

Aus der Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Baumnuss- und Sesamallergie bei Erdnussallergikern –
Häufigkeit und die Bedeutung von homologen
Sequenzepitopen in der klinischen Reaktivität**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonard Rosenfeld

aus Münster

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Niggemann
2. Prof. Dr. med. M. Worm
3. Prof. Dr. med. Th. Werfel

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Einleitung Überblick.....	4
1.2	Begriffsbestimmung.....	4
1.3	Epidemiologie.....	5
1.4	Klinik.....	6
1.5	Diagnostische Verfahren und deren Wert	9
1.6	Allergene	12
1.6.1	Erdnuss.....	15
1.6.2	Walnuss	17
1.6.3	Haselnuss.....	17
1.6.4	Sesam.....	19
1.7	Kreuzreaktivität.....	20
1.8	Microarray	21
2	Zusammenfassung und Herleitung der Fragestellung	22
3	Material und Methoden	25
3.1	Patienten	25
3.2	Herstellung der fluoreszenzmarkierten Anti-IgE und Anti-IgG4 Antikörper ...	26
3.3	Herstellung der Peptidslides.....	26
3.3.1	Peptide.....	26
3.3.2	Druck der Arrays.....	34
3.4	Immunolabeling	36
3.5	Scannen der Slides	38
3.6	Datenanalyse	39
3.7	Inhibitionsexperimente	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Auswertung Fragebögen.....	41
4.2	Microarrays.....	48
4.2.1	Microarrays: Methode	48
4.2.2	Unterscheidung der Patientengruppen anhand der Peptidbindung	54
4.2.3	Inhibitionsexperimente	84
5	Diskussion	95
5.1	Fragebögen.....	95
5.2	Microarrays:.....	98
5.2.1	Microarrays: Methode	98
5.2.2	Unterscheidung der Patientengruppen	101
5.2.3	Microarrays: Inhibitionsversuche	106
6	Zusammenfassung	117
7	Literaturangaben.....	119

1 Einleitung

1.1 Einleitung Überblick

Erdnussallergien sind häufige Nahrungsmittelallergien [1]. Daneben sind diese Nahrungsmittelallergien gefürchtet, da sie besonders schwere Reaktionen hervorrufen können und potentiell tödlich sind [2]. Die Erkrankung ist meist lebenslang [3]. Bei erdnussallergischen Patienten wurde beobachtet, dass diese auch häufig gegen Baumnüsse reagieren [4]. Gleichzeitig ist es mit den derzeitigen diagnostischen Methoden nicht sicher vorherzusagen, welche erdnussallergischen Patienten baumnussallergisch sind und welche tolerant. Auf Grund der möglichen schweren Reaktionen bedeutet dies für die Patienten in der Regel, dass sie auf alle Nüsse und Samen verzichten müssen, wenn sie erdnussallergisch sind. Dies ist aber wegen des häufig auch versteckten Vorkommens von Nüssen in vielen Speisen mit erheblichem Aufwand und großer Unsicherheit für die Patienten verbunden. Uns interessiert deshalb, wie häufig Erdnussallergiker auch gegen Baumnüsse und Samen allergisch sind. In einem zweiten Schritt sollte versucht werden, Labormethoden zu entwickeln, die eine differenzierte Diagnose zulassen.

1.2 Begriffsbestimmung

Nach der Nomenklatur der European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) sind Nahrungsmittelallergien als immunologische Reaktionen auf Protein in der Nahrung, nicht auf Fett oder Kohlenhydrat, definiert [5, 6]. Diese Allergien können sich als akute Reaktionen mit Symptomen wie Urtikaria, Angioödem, Erbrechen, Diarrhoe, Rhinitis, Luftnot, Larynxödem und Kreislaufreaktionen zeigen und milde bis schwere anaphylaktische Reaktionen darstellen [7].

Nahrungsmittelallergien werden in der Nomenklatur der EAACI von einer nichtimmunologischen Unverträglichkeitsreaktion auf Nahrungsmittel (nonallergic food hypersensitivity) abgegrenzt. Diese wird auch als Nahrungsmittelintoleranz bezeichnet [1]. Bei der Nahrungsmittelintoleranz handelt es sich um eine nichtimmunologische Antwort, die durch eine besondere physiologische Reaktion des Betroffenen hervorgerufen wird. Das kann zum Beispiel ein Enzymdefekt sein.

Nahrungsmittelallergien können auf IgE-vermittelten und auf nicht IgE-vermittelten Mechanismen beruhen.

Bei Erdnuss- und Nussallergie liegt in der Regel ein IgE-vermittelter Mechanismus zugrunde [8].

1.3 Epidemiologie

Zwischen 4% und 8% der Kinder und zwischen 1% und 2% der Erwachsenen leiden an Nahrungsmittelallergien [9-13].

Nüsse nehmen dabei unter den Allergenen einen großen Anteil ein, und haben eine steigende Prävalenz. Beim Vergleich von zwei Kohortenstudien auf der Isle of Wight von 1989 und von 1994-96 fand sich ein Anstieg von Erdnussallergie von 0,5% (6/1218) auf 1% (133/1273; $p=0,2$) und eine steigende Sensibilisierungsrate für Erdnuss von 1,1% auf 3,3% ($p=0,001$) [14, 15]. In einer landesweiten computergestützten Telefonumfrage in den USA fand sich im Jahr 2003 eine Prävalenz für Erdnuss- und Baumnussallergie von 1,04% [16]. Die Studie von Sicherer et al. berichtet ebenfalls von einem signifikanten Anstieg von Erdnussallergie in der Gruppe von Kindern unter 18 Jahren im Vergleich zu 1997. Die Prävalenz von Erdnussallergie stieg in dieser Gruppe von 0,4% auf 0,8% ($p=0,05$). 20% der von einer Nussallergie Betroffenen berichteten in dieser Studie von einer Allergie sowohl auf Baumnüsse als auch auf Erdnüsse.

Wichtig ist auch, dass sich die Häufigkeiten von Nahrungsmittelallergien gegen bestimmte Allergene in unterschiedlichen Populationen unterscheiden können. Dies wird durch die Beobachtung gezeigt, dass Sesam bei nahrungsmittelallergischen Kindern in Israel nach Hühnerei und Kuhmilch das dritthäufigste Allergen und der zweithäufigste Auslöser von anaphylaktischen Reaktionen ist [17]. Erdnussallergie scheint in Israel selten zu sein [18].

Neben den Klasse-I-Allergien gegen Erdnüsse und Baumnüsse gibt es die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien. Sie spielen in Nordeuropa insbesondere bei Patienten mit Allergien auf Birkenpollen eine wichtige Rolle: in einer Studie von Ortolani et al. waren 87% der untersuchten haselnussallergischen Patienten positiv im Hautpricktest mit Birkenpollen [19]. Die Haselnussallergie ist hierbei auf eine Kreuzreaktion zwischen dem Allergen Cor a 1 der Haselnuss und Bet v 1 der Birke

zurück zu führen und äußert sich meist als Orales Allergie Syndrom [20]. Auf der anderen Seite sind schwere Reaktionen bei haselnussallergischen Patienten ohne Pollenallergie beschrieben worden [19, 21]. In der vorliegenden Arbeit werden die pollenunabhängigen Haselnussallergien untersucht.

Auch in Deutschland sind Nahrungsmittelallergien häufig. In einer Querschnittsstudie zur Prävalenz von Nahrungsmittelallergien in Berlin fanden sich bei 4,2% der ausgewerteten Kinder und Jugendlichen reproduzierbare Symptome auf Nahrungsmittel. 3,5% zeigten Symptome von Nahrungsmittelallergie und 0,7% nicht-allergische Nahrungsmittelunverträglichkeit [9]. Allerdings liegt die Rate an wahrgenommener Nahrungsmittelunverträglichkeit viel höher. 61,5% der Teilnehmer berichteten von Symptomen, die mit Nahrungsmittelaufnahme verbunden seien. Die Beobachtung, dass durch Nahrungsmittel induzierte Hypersensitivitätssymptome vom Patienten subjektiv weit häufiger empfunden werden als vom Arzt diagnostiziert werden, findet sich auch in anderen Studien [22]. Eine sichere Diagnose ist also aus zum Ausschluss von Nahrungsmittelallergien wichtig.

1.4 Klinik

Die Prävalenz von Nahrungsmittelallergien ist in den ersten Lebensjahren mit ca. 6-8% am höchsten und fällt dann auf 1-2% ab. Während Kuhmilch und Hühnereiallergien sich meistens mit dem Älterwerden verlieren, neigen Erdnuss, Baumnuss-, und Sesamallergien zu lebenslanger Persistenz [3, 4, 23]. Ewan et al. untersuchten 62 Patienten mit Nussallergien. Dabei fand sich ein Neuauftreten von Nussallergien unter den Jugendlichen und Erwachsenen in nur 8% der Fälle. 92% der untersuchten Patienten entwickelten ihre Allergien vor dem Alter von sieben Jahren. Nur etwa 20% der Patienten verlieren ihre Allergie. Selbst bei diesen Patienten kann die Allergie aber auch wieder auftreten. [24, 25]. In einer Studie von 68 Patienten, die ihre Erdnussallergie verloren hatten, gab es 8% Rezidive [26]. In diesen Studien hatten die Patienten, die nur unregelmäßig Erdnüsse aßen ein erhöhtes Risiko, ihre Toleranz wieder zu verlieren. Ähnlich wie die Nussallergien persistieren Sesamallergien ebenfalls in 80% der Fälle [23].

Neben der Persistenz ist die Schwere der möglichen Reaktionen auf Erdnüsse, Baumnüsse und Sesam ein wichtiges klinisches Merkmal dieser Nahrungsmittelallergien. In einer Untersuchung von 122 Patienten mit Erdnuss- und Baumnussallergien von Sicherer et al. gingen 89% der Reaktionen mit Hautsymptomen einher, 52% betrafen den Respirationstrakt und 32% den Gastrointestinaltrakt [27]. In 72% der Fälle traten die Reaktionen bei erster Exposition mit den betreffenden Nüssen auf. In 32% der Erstreaktionen waren zwei Organsysteme betroffen und drei in 21% der Fälle. 38% der Erstreaktionen auf Erdnuss oder Baumnüsse wurden mit Epinephrin behandelt. Akzidentelle Ingestion kam bei 55% der erdnussallergischen und 30% der baumnussallergischen Patienten vor. Die Symptome waren bei akzidenteller Ingestion ähnlich wie bei erster Reaktion. Zu den gastrointestinalen Symptomen gehören Nausea, Erbrechen, Schmerzen und Diarrhoe [28]. Obwohl gastrointestinale Sofortreaktionen ohne andere Symptome vorkommen können, treten sie häufig gemeinsam mit Reaktionen in anderen Organsystemen auf.

Die besondere klinische Bedeutung von Nussallergien zeigt sich auch darin, dass Erdnuss und Nüsse die häufigsten Nahrungsmittel sind, die tödliche und lebensbedrohliche Reaktionen hervorrufen können [2]. Bock et al. untersuchten 32 tödliche durch Nahrungsmittel ausgelöste anaphylaktische Reaktionen, die zwischen 1994 und 1999 an ein nationales Register in den USA gemeldet wurden. Insgesamt waren in 63% der Fälle (20) Erdnuss und in 31% (10) Baumnüsse für die tödlichen Reaktionen verantwortlich. Die Mehrzahl der Betroffenen waren Jugendliche oder junge Erwachsene. Beide Geschlechter waren gleich häufig betroffen. Sesam ist die zweithäufigste Ursache für anaphylaktische Reaktion bei Kindern in Israel [17].

Die Gefahr von allergischen Reaktionen ist auch deshalb so hoch, da die Schwelle zur Auslösung einer klinischen Reaktion sehr niedrig sein kann. 18% der Patienten reagieren bei Dosen von weniger als 65mg Erdnuss [29, 30].

Auch Baumnussallergien können schon durch sehr geringe Mengen an Allergen ausgelöst werden. So finden sich in einer Studie mit doppelblind placebokontrollierten Nahrungsmittelprovokationen bei der Hälfte der haselnussallergischen Patienten Schwellenwerte von 6mg Haselnussprotein [31]. Allerdings hatten die meisten Patienten in dieser Studie pollenassoziierte Haselnussallergien. Dies sind Dosen, die potentiell versteckt in Nahrungsmitteln

vorkommen können. Diese Eigenschaft von Nussallergien verbunden mit der Schwere einer möglichen Reaktion zeigt, wie wichtig eine sichere Diagnose für den Patienten ist.

