie Urtikaria, Dyspnoe, angioneurotische Ödeme und Hypotension beschrieben. Es konnte außerdem eine spezifische IgE-Produktion bei dem sensibilisierten Patienten nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich für ähnliche allergische Reaktionen bei artspezifisch verwandten Schlangengiften verantwortlich war (Wadee and Rabson, 1987). Die Abgrenzung der Giftwirkung und/oder einer Reaktion auf eine IgE-vermittelte Immunantwort kann mitunter schwierig sein, auch wenn es immer wieder Fälle mit nachgewiesenen anaphylaktischen Reaktionen auf Schlangenbisse gibt (Mittendorf and Winskog, 2024).

4.2.3. Das α -Gal-Syndrom

Das α -Gal-Syndrom (s. Abb. 40) beschreibt ein komplexes Krankheitsbild, welches durch IgE-Antikörper gegen α -Gal ausgelöst wird (Fischer and Hilger, 2017, Hilger et al., 2019, Chakrapani et al., 2022). IgE wird durch Umwelteinflüsse indiziert, eine Sensibilisierung ist unter anderem auf Zeckenbisse oder weitere Arthropodenvektoren zurückzuführen (Commins et al., 2011).

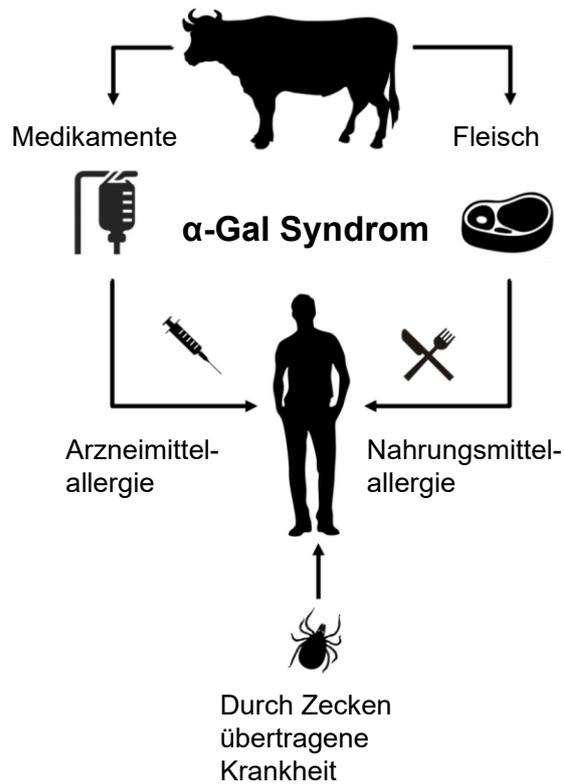


Abb. 41: Schematische Darstellung des α -Gal Syndroms (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Jörg Fischer)

Das α -Gal Syndrom präsentiert sich unter anderem durch allergische Reaktionen nach Genuss von tierischem Lebensmitteln wie beispielsweise von rotem Fleisch, aber auch nach Medikamenteneinnahme tierischen Ursprungs (Hilger et al., 2019).

Folglich müssten bei Patienten mit Sensibilisierung auf α -Gal auch eine Reaktion auf α -Gal haltige Toxine nachzuweisen sein. Patientenserum mit zuvor nachgewiesenen IgE gegen α -Gal weist auch in unserem Versuch eine positive Bindungsreaktion auf den Giften der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia* und der *Naja haje* auf, wie in den verschiedenen Immunoblots gezeigt werden konnte. Hierbei erschienen beim Auftragen der Gifte im Gel und der elektrophoretischen Auftrennung immer wieder idente Bandenmuster als Nachweis einer positiven Bindungsreaktion den anti- α -Gal-IgE- Antikörpers. Diese decken sich mit unseren zuvor durchgeführten Immunoblots der monoklonalen Antikörpern gegen α -Gal (M86).

In der Patientenpoolserumprobe werden sich zwangsläufig weitere spezifische Bindungseigenschaften finden welche durch z.B. Bindungsreaktionen der IgEs an CCD Epitopen zu unspezifischen Ergebnissen führen können. Durch Inhibition mit TG (und somit der „Besetzung“ der α -Gal-Bindungsstellen) und weiteren Verdünnungsstufen im kompetitiven ELISA bestätigen die Spezifität der IgE-Antikörper und es kann gezeigt werden, dass die Reaktivität tatsächlich auf α -Gal zurückzuführen ist. Es wurden außerdem ImmunoCAP-Inhibitionstests durchgeführt, um festzustellen, ob Proteine der Schlangengifte die Bindung von α -Gal an IgEs von α -Gal-sensibilisierten Personen mit α -Gal-Syndrom blockieren können. Aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen in den Schlangengiften erfolgte eine Fraktionierung sämtlicher Gifte und die Wiederholung der ELISAs sowie der Massenspektromanalyse um eventuell überladene α -Gal haltige Proteine in zuvor negativ getesteten Giften zu überprüfen. Speziell im MALDI-TOF konnten dadurch in der Ausstanzung der Proteine bei feinerer Auftrennung genauere Ergebnisse ermitteln werden.

4.3. Ausblick

Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass sich in Giften der Elapidae das hochimmunogene α -Gal Epitop auf Proteinen nachweisen lässt. Diese Erkenntnisse untermauern Margie Profet's Toxinhypothese, in der durch den protektiven Aspekt bestimmter Allergene gegenüber schädlicher Substanzen ein selektiver evolutionsbiologischer Vorteil durch allergische Reaktionen und damit einhergehender erhöhter Resistenz des Organismus gegenüber dieser Substanzen bestehen müsste. Der Effekt wird durch die allergene Wirkung von α -Gal hervorgerufen, welche durch Sensibilisierung, wie beispielsweise durch einen Zeckenbiss, und die dadurch induzierte Immunantwort die Überlebenswahrscheinlichkeit nach einem sonst tödlich verlaufenen Schlangenbiss im Organismus erhöht. Mit Bekräftigung dieser Hypothese stellt sich zukünftig die Frage nach dem Potential von α -Gal als natürliches Antidot.

