

Diss. ETH No. 19375

MECHANISMS OF ALLERGEN-SPECIFIC DESENSITIZATION

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

CHRISTINA UERMÖSI

Master of Science, University of Constance

Born December 24th, 1979

Citizen of Dietikon (ZH)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Annette Oxenius, examiner

Prof. Dr. Manfred Kopf, co-examiner

Dr. Martin F. Bachmann, co-examiner

2010

1 SUMMARY

Protective immunity is provided by the interplay between the innate and the adaptive arms of the immune systems. The innate as well as the adaptive immune response is regulated by specialized cells with the challenging task to eliminate pathogens while not damaging the host itself. Usually the immune system copes well with this charge, but is not always successful. Allergic reactions are representative for such a misregulated immune response: 1) adaptive immune responses are elicited towards harmless antigens such as animal dander or pollen resulting in immunoglobulin E (IgE) production, 2) cells of the innate system such as mast cells or basophils, which express the high affinity IgE receptor (FcεRI), bind these allergen-specific IgE antibodies. If allergen is encountered subsequently, FcεRI-bound IgEs are cross-linked, causing activation of mast cells and the release of vasoactive amines and cytokines. Furthermore, proinflammatory lipids, cytokines, and chemokines are produced and released, leading to an allergic inflammation. Although frequency of individuals suffering from allergies has increased exponentially over the last century, the only available therapy that stops disease progression is allergen-specific immunotherapy (SIT). Even though allergen-specific antibodies have been reported to play an important role in SIT, mechanisms of IgG-mediated inhibition of allergic reactions are not well defined.

The present studies aimed to provide better understanding of the mechanisms how allergen-specific IgG antibodies may modulate allergic responses. Therefore, we generated monoclonal antibodies (mAbs) that recognize three non-overlapping epitopes on the major cat allergen Feld1. Each of the three mAbs was produced as IgE or different IgG isotypes. We found that IgE antibodies against two non-overlapping epitopes on Feld1 were required and sufficient to sensitize mast cells for maximal activation upon exposure to monomeric Feld1. Furthermore, IgG antibodies recognizing a single epitope were able to block mast cell activation by IgE antibodies recognizing two different epitopes *in vitro* and *in vivo*. This inhibition required Fcγ receptor IIB (FcγRIIB) expression by mast cells. Humanized Feld1-specific IgGs of a single specificity were able to block degranulation of basophils from individuals with cat allergy. The inhibitory potential of these antibodies increased when larger allergen-IgG complexes were formed. Moreover, Feld1-specific IgG antibodies were able to cause massive internalization of FcεRI-bound IgE *in vitro* and *in vivo* within one hour. Despite IgE-internalization, little mast cell activation was observed. Unexpectedly, absence of FcγRIIB reduced IgE internalization but increased mast cell activation. Hence, FcγRIIB

promotes IgE internalization whilst inhibiting mast cell activation. Thus, allergen-specific IgG antibodies promote internalization of allergen-specific IgE in the absence of cellular activation due to the engagement of Fc γ RIIB.

In a second part of this thesis allergen-specific IgE B cell responses were characterized *in vivo* in an allergic asthma model where mice were sensitized intranasally with Feld1. Both, IgE and IgG1 Feld1-specific serum titers increased during sensitization. Antigen-specific antibody-forming cells (AFCs) secreting Feld1-specific IgEs and IgGs could be tracked in secondary lymphoid organs and bone marrow with highest numbers in the draining mediastinal lymph nodes. Induction of Feld1-positive germinal centres in the lymph nodes could be observed and up to 25% of all class switched IgG expressing B cells located in the mediastinal lymph node showed Feld1 specificity. However, class switched IgE-positive B cells were absent or below detection levels from secondary lymphoid organs of allergic mice, suggesting that allergen specific IgE B cell responses could differ in kinetics or location from IgG B cell response.