Eine bedeutsame Beobachtung bei erdnussallergischen Patienten ist ferner, dass diese häufig auch baumnussallergisch sind. Die Koexistenz von Erdnuss und Baumnussallergie wird in 20-50% der Fälle beschrieben [4, 16, 32]. In Sicherers Gruppe ist Walnuss für über 50% der Reaktionen auf Baumnüsse verantwortlich, bei Ewan ist Paranuss, gefolgt von Mandel, Haselnuss, Walnuss und Cashew das häufigste auslösende Allergen [4, 16]. In beiden Studien ist allerdings Erdnuss das am häufigsten sensibilisierende Agens. Es ist also für die Diagnostik besonders wichtig herauszufinden, ob ein Patient nur gegen Erdnuss allergisch ist, oder ob Baumnüsse für ihn eine zusätzliche potentielle Gefahr darstellen.

Die Allergie und im Besonderen die Diät und die Angst vor einer akzidentellen Reaktion haben großen Einfluss auf das Leben der Patienten und deren Eltern [33, 34]. So wurde in einer Studie die Lebensqualität von Kindern mit Erdnussallergie mit solchen mit Diabetes mellitus verglichen. Dabei war die Lebensqualität der Kinder mit Erdnussallergie stärker beeinträchtigt als die der Kinder mit Diabetes mellitus [33]. Es kommt häufig vor, dass Patienten aus Angst vor Reaktionen auch nach negativen Nahrungsmittelprovokationen auf die Nahrungsmittel verzichten. So wurden in einer Studie von Eigenmann et al. in 25,4% Nahrungsmittel nach negativen Nahrungsmittelprovokationen von Patienten, die vormals mit Nahrungsmittelallergien diagnostiziert wurden, nicht wieder eingeführt. Patienten mit einer vormaligen Diagnose von Erdnussallergie führten das Nahrungsmittel weniger häufig wieder ein als bei anderen Nahrungsmitteln. Unter anderen genannten Gründen fanden sich Angst vor Persistenz der Allergien in 12,7% aller Fragebögen [35].

Abgegrenzt von den Nahrungsmittelallergien mit systemischer Manifestation werden die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien [28]. Diese zeichnen sich meist durch Pruritus und Ödem beschränkt auf die Mundhöhle aus, auch Orales Allergie Syndrom bezeichnet. Sie werden durch IgE-Antikörper hervorgerufen, die gegen Pollenallergene gerichtet sind, und die mit homologen Proteinen in bestimmten ungekochten Früchten und Gemüse reagieren. Patienten mit pollenassoziiertes

Nahrungsmittelallergie haben deshalb gewöhnlich eine Anamnese von saisonaler allergischer Rhinitis (Heuschnupfen). Beispiele sind Reaktionen auf Äpfel, Pfirsiche und Kirschen aber auch Haselnuss bei Patienten mit Birkenpollenallergie. So wird bei birkenpollenallergischen Patienten die Reaktion auf Haselnüsse durch Kreuzreaktion von IgE-Antikörpern zwischen dem Birkenpollenallergen Bet v 1 und dem Haselnussallergen Cor a 1 ausgelöst [20]. Die auslösenden Proteine sind hitzelabil, und gekochte Formen der Früchte und Gemüse lösen meist keine Symptome aus. Es wird angenommen, dass systemische Reaktionen verhindert werden, weil diese Proteine leicht verdaut werden. Die auslösenden Allergene, der in unserer Studie untersuchten nicht-pollenassoziierten Allergien, sind im Gegensatz dazu hitzestabile Proteine, und die hervorgerufenen Reaktionen sind systemische Reaktionen [21].

1.5 Diagnostische Verfahren und deren Wert

Die besondere Schwere der klinischen Reaktionen bei Nussallergien und das Risiko gegen mehr als eine Nuss allergisch zu sein unterstreichen die Bedeutung einer exakten Diagnose dieser Allergien.

Die Anamnese ist noch immer eine Hauptstütze im diagnostischen Prozess [1]. Sie soll klären, ob eine nahrungsmittelinduzierte Reaktion stattgefunden hat, welches Nahrungsmittel beteiligt war und welcher Mechanismus wahrscheinlich eine Rolle gespielt hat. Hierbei sind insbesondere der zeitliche Zusammenhang und die klinische Symptomatik wichtige Informationen.

Daneben gibt es die Möglichkeit, Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene nachzuweisen. Zu diesen Verfahren gehören der Hautpricktest und die Bestimmung des spezifischen IgE. Diese Verfahren haben allerdings nur eine begrenzte diagnostische Sicherheit und können in den meisten Fällen eine klinisch relevante Allergie weder beweisen noch ausschließen.

Beim Hautpricktest wird ein Allergenextrakt auf die Haut aufgebracht und die Haut dann mit einer Lanzette geprikt. Beurteilt wird die Größe der Allergenquaddel im Vergleich zur Histamin- und NaCl- Quaddel (Positiv- und Negativkontrolle) [1].

Stärker positive Werte zeigen dabei eine höhere Wahrscheinlichkeit einer klinischen Reaktivität an. So wurden Hautpricktests mit den Ergebnissen der Nahrungsmittelprovokation verglichen [36]. Ein Quaddeldurchmesser ab 8mm für Erdnuss hatte dabei in der untersuchten Population einen positiv prädiktiven Wert von 95%. Auf der anderen Seite können negative Hautpricktests in vielen Fällen auch IgE-vermittelte allergische Reaktivität ausschließen [1]. In einem weiten Graubereich von 3-7mm ist es allerdings weder für Erdnüsse noch für Baumnüsse möglich, klinische Reaktivität vorherzusagen [37]. Bei Clark und Ewan waren 54% der Patienten mit einem Testergebnis in diesem Bereich allergisch und 46% tolerant auf die betreffende Nuss. Bei sesamallergischen Patienten fand sich keine Korrelation zwischen der Quaddelgröße im SPT und dem Ergebnis der Nahrungsmittelprovokation [23]. Also ist der Hautpricktest ein gutes Mittel, um IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien auszuschließen, nicht jedoch um das Vorliegen einer Allergie zu beweisen [38].

Ähnliches gilt für die Bestimmung des spezifischen IgE. Eine verbreitete Methode ist der ImmunoCAP (ImmunoCAP, Phadia). Auch hier wurden für verschiedene Allergene diagnostische Werte identifiziert, die eine allergische Reaktion mit positiv prädiktivem Wert von >95% vorhersagen konnten [39]. Dieser Wert lag für Erdnuss in verschiedenen Studien um 15kU/l [36, 39, 40]. Untersuchungen zu CAP-Werten bei baumnussallergischen Patienten zeigen, dass ebenfalls bei 15kU/l von positiv prädiktivem Wert von 95% auszugehen ist [37].

Eine Korrelation zwischen Schwere der Reaktion und Ergebnissen von Pricktest und spezifischem IgE scheint jedoch weder für Erdnüsse noch für Baumnüsse und Sesam möglich zu sein [23, 37]. In der Studie von Clark und Ewan wurden 1000 Patienten mit Allergien auf Erdnuss und Baumnüsse untersucht. Die Ergebnisse von Hautpricktests und spezifischem IgE wurden mit der Anamnese korreliert. Dabei fand sich keine Korrelation zwischen dem spezifischen IgE und der Schwere der klinischen Reaktion. Weder Hautpricktest noch ImmunoCAP konnten danach die klinische Schwere einer Reaktion vorhersagen, es fand sich kein Unterschied zwischen geringer Urticaria und Anaphylaxie. Desweiteren hatten nur 30% der reaktiven Patienten ein spezifisches IgE größer oder gleich 15kU/l.

Die Studie von Clark und Ewan zeigte aber noch ein weiteres für unsere Studie wichtiges Ergebnis: Unter den nussallergischen Patienten, die eine bestimmte Nusssorte tolerierten fanden sich viele Patienten, bei denen Sensibilisierung gegen die tolerierte Nuss nachzuweisen war [37]. Etwa 40% dieser Patienten hatten spezifisches IgE $>0,35\text{kU/l}$. Ähnlich war das Ergebnis im Hautpricktest, bei dem über 40% der Patienten ein positives Testergebnis beim Test auf die klinisch tolerierte Nuss hatten. Die Differenzierung beispielsweise von erdnussallergischen Patienten in baumnusstolerant und baumnussallergisch scheint also nicht sicher möglich zu sein.

Ein weiteres Problem ist die begrenzte Vergleichbarkeit der Testverfahren. Auf Grund unterschiedlichen Rohmaterials sowie der Bedingungen der Produktion und Lagerung gibt es eine mangelnde Standardisierung des beim Hautpricktest und im biologischen Testen verwendeten Materials [41, 42].

Der Atopy Patch Test erhöht zwar in Kombination mit einem SPT und der Messung des spezifischen IgE die Sensitivität und Spezifität der Diagnose einer Nahrungsmittelallergie [43]. Allerdings wird durch diesen Test der prädiktive Wert der *in-vitro* Diagnostik bei vergleichsweise hohem Aufwand bei der Durchführung nur geringfügig erhöht.

Zurzeit besteht kein Beweis für einen diagnostischen Wert von nahrungsmittel-spezifischem IgG oder IgG4 Antikörperspiegeln, Nahrungsmittel Antigen-Antikörper-Komplexen, Lymphozytenaktivierung oder sublingualen oder intrakutanen Provokationen [44]. Nahrungsantigenspezifisches IgG oder IgG4 können bei Patienten mit Nahrungsmittelallergien erhöht sein. Ob aber ihre Spezifität nur die Art des aufgenommenen Nahrungsmittels reflektiert, eine bestimmte nahrungsmittelbezogene Pathogenese anzeigt, oder sogar Zeichen einer erworbenen Toleranz ist, ist nicht geklärt [45].

Neben den Verfahren, die eine Sensibilisierung nachweisen, ist es auch möglich, die Nahrungsmittelallergie direkt zu diagnostizieren. Der Goldstandard der Diagnose ist dabei weiterhin die doppel-blinde, Placebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokation [1, 44]. Die Nahrungsmittelprovokation hat allerdings den Nachteil, dass sie zeitaufwändig ist und das Risiko einer anaphylaktischen Reaktion birgt.

Die aktuellen diagnostischen Verfahren sind also nicht befriedigend. Besonders für die Differenzierung von verschiedenen klinischen Konstellationen, in denen einige Nüsse toleriert werden und andere Reaktionen hervorrufen, sind die derzeitigen *in-vitro* Methoden nicht geeignet. Ein einfacher und sicherer Test ist also wünschenswert.

1.6 Allergene

Die Hauptallergene der Erdnuss und Baumnüsse sind bekannt [46-54] Die meisten dieser Proteine gehören zur Gruppe der Samenspeicherproteine, wie die 2S Albumine, die 7S Globuline (Viciline) und die 11S Globuline (Legumine) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Samenspeicherproteine von Erdnuss, Walnuss, Haselnuss, Sesam. In Klammern angegeben sind NCBI Accession Nummern.

	Prolamin Superfamilie	Cupin Superfamilie	
	2 S Albumin	7 S Globulin (Vicilin)	11 S Globulin (Legumin)
Erdnuss	Ara h 2 (AAK96887)	Ara h 1 (AAB00861)	Ara h 3 (AAM46958)
Walnuss	Jug r 1 (AAB41308)	Jug r 2 (AAF18269)	Jug r 4 (AAW29810)
Haselnuss		Cor a 11 (AAL86739)	Cor a 9 (AAL73404)
Sesam	Ses i 1 (AAD42943) Ses i 2 (AAK15088)	Ses i 3 (AAK15089)	Ses i 6 (AAD42944) Ses i 7 (AAK15087)

2 S Albumine mit ihren ca. 15kDa bestehen aus Untereinheiten von ca. 9 und 5kDa. Sie sind strukturell verwandt mit Lipidtransferproteinen und scheinen

Abwehrfunktionen zu haben [49]. Viciline sind 7S Globuline, die als Trimere aus 50kDa Untereinheiten bestehen. Sie kommen vor allem in den Samenkotyledonen (Keimblättern) vieler Pflanzen vor. Diese haben offensichtlich die Funktion, während des Keimens Nährstoffe zu liefern [55]. Viciline haben auch Abwehrfunktionen, z.B die Inhibition von Pilzwachstum oder antibakterielle Eigenschaften. Der Anteil der Viciline an den Samenpeicherproteinen ist nach den 11S Proteinen in vielen Samen der zweitgrößte. Legumine oder 11S Proteine sind 11-13S hexamere Globuline mit Untereinheiten, die aus 30-40kDa schweren sauren und 17-20kDa schweren basischen Peptiden bestehen. Weitere potentielle Allergene sind Lipidtransferproteine. Sie sind beteiligt im Austausch von Lipiden zwischen zellulären Membranen. Ein Merkmal, das von vielen Proteinen geteilt wird, die lebensbedrohliche Reaktionen auf Baumnüsse hervorrufen, ist eine relative Resistenz gegenüber Proteolyse und Denaturierung [56].