In meinen Vorarbeiten konnte ich zeigen, dass α -Gal auf Proteinen der *Naja*'s und der *Notechis scutatus* vorhanden ist. In Folgeprojekten wäre es nun sinnvoll, den Effekt von α -Gal haltigen Schlangengiften auf menschliche Mastzellen zu untersuchen.

Für weitere Untersuchungen der Reaktionen auf zellulärer Ebene wäre ein Basophilenaktivierungstest (BAT) hilfreich. Hierbei werden als zelluläre Komponente anstatt Mastzellen basophile Granulozyten untersucht. Als in-vitro Test geht hierbei keine Gefährdung für die Patienten aus und die Zellgewinnung erfolgt unproblematisch aus abgenommenem peripherem Patientenblut. Aus meinen Vorarbeiten resultiert auch, dass in den im ImmunoCAP getesteten *Naja*-Giften eine relevante proteolytische Aktivität auf getestete IgE ausbleibt, wobei sich auch hier eine Eignung für nachfolgende Versuche mittels BAT zeigt. Ein derartiger Versuchsaufbau sollte mit verschiedenen Gfitkonzentrationen erfolgen. Aus Arbeiten in Verbindung mit α -Gal und BAT ist bekannt, dass es zu einer unterschiedliche Aktivierbarkeit zwischen α -Gal-sensibilisierten und Patienten mit α -Gal Syndrom kommen kann (Mehlich et al., 2019). Hierbei sollten auch mögliche kostimulierende Faktoren und Effekte für die Reaktionen im BAT berücksichtigt werden. Da in Mitteleuropa Schlangenbisse eine Rarität sind, könnte man überlegen, Zeckenstiche als kostimulierenden Faktor im Protokoll zu integrieren.

Ein Umdenken hinsichtlich allergischer Sensibilisierungsreaktionen mit verschiedenen stimulierenden und Co-stimulierenden Faktoren sowie protektiver IgE-Bildung ist unumgänglich, zumal ein grundlegendes Verständnis für die immunogenen Prozesse ausgebaut werden muss um allergische Reaktionen besser zu verstehen und behandeln zu können. Die schnelle Expression von Anti- α -Gal-IgE-Antikörpern kann einen möglichen Vorteil haben, aber die entscheidende Reaktion ist maßgeblich von Reaktionen weiterer Störfaktoren mit Kostimulation abhängig, die entscheiden kann, ob auf Signal reagiert wird oder nicht (anerg). Ein Ansatz für zukünftige Forschungsarbeiten würde sich vor allem auf zellulärer Ebene bewegen, um diesen zelluläre

Effekten weiter auf den Grund zu gehen. Erst dann zeigt sich auch, ob sich α -Gal als natürliches Antidot eignen könnte.

Neben den weiteren zellulären Effekten sollte auch der Unterschied zwischen dem α -Gal-Vorkommen in Elapidae und Viperidae näher untersucht werden. Welche weiteren Proteine hinzugezählt werden könnten, ob diese Expression nur in Spezies der Elapidae stattfindet und ob verschiedene Umweltfaktoren eine Rolle spielen, gilt es in zukünftigen Studien herauszufinden. Das schnelle Erkennen pathogener α -Gal-exprimierender Erreger wie Viren (Takeuchi et al., 1996, Galili et al., 1996, Repik et al., 1994, Welsh et al., 1998), Bakterien (Han et al., 2012) und Protozoen (Almeida et al., 1994), und nun auch Schlangengifte ist analog zu Profet's Toxinhypothese als weiterer Vorteil der anti- α -Gal-Antikörperbildung zu untersuchen.

Hierzu ist die Frage zu beantworten, ob α -Gal nur in Sekreten als im Gift vorkommt oder auch in anderem Gewebe, beispielsweise von Muskel oder Organen, was uns vor die Herausforderung stellt, Nativgewebe von Schlangen zu untersuchen (Fischer et al., 2017).

In diesem Kontext verdeutlicht sich auch, dass eine „Red Meat Allergy“ im Rahmen des α -Gal-Syndroms eine Vereinfachung darstellt und man sich bewusst sein muss, dass α -Gal im Tierreich potentiell ubiquitär (mit Ausnahme bei Menschen und höheren Primaten) vorkommen kann. In der zeitgemäßen Allergologie ist „Neofood“ in diesem Kontext ein bedeutsamer Aufgabebereich, welches nicht nur medizinisch sondern auch behördlich ein neues Format darstellt. Es ist nicht auszuschließen, dass mit der Nutzung weiterer tierischer Proteinquellen über Spinnentiere, Amphibien oder Reptilien weitere α -Gal-haltige Allergenquellen in die menschliche Nahrungskette gelangen, welche zu teils schwerwiegenden allergischen Reaktionen führen können.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit ist es, α -Gal als Epitop auf Giften verschiedener Schlangengiftspezies nachzuweisen, um zu überprüfen, ob α -Gal ein relevantes Epitop im Bereich der Toxine ist und im Rahmen einer Toxineliminierung eine Rolle spielen könnte. Grundlegenden Baustein bildet die Toxinhypothese nach Margaret Profet, welche besagt, dass durch den protektiven Aspekt bestimmter Allergene gegenüber schädlicher Substanzen ein selektiver evolutionsbiologischer Vorteil durch allergische Reaktionen und damit einhergehender erhöhter Resistenz des Organismus gegenüber dieser Substanzen bestehen müsste. Das Disaccharid α -Gal bietet sich als ein für den menschlichen Organismus immunogenes Epitop, welches auf vielen Proteinen im Tierreich vorkommt, für diesen Versuchsaufbau optimal an. Grund für das immunogene Potential ist unter anderem das Immunglobulin Anti-Gal, der häufigste natürlich vorkommende Antikörper des Menschen. Das durch IgE-Antikörper gegen α -Gal ausgelöste komplexe Krankheitsbild wird auch als α -Gal-Syndrom bezeichnet und erregt aktuell u.a. als Rotfleischallergie Aufmerksamkeit. Eine Sensibilisierung kann durch Zeckenbisse und weitere Arthropodenvektoren erfolgen. Nachdem in Vorversuchen bereits toxische Effekte von Schlangengift auf Blutzellen und Immunglobuline untersucht wurden und bereits α -Gal auf Giftkomponenten beschrieben wurde, fehlt weiterhin ein allergologischer Blickwinkel diesbezüglich und soll im Rahmen dieses Projektes ausgearbeitet werden.