Taken together this thesis provides a better understanding of the mechanism of allergen-specific IgG-mediated protection in allergic responses and describes a novel mechanism of IgG-mediated mast cell desensitization: down-regulation of allergen-specific IgE.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Zum Schutz eines Organismus vor Pathogenen ist ein komplexes Zusammenspiel des angeborenen und adaptiven Immunsystems nötig. Sowohl angeborene wie adaptive Immunantworten werden durch spezialisierte Zellen vermittelt, welche die herausfordernde Aufgabe erfüllen müssen, Pathogene zu eliminieren, ohne den Wirtsorganismus selbst zu schädigen. Im Normalfall ist das Immunsystem dieser Aufgaben gewachsen. Bei Fehlregulierungen der Immunantwort kann dies zu unerwünschten Reaktionen führen. Allergische Reaktionen sind die Folge einer solchen fehlerhaften Immunantwort. In diesem Fall wird eine adaptive Immunantwort gegen harmlose Tierschuppen oder Pollen ausgelöst, welche die Produktion Immunoglobulin E (IgE) auslöst. Die gebildeten IgEs werden auf der Zelloberfläche von Mastzellen und Basophilen mittels FcεRI gebunden, ein Rezeptor, der mit hoher Affinität Allergen-spezifische IgE bindet. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen werden die vom FcεRI gebundenen IgE vernetzt, was zu einer Zellaktivierung führt. Durch die Aktivierung setzt die Mastzelle vasoaktive Amine und Zytokine frei. Des Weiteren wird die Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Lipiden, Zytokinen und Chemokinen induziert, welche eine allergische Entzündung auslösen. Obwohl die Anzahl allergischer Personen während des letzten Jahrhunderts exponentiell angestiegen ist, gibt es nur eine Behandlungsmethode, welche Krankheitsverlauf langfristig beeinflusst; die Allergen-spezifische Immuntherapie (SIT). Während der SIT werden Allergen-spezifische IgGs gebildet, deren schützende Wirkung gegen allergische Reaktionen beschrieben wurde. Der Mechanismus, wie Allergen-spezifische IgG Antikörper allergischen Reaktionen inhibieren können, ist jedoch nur unvollständig bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war ein erweitertes Verständnis für den Mechanismus zu erlangen, wie Allergen-spezifische IgG Antikörper allergischen Reaktionen inhibieren können. Für diesen Zweck haben wir drei monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt, welche drei nicht überlappende Epitope auf Feld1, dem Hauptallergen von Katzen, erkennen. Jeder der drei mAk wurde als Maus IgE, IgG1 und IgG2a hergestellt. Zwei verschiedene IgE Antikörper waren nötig um Mastzellen zu Sensibilisieren und maximale Allergen-vermittelte Aktivierung zu induzieren. Diese durch IgE vermittelte Aktivierung der Mastzellen konnte durch IgG Antikörper, welche das dritte nicht überlappende Feld1-Epitop erkannten, *in vitro* als auch *in vivo* inhibiert werden. Diese Inhibition war vom Fcγ Rezeptor IIB (FcγRIIB) abhängig, welcher von Mastzellen exprimiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass humanisierte, Feld1-spezifische IgG Antikörper, die Degranulation Basophiler, aus dem Blut

von Katzenallergikern gewonnen wurden, blockieren können. Der Einsatz aller drei Feld1-spezifischer IgG Antikörper verstärkte den inhibierenden Effekt. Dies könnte einerseits durch die Bildung grösserer Feld1-IgG Komplexe oder andererseits durch zusätzliche Neutralization des Allergens erklärt werden.

Zusätzlich zu der Inhibition der IgE vermittelten Mastzellaktivierung, vermittelten Feld1-spezifische IgG Antikörper innerhalb einer Stunde starke Internalisierung von FcεRI-gebundenem IgE. Trotz der starken Internalisierung von IgE konnte nur eine geringe Aktivierung der Mastzellen festgestellt werden. Unerwarteter weise verstärkte die Deletion von FcγRIIB auf Mastzellen deren Aktivierung, wobei die Internalisierung von IgE selbst stark reduziert war. Demzufolge wird durch Bindung von Allergen-spezifischen IgG Antikörpern an FcγRIIB die IgE Internalisierung gefördert ohne eine Aktivierung der Mastzelle auszulösen.

In einem zweiten Teil dieser These wurden Allergen-spezifischen B Zell-Antworten *in vivo* charakterisiert. Dazu wurde ein Asthma Modell verwendet, in welchem Mäuse intranasal mit Feld1 sensitisiert wurden. Während der Sensitisierung konnte ein Anstieg der Feld1-spezifischen IgG1 sowie IgE Antikörpertiter im Serum beobachtet werden. Allergen-spezifische Antikörper bildende Zellen (AFCs), welche Feld1-spezifisches IgG und IgE sekretierten, konnten in den sekundären Lymphorganen und im Knochenmark detektiert werden. Die höchste Anzahl wurde im drainierenden mediastinalen Lymphknoten gemessen. Auch die Bildung Feld1-spezifischer Keimzentren konnte im mediastinalen Lymphknoten beobachtet werden, wobei bis zu 25% aller IgG B Zellen Feld1-spezifisch waren. In den sekundären Lymphorganen konnten jedoch keine IgE B Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten implizieren, dass sich Allergen-spezifische IgE B Zellantworten möglicherweise räumlich und zeitlich von den IgG B Zellantworten unterscheiden.

Diese These erweitert das Verständnis für den Mechanismus, wie Allergen-spezifische IgG Antikörper in allergischen Reaktionen schützend wirken. Zudem konnte ein neuer Mechanismus der IgG vermittelten Mastzell Desensitisierung beschrieben werden: die IgG vermittelte Internalisierung von Allergen-spezifischem IgE.