Obwohl Erdnüsse, Baumnüsse und Samen wie Sesam zu taxonomisch unterschiedlichen Pflanzengruppen gehören, zeigen ihre Samenspeicherproteine einen hohen Grad an Homologie in ihren Aminosäuresequenzen [49] (Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4).

Tabelle 2

		Jug r 1	Ses i 1	Ses i 2
Ara h 2	Homologie	30,6%	34,0%	32,3%
	Identische AS	21,7%	25,0%	25,9%

Tabelle 3

		Jug r 2	Cor a 11	Ses i 3
Ara h 1	Homologie	42,0%	36,9%	38,5%
	Identische AS	30,5%	26,6%	28,2%

Tabelle 4

		Jug r 4	Cor a 9	Ses i 6	Ses i 7
Ara h 3	Homologie	51,7%	51,4%	41,3%	41,1%
	Identische AS	42,5%	42,8%	31,1%	31,8%

Tabelle 2-4: Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der Samenspeicherproteine von Walnuss, Haselnuss und Sesam im Vergleich zur Erdnusssequenz. Angabe jeweils homologe Aminosäuren (Ähnlichkeit in Polarität, Hydrophilie) und identische Aminosäuren. Berechnung durch Vector NTI.

Die allergische Antwort wird durch Allergene hervorgerufen, die mindestens zwei IgE-Antikörper quervernetzen, die auf den hochaffinen IgE-Rezeptoren auf präsensibilisierten Mastzellen und Basophilen gebunden sind [57]. Die Interaktion zwischen Allergen und IgE-Antikörper ist hochspezifisch, wobei der Antikörper mit seinem variablen Anteil eine Region des Antigens erkennt, die IgE Bindungsepitop genannt wird. Dabei wird zwischen Konformationsepitopen und Sequenzepitopen unterschieden [1]. Während Konformationsepitope von der räumlichen Anordnung der Aminosäurereste abhängen, werden Sequenzepitope durch die Primärsequenz der Aminosäuren bestimmt [58] (Abbildung 1). Der Hauptteil der Epitope von inhalativen Allergenen wie Graspollen, Birkenpollen und Hausstaubmilben besteht aus Konformationsepitopen [57]. Bei der Untersuchung einiger dieser Epitope konnte festgestellt werden, dass sie in der dreidimensionalen Rekonstruktion auf der Oberfläche der Allergene lagen.

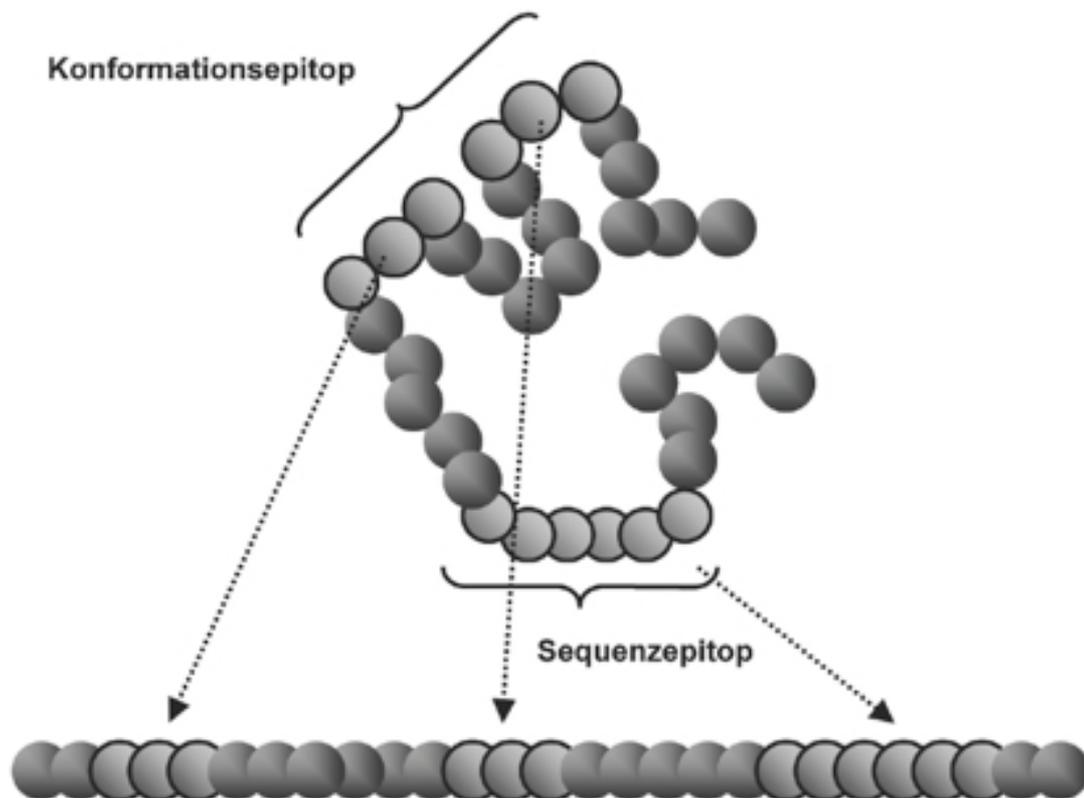


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Konformationsepitops und eines linearen Epitops (Sequenzepitops). Konformationsepitope können zerstört werden, wenn die natürliche Form der Proteine zerstört wird, z.B durch Proteolyse oder Erhitzen. Sequenzepitope (lineare Epitope) können dabei länger erhalten bleiben. Abb. in Anlehnung an [58].

Dagegen wird angenommen, dass Sequenzepitope eine entscheidende Rolle bei Nahrungsmittelallergien spielen, da sie länger resistent gegen Verdauung sind [59]. Außerdem konnten Hinweise für eine mögliche diagnostische Bedeutung von Sequenzepitopen bei der Vorhersage klinischer Reaktivität von allergischen Patienten gefunden werden. So erkennen in einer Studie von Shreffler et al. Patienten mit besonders schweren klinischen Reaktionen auf Erdnüsse mehr sequentielle Epitope der Erdnusssamenspeicherproteine als Patienten mit leichteren allergischen Symptomen und ähnlichem spezifischen IgE gegen Erdnuss [60]. Eine andere Studie untersucht Unterschiede im Erkennen von linearen Epitopen bei erdnusssensibilisierten Patienten mit und ohne klinischer Reaktivität [61]. Unabhängig von ihren erdnussspezifischen IgE-Spiegeln erkannten dabei die meisten Patienten mit symptomatischer Erdnussallergie bestimmte lineare Epitope von Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3, die bei den erdnusstoleranten Patienten weit seltener positiv waren. Eine Korrelation zwischen klinischer Reaktion und Epitoperkennung konnte auch für die Kuhmilchallergie gezeigt werden [62-65]. Die Anwesenheit von IgE-Antikörpern gegen bestimmte lineare Epitope konnte in diesen Studien zwischen Kindern mit persistierenden und solchen mit nur transienten Kuhmilchallergien differenzieren.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Allergene von Erdnuss, Walnuss, Haselnuss und Sesam beschrieben werden.

1.6.1 Erdnuss

Es sind verschiedene wichtige Allergene der Erdnuss beschrieben worden [46, 48, 66-70]. In der vorliegenden Arbeit werden die linearen Epitope von Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 untersucht (s. Tabelle 1).

Ara h 1 ist ein 7S Globulin und Hauptallergen der Erdnuss [47, 59]. Es wurden 23 lineare Epitope auf Ara h 1 identifiziert, die 12 IgE-bindenden Regionen entsprechen. Dabei ließ sich allerdings kein offensichtliches Sequenzmotiv finden, das von allen Epitopen geteilt wurde. Vier dieser Epitope schienen immunodominant zu sein, da sie von mehr als 80% der getesteten Patienten erkannt wurden und mehr IgE als die anderen Ara h 1-Epitope banden. Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Peptide hatte Effekte auf die IgE-Bindung und führte an einigen Stellen zu

vollständigem Verlust der IgE-Bindung. Andere Aminosäuren ließen bei Austausch die Bindungsfähigkeit dagegen unbeeinflusst [59].

Ara h 2 ist ebenfalls ein Hauptallergen der Erdnuss. Es gehört zu den 2S Albuminen [71]. In der Studie von Burks et al. wurde Ara h 2 von >90% der erdnussallergischen Patienten erkannt. Es konnten 10 lineare Epitope auf Ara h 2 identifiziert werden [46]. Drei dieser Epitope wurden von allen getesteten Patienten erkannt und banden mehr IgE als die anderen. Sie waren damit immunodominant. Austausch einzelner Aminosäuren durch Alanin konnte auch bei den Epitopen von Ara h 2 zu Verlust der IgE-Bindung führen. Dabei gab es weder in der Art noch in der Position der Aminosäure, die bei Austausch zum Verlust der Bindung führte, ein erkennbares Muster. Im funktionellen Degranulationsassay war Ara h 2 potenter als Ara h 1 [69]. Dies deutet auf die besondere pathogenetische Bedeutung von Ara h 2 in der Zellaktivierung hin. In der Tat ist Ara h 2 neben Ara h 6, einem weiteren 2S Albumin mit hoher Homologie zu Ara h 2, ein bei erdnussallergischen Kindern besonders häufig erkanntes Erdnussallergen [72].

Ara h 3 ist ein Erdnussallergen, das zu den 11S Globulinen gehört [48]. Es wird in der Studie von Rabjohn et al. von 45% der Patienten erkannt. Analog zu Ara h 1 und 2 wurden auch hier lineare Epitope bestimmt. Es fanden sich vier lineare Epitope auf der acidischen Untereinheit von Ara h 3. Auch hier konnte Austausch bestimmter Aminosäuren die IgE-Bindung aufheben. Daneben wurde kürzlich in einer Gruppe von erdnussallergischen Kindern eine spezifische Sensibilisierung gegen die basische Untereinheit von Ara h 3 beschrieben [73].

Die Struktur der allergenen Proteine scheint eine große Rolle für ihre Stabilität zu sein und damit für ihre Fähigkeit, als Allergen zu wirken [74]. Nach Behandlung mit Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin bleibt von Ara h 2 eine Anzahl von relativ großen Fragmenten, die lange resistent gegenüber weiterer enzymatischer Verdauung sind. Diese Peptidfragmente enthalten bestimmte intakte IgE-Bindungsepitope. Mehrere potentielle Enzymschnittstellen sind durch die kompakte Struktur des Proteins vor den Enzymen geschützt. Das enzymbehandelte Allergen bleibt so trotz des Angriffs von Proteasen intakt bis die Fragmente dissoziieren, wenn die Disulfidbrücken reduziert werden. Sequenzanalyse der resistenten Proteinfragmente zeigt, dass sie die meisten der immunodominanten IgE bindenden Epitope enthalten. Diese

Ergebnisse liefern ein Bindeglied zwischen Allergenstruktur und den immunodominanten IgE-bindenden Epitopen.

1.6.2 Walnuss

Walnuss ist bei amerikanischen Patienten die Baumnuss, gegen die am häufigsten Allergien bestehen [49]. Obwohl *Juglans nigra* und *californica* häufig in Nordamerika sind, werden sie selten gegessen. Folglich sind die meisten walnussallergischen Patienten wahrscheinlich gegen *Juglans regia*, die englische Walnuss allergisch. Jug r 1 ist ein Allergen der Walnuss und ein 2S Albumin [75] (s. Tabelle 1). Es konnte ein immunodominantes lineares Epitop auf Jug r 1 identifiziert werden, das von 15 der 20 untersuchten Jug r 1-allergischen Patienten erkannt wurde [76]. Dies ist ein Unterschied zu anderen Allergenen, da in anderen Fällen meist verschiedene Epitope identifiziert werden konnten. Konformationsepitope könnten hier also eine größere Rolle spielen [76].