Methoden: Der Nachweis des α -Gal-Epitops auf Proteinen von Schlangengiften wurde mittels Blotting im WesternBlot erbracht. Die Identifizierung der α -Gal tragenden Proteinen erfolgte durch Massenspektrometrie im MALDI-TOF. Eine Reaktion von Patienten auf diese Gifte wurde durch Präparative Gele mit verschiedenen Serumproben und Poolserum von α -Gal-sensibilisierten Patienten untersucht. Bessere quantitative und sensitivere Aussagen zum α -Gal-Gehalt in unseren Proben erreichten wir im ImmunoCAP als bereits

etablierte Form einer Art Festphasen-ELISA's. Zur Verifizierung der ImmunoCAP wurde ein eigener ELISA entworfen, dessen Signalverstärkung sich nach Fraktionierung der Gifte verdreifachte. Zum Spezifitätsnachweis folgten Inhibitions-ELISA's nach dem selbst entwickelten ELISA- Modell, um zu überprüfen, ob die Reaktivität tatsächlich auf α -Gal zurückzuführen ist.

Ergebnisse: Das α -Gal Epitop konnte in Giften der *Naja mossambica*, *Naja kaouthia*, *Naja haje* und nach Fraktionierung auch im Gift der *Notechis scutatus* nachgewiesen werden. Zu den identifizierten Proteinen gehören Aminooxidasen, Metalloproteinasen, Ektonukleotide, Nukleotidasen, der Cobra Venom Faktor und kleinere Proteine wie das karzinoembryonale Zelladhäsionsmolekül, das schwangerschaftsspezifische beta-1-Glykoprotein 5 und Endonukleasen. Eine spezifische Bindungsreaktivität konnte verifiziert auf α -Gal zurückgeführt werden. Die positiv getesteten Arten gehören ausschließlich der Familie der Elapidae an, Angehörige der Viperidae weisen in unserem Versuch keine α -Gal exprimierenden Proteine auf. Der Nachweis erfolgt unabhängig von der geographischen Verbreitung der positiv getesteten Schlangenarten.

Schlussfolgerung: Unter dem allergologischen Blickwinkel untermauert der Nachweis des α -Gal-Epitops auf Schlangengiften die Toxinhypothese. Das schnelle Erkennen pathogener α -Gal-exprimierender Erreger wie Viren, Bakterien, Protozoen oder auch von Giften ist ein evolutiv ausgebildeter Vorteil der anti- α -Gal-Antikörperbildung. Eine entscheidende Reaktion und die Differenzierung einer gewünschten oder überschießenden Immunreaktion ist maßgeblich von weiteren Kofaktoren abhängig, die bestimmen, ob und wann auf ein Signal reagiert wird. Ein Ansatz für zukünftige Forschungsarbeiten würde sich vor allem auf zellulärer Ebene bewegen, um diesen Effekten weiter auf den Grund zu gehen. Erst dann zeigt sich auch, ob sich α -Gal als natürliches Antidot eignen könnte.

Literaturverzeichnis

- ALMEIDA, I. C., FERGUSON, M. A., SCHENKMAN, S. & TRAVASSOS, L. R. 1994. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*, 304 (Pt 3), 793-802.
- AMOAH, A. S., OBENG, B. B., LARBI, I. A., VERSTEEG, S. A., ARYEETEEY, Y., AKKERDAAS, J. H., ZUIDMEER, L., LIDHOLM, J., FERNANDEZ-RIVAS, M., HARTGERS, F. C., BOAKYE, D. A., VAN REE, R. & YAZDANBAKHSI, M. 2013. Peanut-specific IgE antibodies in asymptomatic Ghanaian children possibly caused by carbohydrate determinant cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 639-647.
- ARAUJO, R. N., FRANCO, P. F., RODRIGUES, H., SANTOS, L. C. B., MCKAY, C. S., SANHUEZA, C. A., BRITO, C. R. N., AZEVEDO, M. A., VENUTO, A. P., COWAN, P. J., ALMEIDA, I. C., FINN, M. G. & MARQUES, A. F. 2016. *Amblyomma sculptum* tick saliva: alpha-Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. *Int J Parasitol*, 46, 213-220.
- CAPONETTO, P., FISCHER, J. & BIEDERMANN, T. 2013. Gelatin-containing sweets can elicit anaphylaxis in a patient with sensitization to galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 1, 302-3.
- CHAKRAPANI, N., FISCHER, J., SWIONTEK, K., CODREANU-MOREL, F., HANNACHI, F., MORISSET, M., MUGEMANA, C., BULAEV, D., BLANK, S., BINDSLEV-JENSEN, C., BIEDERMANN, T., OLLERT, M. & HILGER, C. 2022. alpha-Gal present on both glycolipids and glycoproteins contributes to immune response in meat-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 150, 396-405 e11.
- CHINUKI, Y., ISHIWATA, K., YAMAJI, K., TAKAHASHI, H. & MORITA, E. 2016. *Haemaphysalis longicornis* tick bites are a possible cause of red meat allergy in Japan. *Allergy*, 71, 421-5.
- CHIPPAUX, J. P. 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 38.
- CHIPPAUX, J. P., MASSOUGBODJI, A. & HABIB, A. G. 2019. The WHO strategy for prevention and control of snakebite envenoming: a sub-Saharan Africa plan. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 25, e20190083.
- CHUNG, C. H., MIRAKHUR, B., CHAN, E., LE, Q. T., BERLIN, J., MORSE, M., MURPHY, B. A., SATINOVER, S. M., HOSEN, J., MAURO, D., SLEBOS,