Ein zweites Allergen der Walnuss ist Jug r 2, ein 7S Globulin [77]. In der Studie von Teuber et al. bindet Serum-IgE von 9 von 15 Patienten an Jug r 2. IgE-Inhibitionsexperimente zeigen, dass es keine oder nur sehr geringe Kreuzreaktivität zwischen Jug r 2 und Erbsenvicilin, Erdnussproteinen oder Kakaoproteinen gibt [77]. Jug r 4, ein 11S Globulin, wird von 57% der walnussallergischen Patienten gebunden [51]. Hier konnte *in-vitro* Kreuzreaktivität mit Haselnuss, Cashew und Erdnussextrakten nachgewiesen werden.

Ein Lipidtransferprotein wurde daneben als wichtiges Allergen bei italienischen Patienten identifiziert [78]. Dies ist nach Sensibilisierung gegen Pfirsich von Bedeutung.

1.6.3 Haselnuss

Bei der Haselnussallergie muss man zwischen der systemischen Haselnussallergie (Klasse I Allergie) und der pollenassoziierten Haselnussallergie unterscheiden [49]. Wo Bäume der Familie der Birkengewächse (*Betulaceae*) endemisch sind (z.B. Birke, Erle), kann die wie oben beschriebene Kreuzreaktivität zwischen Pollen und Nuss der Hauptgrund der Nahrungsmittelallergie sein [79]. Cor a 1, ein 17kDa

Allergen des Haselnusspollen ist verwandt mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1. Vier Isoformen von Cor a 1 sind beschrieben, Cor a 1.01-1.04, wovon drei in Pollen und eins in der Haselnuss vorkommen. Cor a 1.04 hat mehr Ähnlichkeit mit dem Birkenpollenallergen als mit seinem eigenen Pollenhomolog, dem Allergen des Haselstrauchs [80]. Cor a 2, ein weiteres Haselnussallergen, kreuzreagiert ebenfalls mit Birkenpollen [49].

Auf der anderen Seite sind Allergene beschrieben worden, die pollenunabhängig schwere Reaktionen bei haselnussallergischen Patienten hervorrufen können [19, 21]. Im Gegensatz zu den pollenassoziierten Allergenen handelt es sich hierbei in erster Linie um hitzestabile Antigene. Es besteht keine Kreuzallergie mit Birkenpollen.

Als pollenunabhängiges Hauptallergen der Haselnuss konnte Cor a 9, ein 11S Globulin, identifiziert werden [52] (s. Tabelle 1). Es wurde von der Mehrzahl der amerikanischen Patienten mit systemischen Reaktionen auf Haselnuss erkannt. Eins der linearen IgE-Bindungs epitope von Ara h 3 hat 67% Aminosäurehomologie mit dem korrespondierenden Gebiet auf Cor a 9.

Cor a 11, ein 7S Globulin (Vicilin) der Haselnuss, wurde als weiteres pollenunabhängiges Allergen entdeckt [81]. In der Untersuchung der allergenen Potenz von Cor a 11 lag die Prävalenz von IgE-Reaktivität gegen dieses Protein unter 50%. Sowohl die natürliche als auch die rekombinante Form von Cor a 11 konnten in gleicher Form basophile Zellen aktivieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die IgE-Antikörper gegen das Proteingerüst von Cor a 11 und nicht gegen Kohlenhydratstrukturen gerichtet sind. Im Vergleich zu Cor a 1 wurde eine 10000fache Konzentration von Cor a 11 benötigt, um eine vergleichbare Mediatorfreisetzung aus basophilen Zellen zu induzieren. Cor a 11 muss deshalb sowohl in Bezug auf Prävalenz der Bindung als auch auf allergene Potenz als Nebenallergen angesehen werden.

Daneben wurde bei Patienten in Spanien mit pollenunabhängiger Haselnussallergie Cor a 8, ein Lipidtransferprotein, als Allergen identifiziert [50]. Diese Studie zeigt auch die regionalen Unterschiede im Sensibilisierungsmuster. Wie in dieser Studie scheint Lipidtransferprotein für eine Mehrzahl der haselnussallergischen Patienten in

Spanien von Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu sind Patienten in Nordeuropa mit Haselnussallergie und Birkenpollenallergie viel häufiger auf das pollenassoziierte Cor a 1.04 sensibilisiert [80].

In dieser Arbeit werden auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu den Erdnussallergenen und ihrer klinischen Bedeutung die pollenunabhängigen Haselnussallergene Cor a 9 und Cor a 11 untersucht (s. Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4).

1.6.4 Sesam

Es sind verschiedene Allergene der Sesamsamen beschrieben worden [54] (s. Tabelle 1). Eins dieser Allergene ist ein 7kDa 2S Albuminvorläufer, der Ses i 2 genannt wird. Dieses Allergen ist identisch mit der großen Untereinheit eines ebenfalls beschriebenen 14kDa Sesamallergens [82]. Der Unterschied zwischen den beiden Proteinen beruht wahrscheinlich auf einer Abspaltung des 2S Albuminvorläuferproteins durch Peptidasen [83]. Auf dem 14kDa Protein wurden lineare B-Zell Epitope identifiziert, von denen drei immunodominant waren [84].

Daneben wurde ein weiteres 9kDa 2S Albumin als Hauptallergen von Sesamsamen beschrieben und als Ses i 1 bezeichnet [85]. Dieses Protein zeigt nur 36% identische und 46% homologe Aminosäuren mit Ses i 2.

Ses i 3, ein 7S Globulin, ist ein weiteres wichtiges Sesamallergen [54]. Dieses 45kDa Protein wird von 75% der sesamallergischen Patienten erkannt.

Daneben sind mit Ses i 6 und Ses i 7 auch 11S Globuline in Sesamsamen identifiziert [53].

Weitere als Hauptallergene von Sesam beschriebene Proteine sind Oleosine [86]. Sie wurden Ses i 4 und Ses i 5 genannt und könnten eine Rolle bei schwerer Anaphylaxie spielen.

1.7 Kreuzreaktivität

Zwei Allergene sind kreuzreaktiv, wenn es mindestens einen IgE-Antikörper gibt, der mit beiden Allergenen reagiert [87]. Bei der Kreuzreaktivität muss zwischen Kreuzsensibilisierung und klinisch relevanter Kreuzallergie unterschieden werden [88].

Die hohe Homologie in den Aminosäuresequenzen der Allergene von Erdnuss, Baumnüssen und Sesam könnte Ursache für die klinisch zu beobachtende Kreuzreaktivität von Erdnüssen und Baumnüssen sein (Tabelle 2- Tabelle 4; Abbildung 2- Abbildung 4). Auch experimentell konnte im Inhibitions-ELISA gezeigt werden, dass erdnuss-spezifische IgE-Antikörper mit Allergenen aus Baumnüssen kreuzreagieren [89]. Es konnte hier Kreuzreaktivität von Mandel, Paranuss und Haselnuss mit Erdnuss nachgewiesen werden. Ara h 1 und Jug r 2 zeigen dagegen keine signifikante IgE-Kreuzreaktivität in Inhibitionsimmunoblotting Experimenten, obwohl sie beide Viciline sind [77]. Allerdings wurde bei Präinkubation von Seren von zwei walnussallergischen Patienten mit rohem Erdnuss-Extrakt die IgE-Bindung an rohes Walnussextrakt stark vermindert, was für Kreuzreaktivität spricht. Außerdem wurde Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Baumnüssen von verschiedenen Autoren gezeigt [51, 90].

Es sind also auf der einen Seite kreuzreagierende IgE-Antikörper gegen Extrakte aus verschiedenen Nüssen nachgewiesen worden. Auf der anderen Seite sind wie oben beschrieben innerhalb der linearen Epitope einzelne Aminosäuren für die IgE-Bindung besonders wichtig. Daraus leitet sich die Frage nach der Bedeutung der Sequenzhomologie der linearen Epitope für klinische Kreuzreaktivität ab. Einige der beschriebenen Sequenzepitope der Erdnuss könnten homologe Entsprechungen haben, bei denen für die IgE-Bindung kritische Aminosäuren konserviert sind. Der klinisch zu beobachtende Unterschied von erdnussallergischen Patienten, die zum Teil baumnussallergisch und zum Teil baumnusstolerant sind, könnte sich auch in Unterschieden im Peptiderkennungsmuster reflektieren.

Da nicht sicher gesagt werden kann, dass es sich bei dem gemeinsamen Auftreten von Erdnuss- und Baumnuss-/Samenallergien um Kreuzreaktivität oder um polyvalente Sensibilisierung handelt, wird dies im Folgenden als „Co-Allergie“ bezeichnet.

1.8 Microarray

Bei der von uns verwendeten Methode handelt es sich um einen Peptidmicroarray. Die Microarray (MIA) Technologie wurde ursprünglich entwickelt, um die Expressionsmuster von zellulären Transkripten parallel zu beobachten [91]. Hierzu wurden DNA Microarrays benutzt.

Der erste Proteinmicroarray wurde 2000 von MacBeath et al. beschrieben [92]. Seither sind Proteinmicroarrays für verschiedene wissenschaftliche Anwendungen entwickelt worden. Auch für die Diagnose von Allergien oder Autoimmunerkrankungen können Microarrays benutzt werden [93, 94]. Bei der Produktion von Allergenmicroarrays werden aufgereinigte oder rekombinante Allergenkomponenten auf chemisch voraktivierte Glas-Objektträger gedruckt [95]. Volumen von einigen Nanolitern der Proteinlösung werden entweder in einer Kontakt- („pin-and-ring“ oder „split-pin“ Technologie) oder Nicht-Kontaktmethode (Piezo oder Kapillarmethode) aufgebracht. Wenn die Beschichtung des Glasplättchens und die Spotting-Verhältnisse ausreichend sind, bleibt eine ausreichende Menge des Proteins in biologisch aktiver Form und kann von Interaktionspartnern erkannt werden. Nicht mehr als einige hundert Picogramm von Protein bleiben kovalent auf der Oberfläche gebunden. Auf einem Standardobjektträger können bis 10000 Proteinspots aufgedruckt werden [95]. Bei der Beurteilung der Sensitivität der Microarrays muss beachtet werden, dass im Gegensatz zu etablierten Immunologischen Assay Methoden (ELISA, RAST) die Spotting Technologie es nicht erlaubt, Material im Überfluss im Verhältnis zu IgE aufzubringen. Als Folge der kleinen Spotgröße und der geringen Menge an immobilisiertem Antigen, fällt der Assay in die Kategorie der „ambient analyte assays“. Diese messen nicht die totale Konzentration des Analyten in der Probe, sondern nur die Analytkonzentration in der engen Umgebung des immobilisierten Zielmoleküls. Wenn allerdings der Scanner sensitiv genug ist, und die Oberfläche ein optimales Signal-noise ratio gibt, sind Detektionslimits und Linearität wie bei konventionellen Assays möglich [95].

2 Zusammenfassung und Herleitung der Fragestellung

Erdnussallergien und Nussallergien sind also häufige Nahrungsmittelallergien und klinisch besonders deshalb relevant, weil sie zu schweren anaphylaktischen Reaktionen führen können. Daneben wurde berichtet, dass ein Teil der erdnussallergischen Patienten auch auf Nüsse und Samen allergisch ist. Auf der anderen Seite stehen die diagnostischen Verfahren, die unbefriedigend sind. Einfach durchzuführende Methoden, die eine Sensibilisierung nachweisen, wie Hautpricktest und die Bestimmung des spezifischen IgE, können in vielen Fällen klinische Reaktivität nicht sicher vorhersagen. Besonders in der Vorhersage von Co-Allergien von Erdnüssen, Nüssen und Samen versagen diese Methoden. Die doppel-blinde, Placebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokation kann zwar Nahrungsmittelallergien sicher diagnostizieren oder ausschließen, dieses Verfahren ist allerdings aufwändig und beinhaltet das Risiko einer anaphylaktischen Reaktion. Deshalb ist es notwendig, neue diagnostische Verfahren für die Diagnose von Nussallergien zu entwickeln.

Die Allergene von Erdnuss, verschiedenen Nüssen und Samen sind bekannt. Die meisten dieser Proteine gehören zur Gruppe der Samenspeicherproteine, wie die 7S Globuline (Viciline), die 2S Albumine und die 11S Globuline (Legumine). Obwohl Erdnüsse, Baumnüsse und Samen wie Sesam zu taxonomisch unterschiedlichen Pflanzengruppen gehören, zeigen ihre Samenspeicherproteine einen hohen Grad an Homologie in ihren Aminosäuresequenzen. Dies könnte ein Grund für die hohe Rate an Co-Allergien gegen Erdnüsse, Nüsse und Samen sein, die klinisch beobachtet werden können. Es konnten auch kreuzreagierende Antikörper gegen Extrakte aus Baumnüssen und Erdnuss nachgewiesen werden. Es liegen dagegen keine Untersuchungen zu kreuzreagierenden Antikörpern an linearen Epitopen vor.

Auf der anderen Seite konnte die Bedeutung von linearen Epitopen bei Nahrungsmittelallergien in verschiedenen Studien gezeigt werden. So ließen sich unterschiedliche Muster im Erkennen von Sequenzepitopen mit klinischer Reaktivität korrelieren. Es konnten Unterschiede im Erkennen von Sequenzepitopen zwischen Patienten unterschiedlicher klinischer Reaktivität auf Erdnuss festgestellt werden

[60]. Daneben fanden sich Unterschiede in der Peptiderkennung zwischen Patienten mit transienter und solchen mit persistierender Kuhmilchallergie [63, 96].

Aus der klinisch zu beobachtenden Co-Allergie auf Erdnüsse, Nüsse und Samen auf der einen Seite und der möglichen Bedeutung von Sequenzepitopen in der Vorhersage klinischer Reaktivität auf der anderen Seite lässt sich die Frage ableiten, ob die IgE-Bindung an lineare Epitope der Allergene von Erdnuss, Nüssen und Samen eine solche Co-Allergie vorhersagen kann. Wichtig dabei scheint zu sein, dass trotz Austausch einzelner bestimmter Aminosäuren innerhalb der linearen Peptide der Erdnussallergene die IgE-Bindung erhalten bleiben kann. Das heisst, dass möglicherweise die Ähnlichkeit von Erdnuss-, Nuss- und Samenepitopen dazu führt, dass einige erdnusspeptidspezifische Antikörper mit korrespondierenden Nuss- und Samensequenzen kreuzreagieren.

Für die Untersuchung der Co-Allergien gegen Erdnuss, Nüsse und Samen sollten folgenden Hypothesen untersucht werden:

1. Erdnussallergische Patienten sind häufig auch gegen Baumnüsse und Samen allergisch.
2. Nuss- und samenallergische Erdnussallergiker unterscheiden sich von nuss- und samentoleranten Erdnussallergikern, indem sie unterschiedliche lineare Epitope von Erdnuss- und Nuss-/Samenallergenen erkennen.
3. Es lassen sich peptidspezifische Antikörper gegen Erdnussallergene nachweisen, die mit Nuss-/Samensequenzen kreuzreagieren.

Die Häufigkeit von Co-Allergien gegen Erdnuss, Nüsse und Samen im Patientenkollektiv der Kinderklinik der Charité sollte mit Hilfe eines Fragebogens untersucht werden. Erdnussallergische Patienten mit klinischer Reaktion auf Nüsse und Samen und solche mit sicherer Toleranz gegen Nüsse und Samen sollten dann in einem Peptidmicroarray untersucht werden. Daneben wurden Patienten aus den USA untersucht, die parallel zu unserer Studie mit dem gleichen Fragebogen identifiziert wurden.

Mit Hilfe der Peptidmicroarrays sollte herausgefunden werden, ob die IgE-Bindung an lineare Epitope der Allergene von Erdnuss, verschiedenen Nüssen und Samen

klinische Co-Allergien von Erdnuss, Nüssen und Samen vorhersagen kann. Langfristiges Ziel war es, den Patienten dadurch sinnvolle Diättempfehlungen ohne belastende Nahrungsmittelprovokation zu ermöglichen. Im Peptidmicroarray sollten dazu Sequenzepitope von Erdnuss, Walnuss, Haselnuss und Sesam durch Inkubation mit Seren von Patienten mit unterschiedlicher klinischer Konstellation von Erdnuss- und Baumnussallergien auf IgE-Bindung untersucht werden. Grundlage waren die bekannten linearen IgE-Bindungsepitope der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 und die dazu korrespondierenden Sequenzen der Baumnüsse und Sesam. Diese wurden in 15 Aminosäuren langen überlappenden Peptiden synthetisiert und auf vorbehandelte Objektträger gedruckt. Die IgE-Bindung an die untersuchten linearen Peptide wurde mit der Anamnese zu klinischer Reaktivität der Patienten korreliert. Mit diesem Vorgehen sollten Epitope identifiziert werden, die eine Diskrimination zwischen Patienten mit Erdnussallergie und zusätzlicher Nuss-/Sesamallergie und solchen ohne Nuss-/Sesamallergie zulassen.

Auf Grund des klinisch zu beobachtenden häufigen gleichzeitigen Auftretens von Erdnussallergie mit einer Nuss- oder Sesamallergie erwarteten wir, dass sich in der Peptidbindung Hinweise auf Kreuzreaktivität fanden. Dies konnte der gleichzeitige Nachweis von IgE-Bindung an ähnlichen Peptidsequenzen von Erdnuss und einer Baumnuss/Sesam sein. Die mögliche Kreuzreaktivität sollte im Anschluss durch Inhibitionsversuche mit ähnlichen Sequenzen überprüft werden. Dabei sollte versucht werden, kreuzreagierende peptidspezifische Antikörper nachzuweisen.

Ziel war es weiterhin, im Rahmen dieser Arbeit, die Peptidmicroarraymethode zu etablieren und zu überprüfen. Es sollte ein Standardprotokoll erarbeitet werden, das reproduzierbare Fluoreszenzwerte bei einem günstigen Signal-Hintergrundverhältnis lieferte. Daneben sollten Hinweise auf Spezifität der Peptidbindung gesammelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Es wurde ein Fragebogen mit Fragen zu allergischer Anamnese von Kindern erstellt. Darin wurden allergische Reaktion oder Toleranz der Kinder auf Erdnuss, Haselnuss, Walnuss, Sesam, Cashewnuss, Paranuss, Mandel, Pekannuss, Pistazie, Pinienkerne und Mohnsamen systematisch erfasst. Es wurden Anzahl der Reaktionen und klinische Symptome sowie Behandlung der Reaktionen abgefragt. Daneben erfolgte eine Anamnese zu anderen allergischen Erkrankungen und Exposition gegenüber den möglichen Allergenen.

Die Fragebögen wurden an die Eltern von Kindern (n=286) gesendet, deren spezifisches IgE auf Erdnuss oder Baumnüsse in der Zeit von Anfang 2005 bis 04/2007 im Labor der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie bestimmt worden war. Auf diese Weise wurden Kinder mit überzeugender Anamnese zu systemischen Reaktionen auf Erdnuss und Reaktion oder Toleranz auf Baumnüsse/ Sesam für die Microarray Studie identifiziert. Von 10 Kindern war parallel Serum vorhanden.

Daneben wurden für die Microarrays Seren von Patienten des Department of Pediatric der Mount Sinai School of Medicine, New York verwendet, die parallel zu unseren Patienten mit dem gleichen Fragebogen rekrutiert worden waren. Es wurden wie bei den Patienten aus Berlin solche mit eindeutiger Anamnese von systemischen Reaktionen auf Erdnüsse und Reaktion oder Toleranz auf Walnuss, Haselnuss und Sesam ausgewählt (n=58). Alle Patienten hatten detaillierte Angaben zu den allergischen Reaktionen.

Des Weiteren wurden Seren von atopischen (n=5) und nicht-atopischen (n=6) Negativkontrollen untersucht. Die atopischen Negativkontrollen hatten Reaktionen auf Milch, Ei und Schalentiere.

Über die Rekrutierung von geeigneten Patienten mit Hilfe des Fragebogens lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité bzw. der Mount Sinai School of

Medicine vor. Die Verwendung der Fragebögen und der Seren erfolgte mit schriftlicher Einwilligung der Eltern der Kinder.

3.2 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Anti-IgE und Anti-IgG4 Antikörper

Anti-IgE und Anti-IgG4 monoklonale murine IgG-Antikörper (beide BD Pharmingen, San Jose, Ca, USA) wurden kovalent mit Fluoreszenzmarkern konjugiert.

Die Antikörper wurden dazu zunächst im Centricon Concentrator (Millipore, Billerica, Mass, USA) konzentriert. Die Antikörper wurden dabei jeweils für 1h bei 1000g bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt, die >2mg/ml sein sollte (Pierce Coomassie Protein Assay, Pierce, Rockford, Il, USA).

Die Konjugate wurden durch Reaktion der Antikörper mit aktivierten N-Hydroxysuccinimidyl-Ester Fluorochromen nach dem Protokoll des Herstellers (Molecular Probes, Eugene, Or, USA) synthetisiert. Anti-IgE-Antikörper wurde mit AlexaFluor 546 und Anti-IgG4 Antikörper mit AlexaFluor 647 konjugiert. Die Konjugate wurden in Bio-Spin 30 Säulen (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) aufgereinigt. Die Antikörper mit Alexa Fluorochrom wurden dazu in den Bio-Spin Säulen für 4min bei 1000g zentrifugiert. Mit diesem Verfahren wurde ungebundenes überschüssiges Alexa entfernt. Die gereinigten konjugierten Antikörper wurden vor Licht geschützt bei 4°C gelagert.

In gleicher Weise wurden auch Konjugate mit Bovine Serum Albumin (BSA, 96%, Sigma Aldrich, St. Louis, Miss, USA) hergestellt. Diese wurden für die Markierung der Position der Arrays auf den Objektträgern gebraucht.

Das molare Verhältnis von Fluorochrom zu Antikörper bzw. BSA wurde berechnet. Es lag für die einzelnen Konjugate zwischen 5 und 12mol Farbstoff pro Mol Protein.

3.3 Herstellung der Peptidslides

3.3.1 Peptide

3.3.1.1 Mimotopes Peptide

In einer ersten Versuchsreihe wurden 11S Globuline untersucht. Dazu wurden die Sequenzen der Allergene von Erdnuss (Ara h 3, NCBI accesssion no. AAM46958),

von Cashew (Ana o 2, AAN76862), von Sesam (Ses i 6, AAD42944), von Paranuss (Ber e 2, AAO38859) und von Haselnuss (Cor a 9, AAL73404) benutzt. Die ganze Primärsequenz der 11 S Globuline wurde in Peptiden von 20 Aminosäuren Länge synthetisiert, wobei sich die Peptide jeweils um 16 Aminosäuren überlappten. Jedes neue Peptid war also um 4 Aminosäuren zum vorhergehenden verschoben. Es ergaben sich 122 Peptide für Jug r 4, 110 für das 11 S Sesamprotein, 112 für Ber e 2, 124 für Cor a 9, 110 für Ana o 2 und 76 für Ara h 3. Von Ara h 3 wurde nur die saure Untereinheit des Proteins synthetisiert. Die Peptide wurden als Cleaved PepSets (Mimotopes Pty Ltd, Clayton Victoria, Australia) hergestellt. Die gefriergetrockneten Peptide wurden in einer Lösung mit 40% DMSO (Dimethylsulfoxide minimum 99,5% GC, plant cell culture tested, Sigma Aldrich, St. Louis, Miss, USA, verdünnt mit Aqua dest.) und 25% Acetonitril (Acetonitril HPLC Grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA 1:1 verdünnt mit Aqua dest.) in einem Endvolumen von 400µl resuspendiert. Für den Druck wurden die gelösten Proteine, die in einer berechneten Konzentration von 2750µmol/l vorlagen 1:18 mit Protein Printing Buffer (ArrayIt Protein Printing Buffer, TeleChem, Sunnyvale, Ca, USA) auf ca. 150µmol/l verdünnt. Die verdünnten Peptide für den Druck wurden in 384-well Polypropylen-Platten (Matrix Technologies, Hudson, NH, USA) bei -80°C gelagert.