- R. J., ZHOU, Q., GOLD, D., HATLEY, T., HICKLIN, D. J. & PLATTS-MILLS, T. A. 2008. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med*, 358, 1109-17.
- COMMINS, S. P., JAMES, H. R., KELLY, L. A., POCHAN, S. L., WORKMAN, L. J., PERZANOWSKI, M. S., KOCAN, K. M., FAHY, J. V., NGANGA, L. W., RONMARK, E., COOPER, P. J. & PLATTS-MILLS, T. A. 2011. The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 1286-93 e6.
- COMMINS, S. P., SATINOVER, S. M., HOSEN, J., MOZENA, J., BORISH, L., LEWIS, B. D., WOODFOLK, J. A. & PLATTS-MILLS, T. A. 2009. Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 426-33.
- CRISPELL, G., COMMINS, S. P., ARCHER-HARTMAN, S. A., CHOUDHARY, S., DHARMARAJAN, G., AZADI, P. & KARIM, S. 2019. Discovery of Alpha-Gal-Containing Antigens in North American Tick Species Believed to Induce Red Meat Allergy. *Front Immunol*, 10, 1056.
- DASCHNER, A. & GONZALEZ FERNANDEZ, J. 2020. Allergy in an Evolutionary Framework. *J Mol Evol*, 88, 66-76.
- FERREIRA, B. R. & SILVA, J. S. 1999. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology*, 96, 434-9.
- FISCHER, J. & BIEDERMANN, T. 2016. Delayed immediate-type hypersensitivity to red meat and innards: current insights into a novel disease entity. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14, 38-44.
- FISCHER, J. & HILGER, C. 2017. Alpha-Gal Syndrome: Clinical Presentation, New Concepts, and Unmet Needs. *Current Treatment Options in Allergy*, 4, 303-311.
- FISCHER, J., LUPBERGER, E., HEBSAKER, J., BLUMENSTOCK, G., AICHINGER, E., YAZDI, A. S., REICK, D., OEHME, R. & BIEDERMANN, T. 2017. Prevalence of type I sensitization to alpha-gal in forest service employees and hunters. *Allergy*, 72, 1540-1547.
- GALILI, U. 1993. Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha-galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Semin Immunopathol*, 15, 155-71.
- GALILI, U. 2013. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *Immunology*, 140, 1-11.
- GALILI, U. 2023a. Antibody production and tolerance to the alpha-gal epitope as models for understanding and preventing the immune response to

- incompatible ABO carbohydrate antigens and for alpha-gal therapies. *Front Mol Biosci*, 10, 1209974.
- GALILI, U. 2023b. Paleo-immunology of human anti-carbohydrate antibodies preventing primate extinctions. *Immunology*, 168, 18-29.
- GALILI, U., ANARAKI, F., THALL, A., HILL-BLACK, C. & RADIC, M. 1993. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood*, 82, 2485-93.
- GALILI, U., CLARK, M. R., SHOHET, S. B., BUEHLER, J. & MACHER, B. A. 1987. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 1369-73.
- GALILI, U., MANDRELL, R. E., HAMADEH, R. M., SHOHET, S. B. & GRIFFISS, J. M. 1988a. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun*, 56, 1730-7.
- GALILI, U., RACHMILEWITZ, E. A., PELEG, A. & FLECHNER, I. 1984. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med*, 160, 1519-31.
- GALILI, U., REPIK, P. M., ANARAKI, F., MOZDZANOWSKA, K., WASHKO, G. & GERHARD, W. 1996. Enhancement of antigen presentation of influenza virus hemagglutinin by the natural human anti-Gal antibody. *Vaccine*, 14, 321-8.
- GALILI, U., SHOHET, S. B., KOBRIN, E., STULTS, C. L. & MACHER, B. A. 1988b. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem*, 263, 17755-62.
- GALILI, U. & SWANSON, K. 1991. Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7401-4.
- GALLI, S. J., METZ, M., STARKL, P., MARICHAL, T. & TSAI, M. 2020. Mast cells and IgE in defense against lethality of venoms: Possible "benefit" of allergy[]. *Allergo J Int*, 29, 46-62.
- GALLI, S. J., STARKL, P., MARICHAL, T. & TSAI, M. 2016. Mast cells and IgE in defense against venoms: Possible "good side" of allergy? *Allergol Int*, 65, 3-15.
- GOWDA, D. C., GLUSHKA, J., HALBEEK, H., THOTAKURA, R. N., BREDEHORST, R. & VOGEL, C. W. 2001. N-linked oligosaccharides of cobra venom factor contain novel alpha(1-3)galactosylated Le(x) structures. *Glycobiology*, 11, 195-208.

- GOWDA DC, P. E., RAJ TT, BREDEHORST R, VOGEL CW. 1994. Immunoreactivity and function of oligosaccharides in cobra venom factor. *J Immunol.*, 152, 2977-86.
- GOWDA, D. C., PETRELLA, E. C., RAJ, T. T., BREDEHORST, R. & VOGEL, C. W. 1994. Immunoreactivity and function of oligosaccharides in cobra venom factor. *J Immunol*, 152, 2977-86.
- GOWDA, D. C., SCHULTZ, M., BREDEHORST, R. & VOGEL, C. W. 1992. Structure of the major oligosaccharide of cobra venom factor. *Mol Immunol*, 29, 335-42.
- GRONLUND, H., ADEDOYIN, J., COMMINS, S. P., PLATTS-MILLS, T. A. & VAN HAGE, M. 2009. The carbohydrate galactose- α -1,3-galactose is a major IgE-binding epitope on cat IgA. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1189-91.
- GUTIERREZ, J. M., CALVETE, J. J., HABIB, A. G., HARRISON, R. A., WILLIAMS, D. J. & WARRELL, D. A. 2017. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17079.
- GUTIERREZ, J. M., LOMONTE, B., LEON, G., ALAPE-GIRON, A., FLORES-DIAZ, M., SANZ, L., ANGULO, Y. & CALVETE, J. J. 2009. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics*, 72, 165-82.
- HAMMAD, H., DEBEUF, N., AEGERTER, H., BROWN, A. S. & LAMBRECHT, B. N. 2022. Emerging Paradigms in Type 2 Immunity. *Annu Rev Immunol*, 40, 443-467.
- HAMSTEN, C., STARKHAMMAR, M., TRAN, T. A., JOHANSSON, M., BENGTSSON, U., AHLEN, G., SALLBERG, M., GRONLUND, H. & VAN HAGE, M. 2013a. Identification of galactose- α -1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick *Ixodes ricinus*; possible relationship with red meat allergy. *Allergy*, 68, 549-52.
- HAMSTEN, C., TRAN, T. A. T., STARKHAMMAR, M., BRAUNER, A., COMMINS, S. P., PLATTS-MILLS, T. A. E. & VAN HAGE, M. 2013b. Red meat allergy in Sweden: association with tick sensitization and B-negative blood groups. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 1431-1434.
- HAN, W., CAI, L., WU, B., LI, L., XIAO, Z., CHENG, J. & WANG, P. G. 2012. The wciN gene encodes an α -1,3-galactosyltransferase involved in the biosynthesis of the capsule repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Biochemistry*, 51, 5804-10.
- HILGER, C., FISCHER, J., SWIONTEK, K., HENTGES, F., LEHNERS, C., EBERLEIN, B., MORISSET, M., BIEDERMANN, T. & OLLERT, M. 2016.

- Two galactose- α -1,3-galactose carrying peptidases from pork kidney mediate anaphylactogenic responses in delayed meat allergy. *Allergy*, 71, 711-9.
- HILGER, C., FISCHER, J., WOLBING, F. & BIEDERMANN, T. 2019. Role and Mechanism of Galactose- α -1,3-Galactose in the Elicitation of Delayed Anaphylactic Reactions to Red Meat. *Curr Allergy Asthma Rep*, 19, 3.
- HIU, J. J. & YAP, M. K. K. 2020. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochem Soc Trans*, 48, 719-731.
- HUANG, H. W., LIU, B. S., CHIEN, K. Y., CHIANG, L. C., HUANG, S. Y., SUNG, W. C. & WU, W. G. 2015. Cobra venom proteome and glycome determined from individual snakes of *Naja atra* reveal medically important dynamic range and systematic geographic variation. *J Proteomics*, 128, 92-104.
- KASIMIR, M. T., RIEDER, E., SEEBACHER, G., WOLNER, E., WEIGEL, G. & SIMON, P. 2005. Presence and elimination of the xenoantigen gal (α 1, 3) gal in tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng*, 11, 1274-80.
- KONAKCI, K. Z., BOHLE, B., BLUMER, R., HOETZENECKER, W., ROTH, G., MOSER, B., BOLTZ-NITULESCU, G., GORLITZER, M., KLEPETKO, W., WOLNER, E. & ANKERSMIT, H. J. 2005. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest*, 35, 17-23.
- KOUNIS, N. G. & SOUFRAS, G. D. 2014. Coronary stent thrombosis: beware of an allergic reaction and of Kounis syndrome. *Indian Heart J*, 66, 153-5.
- LEON, G., HERRERA, M., SEGURA, A., VILLALTA, M., VARGAS, M. & GUTIERREZ, J. M. 2013. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*, 76, 63-76.
- MAIZELS, R. & YAZDANBAKHS, M. 2008. T-cell regulation in helminth parasite infections: implications for inflammatory diseases. *Chem Immunol Allergy*, 94, 112-123.
- MARICHAL, T., STARKL, P., REBER, L. L., KALESNIKOFF, J., OETTGEN, H. C., TSAI, M., METZ, M. & GALLI, S. J. 2013. A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity*, 39, 963-75.
- MATZINGER, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296, 301-5.

- MEHLICH, J., FISCHER, J., HILGER, C., SWIONTEK, K., MORISSET, M., CODREANU-MOREL, F., SCHIENER, M., BLANK, S., OLLERT, M., DARSOW, U., BIEDERMANN, T. & EBERLEIN, B. 2019. The basophil activation test differentiates between patients with alpha-gal syndrome and asymptomatic alpha-gal sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 143, 182-189.
- METZ, M., PILIPONSKY, A. M., CHEN, C. C., LAMMEL, V., ABRINK, M., PEJLER, G., TSAI, M. & GALLI, S. J. 2006. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, 313, 526-30.
- MITTENDORF, A. F. & WINSKOG, C. 2024. Anaphylaxis as probable cause of death in a rare case of fatal *Vipera berus* bite. *Forensic Sci Med Pathol*.
- MORISSET, M., RICHARD, C., ASTIER, C., JACQUENET, S., CROIZIER, A., BEAUDOUIN, E., CORDEBAR, V., MOREL-CODREANU, F., PETIT, N., MONERET-VAUTRIN, D. A. & KANNY, G. 2012. Anaphylaxis to pork kidney is related to IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *Allergy*, 67, 699-704.
- MOZZICATO, S. M., TRIPATHI, A., POSTHUMUS, J. B., PLATTS-MILLS, T. A. E. & COMMINS, S. P. 2014. Porcine or bovine valve replacement in 3 patients with IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2, 637-638.
- MULLINS, R. J., JAMES, H., PLATTS-MILLS, T. A. & COMMINS, S. 2012. Relationship between red meat allergy and sensitization to gelatin and galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 1334-1342 e1.
- NKURUNUNGI, G., MPAIRWE, H., VERSTEEG, S. A., VAN DIEPEN, A., NASSUUNA, J., KABAGENYI, J., NAMBUYA, I., SANYA, R. E., NAMPIJJA, M., SERNA, S., REICHARDT, N. C., HOKKE, C. H., WEBB, E. L., VAN REE, R., YAZDANBAKHSH, M. & ELLIOTT, A. M. 2021. Cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE obscures true atopy and exhibits α -1,3-fucose epitope-specific inverse associations with asthma. *Allergy*, 76, 233-246.
- O'NEIL, B. H., ALLEN, R., SPIGEL, D. R., STINCHCOMBE, T. E., MOORE, D. T., BERLIN, J. D. & GOLDBERG, R. M. 2007. High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina and the association with atopic history. *J Clin Oncol*, 25, 3644-8.
- OLIVEIRA, A. L., VIEGAS, M. F., DA SILVA, S. L., SOARES, A. M., RAMOS, M. J. & FERNANDES, P. A. 2022. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat Rev Chem*, 6, 451-469.
- PALM, N. W., ROSENSTEIN, R. K. & MEDZHITOV, R. 2012. Allergic host defences. *Nature*, 484, 465-72.