3.3.1.2 JPT Peptide

Auf Grund der geringen Stabilität der Mimotopes Peptide wurde für diese Arbeit eine zweite Versuchsreihe mit PepStar Peptiden von JPT (JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) durchgeführt. Die im Ergebnisteil dargestellten Ergebnisse wurden mit dieser Methode erzielt.

Dazu wurden Peptide der in Tabelle 1 dargestellten Samenspeicherproteine synthetisiert. Zu jedem Erdnusspeptid wurden dabei genau die homologen Peptide der anderen Allergene synthetisiert.

Es wurden allerdings nicht die gesamten Sequenzen der dargestellten Samenspeicherproteine untersucht, sondern nur Regionen mit vorbeschriebenen linearen Epitopen (s. Abbildungen 2-7).

Dazu wurden die Regionen der vorbeschriebenen Epitope der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 als 15 Aminosäuren lange überlappende Peptide synthetisiert [46, 48, 59, 97]. Daneben wurde die Region untersucht, in der ein B-Zellepitop von Ses i 2 vorbeschrieben war [84]. Die Allergene von Erdnuss,

Baumnüssen und Sesam wurden mit Vector NTI Software (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) so ausgerichtet, dass homologe Aminosäuren untereinander lagen. Die untersuchten Regionen wurden definiert, indem das jeweils erste Peptid einer Epitopregion drei Aminosäuren vor Anfang des vorbeschriebenen linearen Epitops begann. Das letzte Peptid einer Region endete drei Aminosäuren nach Ende des vorbeschriebenen Epitops. Innerhalb einer zusammenhängenden Region mit mehreren linearen Epitopen wurden die 15 Aminosäuren langen Peptide mit Überlappung von 10 Aminosäuren hergestellt. Die zu den Erdnusspeptiden korrespondierenden Baumnuss- und Sesampeptide begannen jeweils an der ersten homologen Aminosäure. Die gesamte basische Untereinheit von Ara h 3 und der korrespondierenden 11S Globuline wurde mit einem Offset von 10 Aminosäuren hergestellt. Insgesamt wurden 344 Peptide von JPT synthetisiert. Pro Peptid lag ein Volumen von 25µl vor. Die Peptidmenge war pro Peptid nach Herstellerangaben >50nmol. Die Peptide wurden bei -80°C gelagert.

2S Albumine

		1		70
Ara h 2	(1)	---	MAKLTILVALALFLLAAH ASARQQWELQGD RRCSQ LERANLRPCEQHLMQKIQ RD EDSYERDPYSP	
Jug r 1	(1)	-----	AALLVALLFVANAAAFRTTITIMEIDEDIDNPFRRGEGCREQIQRQQNLNHCQYYLRQ-QSR	
Ses i 2	(1)	---	MARFTIVLAVLFAALVLSASAHKTVVTTTVAEEGE--EENQRGCEWES SRQCQ-MRHCMQW MRSMRGQ	
Ses i 1	(1)		MAKKLALAAVLLVAMVALASATTYTTTVTTTAIDDEAN--QSSQQCRQQLQGRQ-FRSCQRYLSQGRSP	
<hr/>				
		71		140
Ara h 2	(68)		SQDPYS-PSPYDRR GAGSSQHQRCC NELNEFENNQR CM CEALQQIMENQ SDRLQGRQ-QEQQFKRELRN	
Jug r 1	(62)	SGG-----	YEDNQR--QHFRQCCQQLSQMD--EQCQCEGLRQVVRQQQQ QLRGEEMEMV QSARD	
Ses i 2	(65)	YEEs---	FLRS AEANQGF EH FR EC CNEL RDVK--SHCRCEALRCMMRQMQQEYGM EQ-EMQQMQMMQY	
Ses i 1	(67)	YGG	EEDEVLEMSTGNQSQSLRDCCQQLRNVD--ERCRCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQRARD	
<hr/>				
		141		161
Ara h 2	(136)		LPQQCGLRAP QRCDLDV ESGG	
Jug r 1	(121)		LPNECGIS-SQRCEIRRSWF-	
Ses i 2	(129)		LPRMCGMSYPTECRMRIFA-	
Ses i 1	(135)		LPRRCNMF-PQQCQFRVIFV-	

Abbildung 2: 2S Albumine von Erdnuss (Ara h 2), Walnuss (Jug r 1), Sesam (Ses i 2 und Ses i 1). Fettgedruckt sind vorbeschriebene Epitope [46, 76, 84, 97]. In unserer Studie untersuchte Regionen sind schwarz umrandet.

2S Albumine

ALVSASAHKTVVTTTS	Ses I 2.001	RSAEANQGQFEHFRE	Ses I 2.013
LAAHASARQQWELQG	Ara h 2.001	EMSTGNQQSEQSLRD	Ses I 1.013
VANAAAFRTTITTTME	Jug r 1.001	GAGSSQHQRCCNEL	Ara h 2.014
LASATTYTTTTVTTTA	Ses I 1.001	NQRQHFRQCCQQLSQ	Jug r 1.014
SARQQWELQGDRRRCQ	Ara h 2.002	NQGQFEHFRECCNEL	Ses I 2.014
AFRTTITTTMEIDEDI	Jug r 1.002	NQQSEQSLRDCCQQL	Ses I 1.014
SAHKTVVTTTSVAEEG	Ses I 2.002	QHQRCCNELNEFEN	Ara h 2.015
TYTTTTVTTTAIDDEA	Ses I 1.002	QHFRQCCQQLSQMDE	Jug r 1.015
WELQGDRRRCQSQLER	Ara h 2.003	EHFRECCNELRDVKS	Ses I 2.015
ITTTMEIDEDIDNPRR	Jug r 1.003	QSLRDCCQQLRNVD	Ses I 1.015
VVTTTSVAEEGEEENQ	Ses I 2.003	ERCCNELNEFENNQR	Ara h 2.016
VTTTAIDDEANQQSQ	Ses I 1.003	RQCCQQLSQMDEQCC	Jug r 1.016
DRRCQSQLERANLRP	Ara h 2.004	RECCNELRDVKSCHR	Ses I 2.016
IDEDIDNPRRRGEGC	Jug r 1.004	RDCCQQLRNVDRCR	Ses I 1.016
VAEEGEEENQRGCEW	Ses I 2.004	EALQQIMENQSDRLQ	Ara h 2.017
IDDEANQQSQQCRCRQ	Ses I 1.004	EGLRQVRRRQQQQG	Jug r 1.017
SQLERANLRPCEQHL	Ara h 2.005	EALRCMMRQMQQEYG	Ses I 2.017
DNPRRRGEGCREQIQ	Jug r 1.005	EAIRQAVRQQQEGG	Ses I 1.017
EEENQRGCEWESRQC	Ses I 2.005	IMENQSDRLQGRQOE	Ara h 2.018
NQQSQQCRCRQLQGRQ	Ses I 1.005	VVRRRQQQQGLRGEE	Jug r 1.018
ANLRPCEQHLMQKIQ	Ara h 2.006	MMRQMQQEYGMQEM	Ses I 2.018
RGEGCREQIQRQONL	Jug r 1.006	AVRQQQQEGGYQEGQ	Ses I 1.018
NQRGCEWESRQCQMR	Ses I 2.006	SDRLQGRQOEQQFKR	Ara h 2.019
QSQQCRQQLQGRQFR	Ses I 1.006	QQQQGLRGEEEMEMV	Jug r 1.019
CEQHLMQKIQRDEDS	Ara h 2.007	QQEYGMQEMQQMQQ	Ses I 2.019
REQIQRQONLNHCQY	Jug r 1.007	QQEGGYQEGSQQVY	Ses I 1.019
EWESRQCQMRHCMQW	Ses I 2.007	GRQQEQQFKRELRLNL	Ara h 2.020
RQQLQGRQFRSCQRY	Ses I 1.007	LRGEEEMEMVQSARD	Jug r 1.020
MQKIQRDEDSYERDP	Ara h 2.008	MEQEMQQMOMMYL	Ses I 2.020
RQONLNHCQYYLRQQ	Jug r 1.008	YQEGSQQVYQRARD	Ses I 1.020
QCQMRHCMQWMRSMR	Ses I 2.008	QQFKRELRLNLPQCCG	Ara h 2.021
GRQFRSCQRYLSQGR	Ses I 1.008	EEMVQSARDLPNECG	Jug r 1.021
RDEDSYERDPYSPSQ	Ara h 2.009	QQMQQMMQYLPRMCG	Ses I 2.021
NHCQYYLRQQSRSGG	Jug r 1.009	QQVYQRARDLPRRCN	Ses I 1.021
RHCMQWMRSMRGQYE	Ses I 2.009	LRAPQRCDLDVESGG	Ara h 2.022
RSCQRYLSQGRSPYG	Ses I 1.009	CGISSQRCEIRRSWF	Jug r 1.022
YERDPYSPSQDPYSP	Ara h 2.010	GMSYPTECRMRIPIFA	Ses I 2.022
YLRQQSRSGGYDEDN	Jug r 1.010	CNMRPQQCQFRVIFV	Ses I 1.022
WMRSMRGQYEEESFLR	Ses I 2.010		
YLSQGRSPYGGEEDE	Ses I 1.010		
YSPSQDPYSPSPYDR	Ara h 2.011		
QSRSGGYDEDNQRQH	Jug r 1.011		
RGQYEEESFLRSAEAN	Ses I 2.011		
RSPYGGEEDEVLEMS	Ses I 1.011		
DPYSPSPYDRRGAGS	Ara h 2.012		
ESFLRSAEANQGQFE	Ses I 2.012		
GEEDEVLEMSTGNQQ	Ses I 1.012		
PYDRRGAGSSQHQR	Ara h 2.013		