- PALM, N. W., ROSENSTEIN, R. K., YU, S., SCHENTEN, D. D., FLORSHEIM, E. & MEDZHITOV, R. 2013. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity*, 39, 976-85.
- PRESCOTT, R. A. & POTTER, P. C. 2005. Hypersensitivity to airborne spitting cobra snake venom. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 94, 600-3.
- PROFET, M. 1991. The function of allergy: immunological defense against toxins. *Q Rev Biol*, 66, 23-62.
- QIAN, J., LIU, T., YANG, L., DAUS, A., CROWLEY, R. & ZHOU, Q. 2007. Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem*, 364, 8-18.
- REIMERS, A. R., WEBER, M. & MULLER, U. R. 2000. Are anaphylactic reactions to snake bites immunoglobulin E-mediated? *Clin Exp Allergy*, 30, 276-82.
- REPIK, P. M., STRIZKI, J. M. & GALILI, U. 1994. Differential host-dependent expression of alpha-galactosyl epitopes on viral glycoproteins: a study of eastern equine encephalitis virus as a model. *J Gen Virol*, 75 (Pt 5), 1177-81.
- RISPENS, T., DERKSEN, N. I., COMMINS, S. P., PLATTS-MILLS, T. A. & AALBERSE, R. C. 2013. IgE production to alpha-gal is accompanied by elevated levels of specific IgG1 antibodies and low amounts of IgE to blood group B. *PLoS One*, 8, e55566.
- RUEFF, F., BAUER, A., BECKER, S., BREHLER, R., BROCKOW, K., CHAKER, A. M., DARSOW, U., FISCHER, J., FUCHS, T., GERSTLAUER, M., GERNERT, S., HAMELMANN, E., HOTZENECKER, W., KLIMEK, L., LANGE, L., MERK, H., MULLENEISEN, N. K., NEUSTADTER, I., PFUTZNER, W., SIEBER, W., SITTER, H., SKUDLIK, C., TREUDLER, R., WEDI, B., WOHL, S., WORM, M. & JAKOB, T. 2023. Diagnosis and treatment of Hymenoptera venom allergy: S2k Guideline of the German Society of Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) in collaboration with the Arbeitsgemeinschaft für Berufs- und Umweltdermatologie e.V. (ABD), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNOKC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), German Respiratory Society (DGP), and the Austrian Society for Allergy and Immunology (OGAI). *Allergol Select*, 7, 154-190.

- SCHMUTZ, J. & STAHEL, E. 1985. Anaphylactoid reactions to snakebite. *Lancet*, 2, 1306.
- SMITS, H. H., EVERTS, B., HARTGERS, F. C. & YAZDANBAKHS, M. 2010. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep*, 10, 3-12.
- SPIRO, R. G. & BHOYROO, V. D. 1984. Occurrence of alpha-D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units. *J Biol Chem*, 259, 9858-66.
- STARKL, P., GAUDENZIO, N., MARICHAL, T., REBER, L. L., SIBILANO, R., WATZENBOECK, M. L., FONTAINE, F., MUELLER, A. C., TSAI, M., KNAPP, S. & GALLI, S. J. 2022. IgE antibodies increase honeybee venom responsiveness and detoxification efficiency of mast cells. *Allergy*, 77, 499-512.
- STARKL, P., MARICHAL, T., GAUDENZIO, N., REBER, L. L., SIBILANO, R., TSAI, M. & GALLI, S. J. 2016. IgE antibodies, FcεR1α, and IgE-mediated local anaphylaxis can limit snake venom toxicity. *J Allergy Clin Immunol*, 137, 246-257 e11.
- STEINKE, J. W., PLATTS-MILLS, T. A. & COMMINS, S. P. 2015. The alpha-gal story: lessons learned from connecting the dots. *J Allergy Clin Immunol*, 135, 589-96; quiz 597.
- STONE, C. A., JR., COMMINS, S. P., CHOUDHARY, S., VETHODY, C., HEAVRIN, J. L., WINGERTER, J., HEMLER, J. A., BABE, K., PHILLIPS, E. J. & NORTON, A. E. 2019. Anaphylaxis after vaccination in a pediatric patient: further implicating alpha-gal allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 7, 322-324 e2.
- STONE, C. A., JR., HEMLER, J. A., COMMINS, S. P., SCHUYLER, A. J., PHILLIPS, E. J., PEEBLES, R. S., JR. & FAHRENHOLZ, J. M. 2017. Anaphylaxis after zoster vaccine: Implicating alpha-gal allergy as a possible mechanism. *J Allergy Clin Immunol*, 139, 1710-1713 e2.
- STONE, S. F., ISBISTER, G. K., SHAHMY, S., MOHAMED, F., ABEYSINGHE, C., KARUNATHILAKE, H., ARIARATNAM, A., JACOBY-ALNER, T. E., COTTERELL, C. L. & BROWN, S. G. 2013. Immune response to snake envenoming and treatment with antivenom; complement activation, cytokine production and mast cell degranulation. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2326.
- TAKEUCHI, Y., PORTER, C. D., STRAHAN, K. M., PREECE, A. F., GUSTAFSSON, K., COSSET, F. L., WEISS, R. A. & COLLINS, M. K. 1996. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase. *Nature*, 379, 85-8.

- TAN, K. K., BAY, B. H. & GOPALAKRISHNAKONE, P. 2018. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon*, 144, 7-13.
- TASOULIS, T. & ISBISTER, G. K. 2017. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel)*, 9.
- TSAI, M., STARKL, P., MARICHAL, T. & GALLI, S. J. 2015. Testing the 'toxin hypothesis of allergy': mast cells, IgE, and innate and acquired immune responses to venoms. *Curr Opin Immunol*, 36, 80-7.
- VAN NUNEN, S. 2015. Tick-induced allergies: mammalian meat allergy, tick anaphylaxis and their significance. *Asia Pac Allergy*, 5, 3-16.
- VAN NUNEN, S. A., O'CONNOR, K. S., CLARKE, L. R., BOYLE, R. X. & FERNANDO, S. L. 2009. An association between tick bite reactions and red meat allergy in humans. *Med J Aust*, 190, 510-1.
- VIDAL, C., MENDEZ-BREA, P., LOPEZ-FREIRE, S. & GONZALEZ-VIDAL, T. 2016. Vaginal Capsules: An Unsuspected Probable Source of Exposure to alpha-Gal. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 26, 388-389.
- VOGEL, C. W., BREDEHORST, R., FRITZINGER, D. C., GRUNWALD, T., ZIEGELMULLER, P. & KOCK, M. A. 1996. Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Adv Exp Med Biol*, 391, 97-114.
- VOGEL, C. W. & FRITZINGER, D. C. 2010. Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon*, 56, 1198-222.
- WADEE, A. A. & RABSON, A. R. 1987. Development of specific IgE antibodies after repeated exposure to snake venom. *J Allergy Clin Immunol*, 80, 695-8.
- WARRELL, D. A. 2010. Snake bite. *Lancet*, 375, 77-88.
- WEINSTEIN, S. A., VIDAL, N. & MIRALLES, A. 2022. A bite by the emerald snake, *Hapsidophrys smaragdinus* Schlegel, 1837 (Colubridae, Colubrinae) causing atopic eczema with comments on the formal documentation of non-front-fanged snakebites. *Toxicon*, 217, 41-45.
- WELSH, R. M., O'DONNELL, C. L., REED, D. J. & ROTHER, R. P. 1998. Evaluation of the Galalpha1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses. *J Virol*, 72, 4650-6.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Blottingschema des Immunoblots mit verschiedenen Schlangengiften	27
Abb. 2: Präparierschema der Membranen für den Immunoblot mit 2 verschiedenen Antikörpern.....	28
Abb. 3: Präparationsschema des Präparativen Gels mit Gift der <i>Naja mossambica</i> und Patientenseren	30
Abb. 4: Schema der Gelpräparation für die MALDI-TOF Analyse	32
Abb. 5: Pipettierschema der Poolserumverdünnungen auf der ELISA-Platte (mit <i>Naja kaouthia</i> ge-coated)	34
Abb. 6: Pipettierschema für die ImmunoCAP-Verdünnungsreihen.....	36
Abb. 7: Blue Stain Ergebnisse: Auftrennung der Proteine der verschiedenen Schlangengifte; ein Großteil der Giftkomponenten der Elapidae besteht aus Proteinen mit kleiner Molekülmasse; Vip – Viperidae, Ela – Elapidae, M – Marker mit Molekülmassenangaben in kDa (Kilodalton)	39
Abb. 8: Immunoblot mit Schlangengiften der Familien der Viperidae (Vip) und Elapidae (Ela); Als detektierender anti- α Gal Antikörper wurde M86 verwendet	40
Abb. 9: Immunoblot mit Schlangengiften: Negativkontrolle zur Untersuchung des anti- α -Gal Antikörpers M86.....	41
Abb. 10: Immunoblot mit Schlangengiften; als anti- α Gal Antikörper wurde MOA verwendet.....	42
Abb. 11: Immunoblot mit Schlangengiften; Negativkontrolle zur Untersuchung des anti- α -Gal Antikörpers MOA.....	43
Abb. 12: Immunoblot Gift Nr. 7 - <i>Naja mossambica</i> ; Auftrennung der Proteine Im Schlangengift ohne (pur) und mit (M86) detektierendem α -Gal- Antikörper	45
Abb. 13: Immunoblot Gift Nr. 8 - <i>Naja kaouthia</i> ; Auftrennung der Proteine Im Schlangengift ohne (pur) und mit (M86) detektierendem α -Gal- Antikörper	46
Abb. 14: Immunoblot Gift Nr. 10 - <i>Naja haje</i> ; Auftrennung der Proteine Im Schlangengift ohne (pur) und mit (M86) detektierendem α -Gal- Antikörper	47
Abb. 15: : SYPRO RUBY Stain 25.03.2019.....	48
Abb. 16: SYPRO RUBY Stain - TYPHOON Scan des Gels nach dem Ausstanzen.....	49
Abb. 17: SYPRO RUBY Stain - TYPHOON Scan des Gels nach dem Picking, verschiedene Giftfraktionen (7.1-7.3 <i>Naja mossambica</i> , 8.1-8.3 <i>Naja kaouthia</i> , 10.1-10.3 <i>Naja haje</i>).....	50
Abb. 18: Durch Massenspektrometrie identifizierte α -Gal exprimierende Proteine in Giften der <i>Naja mossambica</i> , <i>Naja kaouthia</i> und <i>Naja haje</i> (MALDI-TOF Versuch Nr. 1, 04/2019)	52
Abb. 19: Durch Massenspektrometrie identifizierte α -Gal exprimierende Proteine in Giftfraktionen der <i>Naja mossambica</i> , <i>Naja kaouthia</i> und <i>Naja haje</i> (MALDI-TOF Versuch Nr. 2, 02/2021).....	54
Abb. 20: Preparatives Gel mit Gift der <i>Naja mossambica</i> und Patientenseren 1-16; 17 Negativkontrolle ohne Serum, 18 Negativkontrolle ohne α -Gal , 19 Positivkontrolle mit M86	56