Abbildung 5: Verwendete Peptide der 2S Albumine

7S Globuline

ATHAKSSPYQKKTEN	Ara h 1.001	PVSTPGFELFFGAG	Ses l 3.015	SNQNLQVLCFEVNAV	Ses l 3.027
DEENPRDPREQYRQC	Jug r 2.001	PVSAPGHFEAFYGAG	Cor a 11.015	QNNNLQVLCFEVNAH	Cor a 11.027
VASESKDPELKQCKH	Ses l 3.001	DQSSYLQGFSRNTLE	Ara h 1.016	ENNHRIFLAGDKDNV	Ara h 1.028
MLPKEDPELKKCKHK	Cor a 11.001	PDQSYLRVFSNDILV	Jug r 2.016	ENNQRDFLAGQNNII	Jug r 2.028
SCQQEPDDLKQKACE	Ara h 1.002	NPESFFKFSFSEILE	Ses l 3.016	NNNEKFPLAGRRNVM	Ses l 3.028
QRQQQQCQIRCEERL	Jug r 2.002	DPESFYRAFSWEVLE	Cor a 11.016	HGNSRFPLAGKGNIV	Cor a 11.028
SKEQKEACIQACKKEY	Ses l 3.002	EAAFNAEFNEIRRVL	Ara h 1.017	IFLAGDKDNVIDQIE	Ara h 1.029
CTKLEYDPRCVYDPR	Ara h 1.003	VAALNTPRDRLERFF	Jug r 2.017	DFLAGQNNIIINQLER	Jug r 2.029
LEEDQRSQEERERRR	Jug r 2.003	EAAFNTRRDLRQRI	Ses l 3.017	FPLAGRRVMNQLER	Ses l 3.029
IRQKHQGEHGRGGGD	Ses l 3.003	EAALKVRREOLEKVF	Cor a 11.017	FPLAGKGNIVNEFER	Cor a 11.029
SPPGERTRGRQPGDY	Ara h 1.004	AGGEQEERGQRWST	Ara h 1.018	DKDNVIDQIEKQAKD	Ara h 1.030
RDPEQRYEQCQQQCE	Jug r 2.004	SENNEGVIVKSKEH	Ara h 1.019	GQNNIIINQLEREAKE	Jug r 2.030
KSPIERLRECSRGE	Ses l 3.004	QEOREGVIIRASQEK	Jug r 2.019	GRRNVMNQLEREAKE	Ses l 3.030
RTRGRQPGDYDDDRR	Ara h 1.005	GQQRQGVIVKASEEQ	Ses l 3.019	GKGNIVNEFERDAKE	Cor a 11.030
RYEQCQQQCERQRRG	Jug r 2.005	GEQSKGSIVKASREK	Cor a 11.019	IDQIEKQAKDLAFPG	Ara h 1.031
RLRECSRGEQHQHGE	Ses l 3.005	GVIVKVSKEHVEELT	Ara h 1.020	INQLEREAKELSFNM	Jug r 2.031
QPGDYDDRRQPRRE	Ara h 1.006	GVIIRASQEKLRALS	Jug r 2.020	MNQLEREAKELAFGM	Ses l 3.031
CRRRCEQRRQOEERE	Jug r 2.006	GVIVKASEEQVRAMS	Ses l 3.020	VNEFERDAKELAFNL	Cor a 11.031
CLRRCEQEEYQREKGR	Ses l 3.006	GSIVKASREKIRALS	Cor a 11.020	KQAKDLAFPGSGEQV	Ara h 1.032
CERQRRQEQOTLCRR	Jug r 2.007	VSKEHVEELTKHAKS	Ara h 1.021	REAKELSFNMPREEI	Jug r 2.032
CEQQHGEQREECLRR	Ses l 3.007	ASQEKLRALSQHAMS	Jug r 2.021	REAKELAFGMPAREV	Ses l 3.032
DDDRRQPRREEGGRW	Ara h 1.008	ASEEQVRAMSRHEEG	Ses l 3.021	RDAKELAFNLPSREV	Cor a 11.032
EQRQOEERERQRGR	Jug r 2.008	ASREKIRALSQHEEG	Cor a 11.021	KNQKESHFVSARPOS	Ara h 1.033
CQEEYQREKGRQDDD	Ses l 3.008	VEELTKHAKSVSKKG	Ara h 1.022	ESQMESYFVPTERQS	Jug r 2.033
QPRREEGGRWGPAGP	Ara h 1.009	LRALSQHAMSAGQRP	Jug r 2.022	RSQQEEFFFKGPROQ	Ses l 3.033
QEERERQRGRDRQDP	Jug r 2.009	VRAMSRHEEGGIWPF	Ses l 3.022	KNQDQAFFFPGNKQ	Cor a 11.033
QREKGRQDDNPTDP	Ses l 3.009	IRALSQHEEGPPRIW	Cor a 11.022	PSSPEKESPEKEDQE	Ara h 1.034
PREREREEDWRQPRE	Ara h 1.010	EEGDITNPINLREGE	Ara h 1.023		
RCQIQEQSPERQRC	Jug r 2.010	GRRSSGGPISLKSES	Jug r 2.023		
QCRRQEGGGFSREH	Ses l 3.010	GGESKGTINIYQORP	Ses l 3.023		
REEDWRQPREDRWRP	Ara h 1.011	GGESSGPINLLHKHP	Cor a 11.023		
EQSPERQRCQQRCE	Jug r 2.011	DLSNNGKLFVVKPD	Ara h 1.024		
GEGGGFSREHCERRR	Ses l 3.011	SYSNQFGQFFACPE	Jug r 2.024		
RQPREDRWRPSSHQQP	Ara h 1.012	THSNQYQLHEVDAS	Ses l 3.024		
RQRQCQRCERQYKE	Jug r 2.012	SQSNQFGRLYEHPD	Cor a 11.024		
FSREHCERRREEKYR	Ses l 3.012	VNKGTGNLELVAVRK	Ara h 1.025		
DWRPSSHQQPRKIRP	Ara h 1.013	VVEGTGRYEMACPHV	Jug r 2.025		
CQRCERQYKEQQGR	Jug r 2.013	VVDGEGYFEMACPHM	Ses l 3.025		
CERRREEKYREQQGR	Ses l 3.013	VVEGEGFFEMACPHL	Cor a 11.025		
GKQICEEKARERQQE	Cor a 11.013	REVRRYTARLKEGDV	Ara h 1.026		
SHQQPRKIRPEGREG	Ara h 1.014	GRFQKVTARLARGDI	Jug r 2.026		
ERQYKEQQGRERGPE	Jug r 2.014	PSYQRVASRLTRGTV	Ses l 3.026		
EEKYREQQGREGGRG	Ses l 3.014	GSYQKISARLRRGVV	Cor a 11.026		
EEKARERQQEENSS	Cor a 11.014	ASSELHLLGFGINAE	Ara h 1.027		
PVNTPGQFEDFFPAS	Ara h 1.015	QENLRLLLGFDINGE	Jug r 2.027		
PVNNPGQFREYYAAG	Jug r 2.015				

Abbildung 6: Verwendete Peptide der 7S Globuline.

11S Globuline

GGYIETWNPNNQEF E Ara h 3.001
 AGVIESWDPNNQQFQ Jug r 4.001
 GGTELWDERQE QFQ Ses l 6.001
 AGLTEFWDRNNQQFE Ses l 7.001
 ACQIESWDHNDQQFQ Cor a 9.001
 TWPNNQEFECAGVA Ara h 3.002
 SWDPNNQQFQCAGVA Jug r 4.002
 LWDERQE QFQCAGIV Ses l 6.002
 FWDRNNQQFECAGVA Ses l 7.002
 SWDHNDQQFQCAGVA Cor a 9.002
 NEGGNIFSGFTPEFL Ara h 3.003
 GLGNVVFSGFDADFL Jug r 4.003
 QTFHNIFRAFDAELL Ses l 6.003
 GETKNIFNGFDDEIL Ses l 7.003
 GEGNVVFSGFDAEFL Cor a 9.003
 IFSGFTPEFLEQAFQ Ara h 3.004
 VFSGFADFLADAFN Jug r 4.004
 IFRAFDAELLSEAFN Ses l 6.004
 IFNGFDDEILADAFG Ses l 7.004
 VFSGFDAEFLADAFN Cor a 9.004
 TPEFLEQAFQVDDRQ Ara h 3.005
 DADFLADAFNVDTET Jug r 4.005
 DAELLSEAFNPQET Ses l 6.005
 DDEILADAFGVDVQT Ses l 7.005
 DAEFLADAFNVVDVT Cor a 9.005
 GAIVTVRGLRILSP Ara h 3.006
 RSIVRVEGRQLQVIR Jug r 4.006
 GLIVMARERMTFVRP Ses l 6.006
 GRIVRAERLDIVLPG Ses l 7.006
 RNIVKVEGRQLQVVRP Cor a 9.006
 VRGGLRILSPDRKRR Ara h 3.007
 VEGRQLQVIRPRWSR Jug r 4.007
 ARERMTFVRPDEEEG Ses l 6.007
 AERLDIVLPGEEEE Ses l 7.007
 VEGRLQVVRPERSRQ Cor a 9.007
 EYDEDEYDEEDR Ara h 3.008
 RKERERERESEERR Jug r 4.008
 TFVRPDEEEGEQEHR Ses l 6.008
 DIVLPGEEEEERWER Ses l 7.008
 RQERESEQERERQRR Cor a 9.008
 DEYDEDEEDRRRGRG Ara h 3.009
 RERESEERRQSRRG Jug r 4.009
 DEEEGEQEHRGRQLD Ses l 6.009
 GEEEEERWERDPYSG Ses l 7.009
 SEQERERQRRQGGRG Cor a 9.009
 GIETICTASAKKNI Ara h 3.010
 GLEETICTLRLRENI Jug r 4.010
 GLEETICTMKFRNTV Ses l 6.010

GLEETLCTAKLRENL Ses l 7.010
 GFEETICSLRLRENI Cor a 9.010
 AKKNIGRNRSPDIYN Ara h 3.011
 LRENIGDPSRADIYT Jug r 4.011
 FRTNVESRREADIFS Ses l 6.011
 LRENLEDEPARADVYN Ses l 7.011
 LRENICTRSRADIYT Cor a 9.011
 PDIYNPQAGSLKTAN Ara h 3.012
 ADIYTEEAGRISTVN Jug r 4.012
 ADIFSRQAGRHHVVD Ses l 6.012
 ADVYNPHGGRISLNL Ses l 7.012
 ADIYTEQVGRINTVN Cor a 9.012
 LKTANDLNLILRLWL Ara h 3.013
 ISTVNSHTLPVLRWL Jug r 4.013
 VHVVDNRKLPILKYM Ses l 6.013
 ISSLSLTLPLVLSWL Ses l 7.013
 INTVNSNTLPVLRWL Cor a 9.013
 ILRWLGPSAEYGNLY Ara h 3.014
 VLRWLQLSAERGALY Jug r 4.014
 ILKYMDSLAEKGNLY Ses l 6.014
 VLSWLRLSAEKGVLY Ses l 7.014
 VLRWLQLSAERGDLQ Cor a 9.014
 YGNLYRNALFVAHYN Ara h 3.015
 RGALYSDALYVPHWN Jug r 4.015
 KGNLYSNALVSPDWS Ses l 6.015
 KGVLYRNGLVAPHWN Ses l 7.015
 RGDQLQREGLYVPHWN Cor a 9.015
 VAHYNTNAHSIIYRL Ara h 3.016
 VPHWNLNAHSVVYAL Jug r 4.016
 SPDWSMTGHTIVYVT Ses l 6.016
 APHWNLNAHSIIYIT Ses l 7.016
 VPHWNLNAHSVVYAI Cor a 9.016
 I IYRLRGRAHVQVVD Ara h 3.017
 VVYALRGRAEVQVVD Jug r 4.017
 IVYVTRGDAQVQVVD Ses l 6.017
 I IYITRGSGRFQVVG Ses l 7.017
 VVYAIRGRARVQVVD Cor a 9.017
 VQVVDNSGNRVYDEE Ara h 3.018
 VQVVDNFGQTVFDDE Jug r 4.018
 VQVVDHNGQALMNRD Ses l 6.018
 FQVVGHTGRSVFDGV Ses l 7.018
 VQVVDNNGNTVFDDE Cor a 9.018
 VYDEELQEGHVLVVP Ara h 3.019
 VFDDELREGQLLTIP Jug r 4.019
 LMNDRVNQEMFVVP Ses l 6.019

VFDGVVREGQLIIVP Ses l 7.019
 VFDDELROGGVLTIP Cor a 9.019
 VLVPQNFVAVAKSQ Ara h 3.020
 LLTIPQNFVAVKRAR Jug r 4.020
 MFVVPQYYTSTARAG Ses l 6.020
 LIIVPQNYVAVAKRAS Ses l 7.020
 VLTIPQNFVAVAKRAE Cor a 9.020
 AGKSQSENFYVAFK Ara h 3.021
 VKRARNEGFEWVSFK Jug r 4.021
 TARAGNNGFEWVAFK Ses l 6.021
 AKRASQDEGLEWISF Ses l 7.021
 AKRAESEGFVAVAFK Cor a 9.021
 YVAFKTDSPRSIANL Ara h 3.022
 WVSFKTNENAMVSPL Jug r 4.022
 WVAFKTTGSPMRSPL Ses l 6.022
 WISFKTNDNAMTSQL Ses l 7.022
 WVAFKTNDAQISPL Cor a 9.022
 SIANLAGENSVIDNL Ara h 3.023
 MVSPLAGRTSAIRAL Jug r 4.023
 MRSPLAGYTSVIRAM Ses l 6.023
 MTSQLAGRLSAIRAM Ses l 7.023
 QISPLAGRTSAIRAL Cor a 9.023
 VIDNLPEEVVANSYG Ara h 3.024
 AIRALPEEVLATAFQ Jug r 4.024
 VIRAMPLQVITNSYQ Ses l 6.024
 AIRAMPEEVMTAYQ Ses l 7.024
 AIRALPDDVLANAFQ Cor a 9.024
 ANSYGLQREQARQLK Ara h 3.025
 ATAFQIPREDARRLK Jug r 4.025
 TNSYQISPNAQALK Ses l 6.025
 MTAYQVSRDEARRLK Ses l 7.025
 ANAFQISREEARRLK Cor a 9.025
 ARQLKNNNPFKFFVP Ara h 3.026
 ARRLKFNRESTLVR Jug r 4.026
 AQALKMNRGSQSFLS Ses l 6.026
 ARRLKYNREESRVFS Ses l 7.026
 ARRLKYNRQETTLVR Cor a 9.026
 KFFVPPSQSPRAVA Ara h 3.027
 STLVRSPRSRSSSR Jug r 4.027
 RGSQSFLSPGGRRS Ses l 6.027
 SRVFSSTSRYSWPRS Ses l 7.027
 TTLVRSSRSSSERKR Cor a 9.027
 PSRSRSSRSERRAEV Jug r 4.028
 SWPRSSRPMSYMPKP Ses l 7.029
 SERKRRSESEGRAEA Cor a 9.029
 PKPFYVLDVIKSMMS Ses l 7.030

Abbildung 7: Verwendete Peptide der 11S Globuline.