Abb. 21: Immunoblot zur Detektion α -Gal tragender Proteine in Schlangengiftproben 1-10 und Poolseruminkubation	57
Abb. 22: Immunoblot zur Detektion α -Gal tragender Proteine in Schlangengiften 1-10 und Poolseruminkubation, Negativkontrolle	58
Abb. 23: Darstellung des gesamt- IgEs (IgE) und der Trypsasen im Serum-Schlangengiftgemisch und des proteolytischen Abbaus durch die Gifte im ImmunoCAP	59
Abb. 24: Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit IgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der <i>Naja mossambica</i> , als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.....	61
Abb. 25: Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit IgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der <i>Naja kaouthia</i> , als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.....	62
Abbildung 26: Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit IgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der <i>Notechis scutatus</i> , als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.	63
Abb. 27: Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit IgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift der <i>Naja haje</i> , als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.	64
Abb. 28: Zusammenfassung der Durchläufe des Thyreoglobulin-ImmunoCAP (o125) mit gepooltem Serum ausgewählter europäischer Patienten mit IgE gegen α -Gal durch Zugabe von reinem Schlangengift en der Familien der Viperidae; als Kontrolle wurde Bovines Thyreoglobulin verwendet.	66
Abb. 29: ELISA mit unfraktionierter Giftprobe der <i>Naja kaouthia</i>	67
Abb. 30: ELISAs der Fraktionen 7.1-3 der <i>Naja mossambica</i>	68
Abb.31: ELISAs der Fraktionen 8.1-3 der <i>Naja kaouthia</i>	68
Abb. 32: ELISAs der Fraktionen 8.1-3 der <i>Naja haje</i>	69
Abb. 33: ELISAs der Fraktionen 9.1-3 der <i>Notechis scutatus</i>	69
Abb. 34: Grafische Darstellung aller Fraktionen und deren Inhibitionen:.....	70
Abb. 35: Inhibitions-ELISA des fraktionierten <i>Naja mossambica</i> -Gifts	71
Abb. 36: Inhibitions-ELISA des fraktionierten <i>Naja kaouthia</i> -Gifts.....	71
Abb. 37: Inhibitions-ELISA des fraktionierten <i>Naja haje</i> -Gifts.....	72
Abb. 38: Inhibitions-ELISA der Fraktionen 5.1 (<i>Bothrops asper</i>) und 9.1 (<i>Notechis scutatus</i>).....	72
Abb. 39: Vergleich der Optischen Dichte (OD) im ELISA von fraktionierten und unfraktionierten Giften der <i>Naja kaouthia</i>	73
Abb. 40: Schema der TH2-Induzierten Immunantwort nach Toxinexposition (Tsai et al., 2015); Dargestellt ist der erste Kontakt eines Säugetiers mit einem Schlangengift und die dadurch induzierte TH2-abhängige IgE-Produktion (spezifisch und unspezifisch), welche durch rasche Gifteliminierung durch Mastzellrekrutierung und Proteolyse zur erhöhten Restistenz gegenüber mindestens der bekannten Toxinkomponenten führt und dadurch einen Überlebensvorteil bietet.....	79

Abb. 41: Schematische Darstellung des α -Gal Syndroms (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Jörg Fischer) 85

Zu Abb. 18 und 19 :

Diese Abbildungen sind zur Veranschaulichung mit folgenden Bildern erstellt:

Naja mossambica:

https://de.wikipedia.org/wiki/Mosambik-Speikobra#/media/Datei:Mfezi_2352859459.jpg

„Dieses Bild, das ursprünglich auf Flickr veröffentlicht wurde, wurde am 29. Mai 2008, 01:09 von Dysmorodrepanis mit dem Flickr Upload-Bot auf Commons hochgeladen. An diesem Tag wurde bestätigt, dass es unter den Bedingungen der angegebenen Lizenz lizenziert ist.“

Beschreibung: Mozambique Spitting Cobra (Naja mossambica)

Dysmorodrepanis 01:09, 29 May 2008 (UTC)

Datum: 27 January 2008, 19:31:33

Quelle: originally posted to Flickr as Mfezi

Author: Chris Eason

Naja haje:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Egyptian_Cobra_Snake.jpg

„Dieses Bild ist unter Creative Commons CC0 veröffentlicht. Auf das Urheberrecht und verwandte oder benachbarte Rechte an diesem Bild wurde verzichtet. Es steht Ihnen frei, das Bild zu bearbeiten und für kommerzielle Zwecke zu verwenden, ohne den ursprünglichen Autor oder die Quelle zu nennen. Obwohl nicht erforderlich, wird ein Link zurück geschätzt“.

Link: [Egyptian cobra – Free To Use Images \(safari-travel-plus.com\)](http://safari-travel-plus.com)

Naja kaouthia:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Monokelcobra#/media/Datei:N.kaouthia.jpg>

„Dieses Bild wurde ursprünglich auf Flickr von th0mi unter <https://www.flickr.com/photos/13531471@N02/2143118875> veröffentlicht. Es wurde am 15. März 2012 von FlickrreviewR überprüft und es wurde bestätigt, dass es unter den Bedingungen der cc-by-2.0 lizenziert ist.“

Beschreibung: English: A Monocled cobra (Naja kaouthia).

Datum: 14 March 2012

Quelle: <https://www.flickr.com/photos/th0mi/2143118875/>
Author: Thomas Jaehnel

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Tabelle zur Berechnung der benötigten Giftvolumen für die Gelpreparation als Pipettierschema	25
Tab. 2: Ergebnisse der ermittelten Proteinkonzentrationen für 1 µl der verschiedenen Schlangengifte	38
Tab. 3: α-Gal exprimierende Proteine in Giften der <i>Naja mossambica</i> , <i>Naja kaouthia</i> und <i>Naja haje</i> (MALDI-TOF Versuch Nr. 1, 2019)	51
Tab. 4: α-Gal exprimierende Proteine in Giffractionen der <i>Naja mossambica</i> , <i>Naja kaouthia</i> und <i>Naja haje</i> (MALDI-TOF Versuch Nr. 2, 2021)	53

6 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Universitäts-Hautklinikum Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Jörg Fischer durchgeführt. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder wie Simon Riel und Kyra Swiontek von mir eigenständig durchgeführt. Die Fraktionierung der Gifte erfolgte im LIH (Luxembourg Institute of Health) durch Kyra Swiontek. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Innsbruck, den

7 Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Jörg danken, der das Interesse für das Thema geweckt und mich unterstützt hat. Ohne ihn hätte ich gar nicht erst die Möglichkeit gehabt, diese Versuchsreihe aufzubauen.

Ich möchte Kyra danken, die immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist, und mich immer wieder aus meinem „Das geht/funktioniert/kann ich nicht“-Loch herausmanövriert hat.

Simon ist ein weiteres wichtiges Teammitglied, der selbst nach meinen mittlerweile 5 Umzügen weiterhin immer Ansprechpartner und Bindeglied geblieben ist und dem ich über alle Maßen dankbar bin!

Und dann möchte ich speziell meiner Familie danken – Papa danke, dass du mich immer unterstützt! Mama danke, dass du Papa dabei unterstützt mich zu unterstützen! Und zu guter Letzt Bezi und Clara – mit euch diesen Erfolg zu teilen macht ihn erst wirklich wertvoll für mich!

Danke

Anhang