Für den Druck wurden aus der 384 well Platte mit 25µl Tochterplatten mit 5µl Peptid hergestellt. Diese wurden 1:3 mit Protein Printing Buffer (ArrayIt Microarray Protein Printing Buffer, Telechem, Sunnyvale, Ca, USA) verdünnt. Die errechnete Peptidkonzentration lag für den Druck damit bei etwa 0,67µmol/ml.

3.3.2 Druck der Arrays

Die Peptide wurden auf vorbehandelte Glasobjektträger gedruckt. Der Druck erfolgte mit einem NanoPrint LM60 Microarrayer (Telechem, Sunnyvale, Ca, USA).

Gedruckt wurde mit acht SMP 3B Microspotting Pins (Telechem, Sunnyvale, Ca, USA). Diese gehören zur Kategorie der „Split-pins“ (s. Abbildung 8).



Abbildung 8: Grafische Darstellung einer Split-pin-Druckernadel. Grafik in Anlehnung an: ArrayIt.com, Telechem, Sunnyvale, Ca, USA

Diese können pro Ladung 0,6µl Probe aufnehmen. Bei dieser Art des Druckens haben die Druckerpins beim Abgeben der Probe Kontakt mit der Oberfläche der Slides. Pro Probenaufnahme wurden bis zu 20 Objektträger bedruckt. Bei größerer Stückzahl beim Drucken wurde nach der Hälfte der Slides Probe nachgeladen. Pro Druck wurden für unsere Versuche bis zu 35 Slides gedruckt.

Bei den vorbehandelten Glasobjektträgern handelte es sich um ArrayIt SuperEpoxy 2 Substrates (Telechem, Sunnyvale, Ca, USA). Die Bindung der Peptide an die Slides erfolgt kovalent an den reaktiven Epoxidgruppen (Abbildung 9).

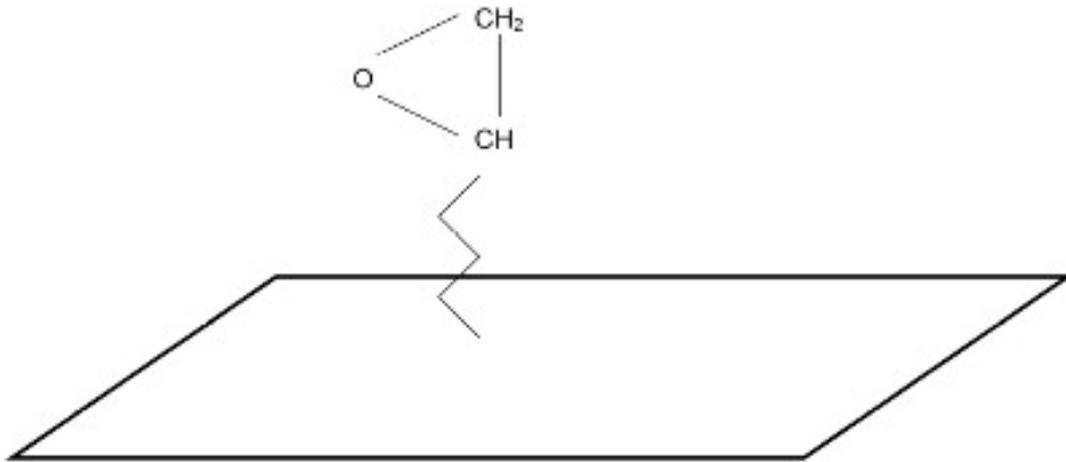


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines SuperEpoxy 2 Substrate Slides. Reaktive Gruppen auf der Oberfläche können Peptid binden. Grafik in Anlehnung an: ArrayIt.com, Telechem, Sunnyvale, Ca, USA

Neben den 344 wells mit Peptiden wurden 16 wells der 384well Platte für den Druck mit Protein Printing Buffer als Negativkontrolle verwendet. 24 wells wurden mit einer Mischung aus Alexa Fluor 546 und Alexa Fluor 647-markiertem bovinem Serumalbumin gefüllt. Diese wurden nach Erfahrungswerten aus anderen Experimenten in einer Konzentration von ca. 2 μ g/ml in Protein Printing Buffer verwendet.

Jede Probe aus der 384well Platte wurde in sechsfacher Ausführung auf jeden Array gedruckt. Dabei lagen je drei Spots mit gleicher Probe nebeneinander (Abbildung 10). Die anderen drei Spots einer Probe wurden an eine andere Stelle des Arrays gedruckt. Damit sollte der Einfluss von regionaler Verschmutzung oder Artefakten auf unsere Ergebnisse reduziert werden. Insgesamt bestand also ein Array aus 2304 Spots, die in 16 Unter-Arrays von 12x12 Spots angeordnet waren. Die Grenzen der Unter-Arrays waren mit Fluorochrom-markiertem BSA für die Auswertung sichtbar

gemacht. Pro Slide wurden zwei Arrays gedruckt, so dass je Slide zwei Seren untersucht werden konnten.

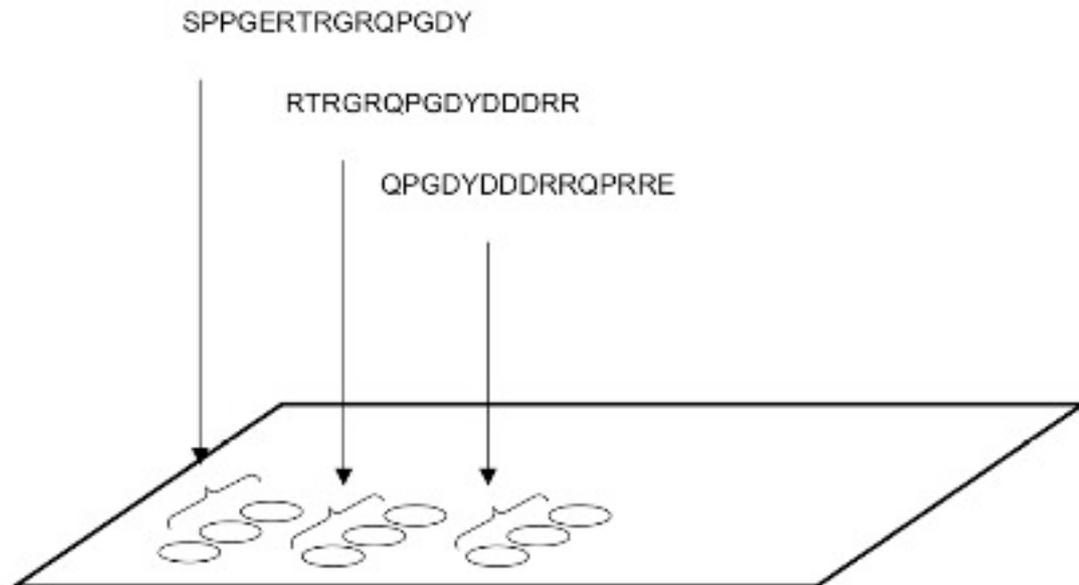


Abbildung 10: Jeder Spot auf einem Slide enthält Probe von einem Peptid. Alle Peptide wurden in Triplicates an zwei verschiedenen Stellen gedruckt.

Nach dem Druck wurden die Objektträger getrocknet und vor dem Immunolabeling gescannt. Damit sollte die Regelmäßigkeit des Drucks kontrolliert werden. Daneben sollte ein mögliches Fehlen von Proben überwacht werden. Slides mit verlaufenen oder fehlenden Spots wurden aussortiert.

Die verbliebenen Slides wurden bei Raumtemperatur geschützt vor Licht und Staub gelagert.

3.4 Immunolabeling

Ein hydrophober PAP Pen (Dako Pen, Dako, Glostrup, Denmark) wurde verwendet, um die zwei gedruckten Arrays auf jedem Slide einzukreisen. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer magnetischen Färbekammer (Magnetic Staining Chamber, The Binding Site, Birmingham, England). Die Inkubationen erfolgten auf einem

Laborrotator, um sanfte Bewegung der Reagenzien auf den Objektträger zu gewährleisten. Alle Inkubationsschritte außer der Nacht-Inkubation der Seren erfolgten bei Raumtemperatur (19-22°C). Während des gesamten Labellings wurde darauf geachtet, dass die Oberfläche der Objektträger feucht blieb.

Zunächst wurde jedes Labelling-Gebiet innerhalb der mit dem PAP Pen markierten Grenzen mit PBS-T (Phosphate Buffered Saline, Roche Diagnostcs, Mannheim, Germany mit 0,05% Tween 20, Polyoxylthylene-Sobitan Monolaurate, Sigma Aldrich, St. Louis, Miss, USA) benetzt. Das PBS-T wurde dann mit einem Vakuum entfernt, und 400µl Reagenz zum Blocken wurde auf jeden Array gegeben. Bei der Blockreagenz handelte es sich um PBS-T/HSA (1% Human Serum Albumin, Human Fraction V, 99% pure, Sigma Aldrich, St. Louis, Miss, USA in PBS mit 0,05% Tween 20). Zum Blocken wurde 1h unter Lichtschutz inkubiert.

Danach wurde das PBS-T mit dem Vakuum entfernt. Es wurden dann 250µl Serum 1:5 verdünnt mit PBS-T appliziert. Die optimale Inkubationszeit wurde durch ein Zeitreihenexperiment bestimmt. Resultierend aus diesem Experiment wurde das Serum über Nacht bei 4°C unter Lichtschutz inkubiert. Jeder Array wurde mit dem verdünnten Serum eines der Patienten der Studie, einem Negativkontrollserum oder einem Poolserum inkubiert.

Nach der Inkubation mit Serum wurden die Objektträger in der magnetischen Färbekammer gewaschen. Dazu wurde das Labelling 3x mit PBS-T aus einer Laborflasche mit Pipettenspitze als Ausguss gespült. Dabei wurde darauf geachtet, Kontamination eines Labelling-Gebiets durch Serum aus dem benachbarten Array zu verhindern. Überschüssiges PBS-T wurde während des Waschvorgangs mit dem Vakuum entfernt. Danach wurde erneut etwas PBS-T auf die Labelling-Gebiete gegeben, und die Slides wurden für 2min auf dem Laborrotator rotiert. Im Anschluss wurde erneut 1x mit PBS-T gespült.

Das PBS-T wurde dann mit dem Vakuum entfernt. Es wurden 250µl sekundärer Antikörper verdünnt mit PBS-T/HSA auf jeden Array gegeben. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich hier um ein Gemisch der oben beschriebenen Konjugate von monoklonalem murinem Anti-IgE-Antikörper mit Alexa 546 und Anti-IgG4-Antikörper mit Alexa 647. Die Verdünnung für die konjugierten sekundären Antikörper war in vorangehenden Experimenten empirisch bestimmt worden und lag bei 1:10000. Sie ist abhängig vom Konjugat. Die Arrays wurden dann erneut für 1h in der magnetischen Kammer auf dem Rotator inkubiert.

Danach wurden die Slides erst einmal in der magnetischen Färbekammer mit PBS-T aus der Laborflasche gespült. Das PBS-T wurde dann mit destilliertem Wasser fortgespült. Die Objektträger wurden danach in eine High Throughput Washing Station (ArrayIt, Telechem, Sunnyvale, Ca, USA) transferiert. Diese war mit destilliertem Wasser gefüllt. Darin wurden die Slides 3min auf dem Magnetrührer gewaschen. Das destillierte Wasser in der Washing Station wurde danach 3x ausgetauscht. Dann wurde überschüssiges Wasser von jeweils zwei Slides auf einem faserfreien Papiertuch abtropfen gelassen. Je zwei Objektträger wurden in einer Tischzentrifuge mit Objektträgerhalter für 10-20sec. trocken zentrifugiert.

3.5 Scannen der Slides

Die Slides wurden in einem ScanArray Gx Scanner (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, Mass, USA) gescannt (Abbildung 11).

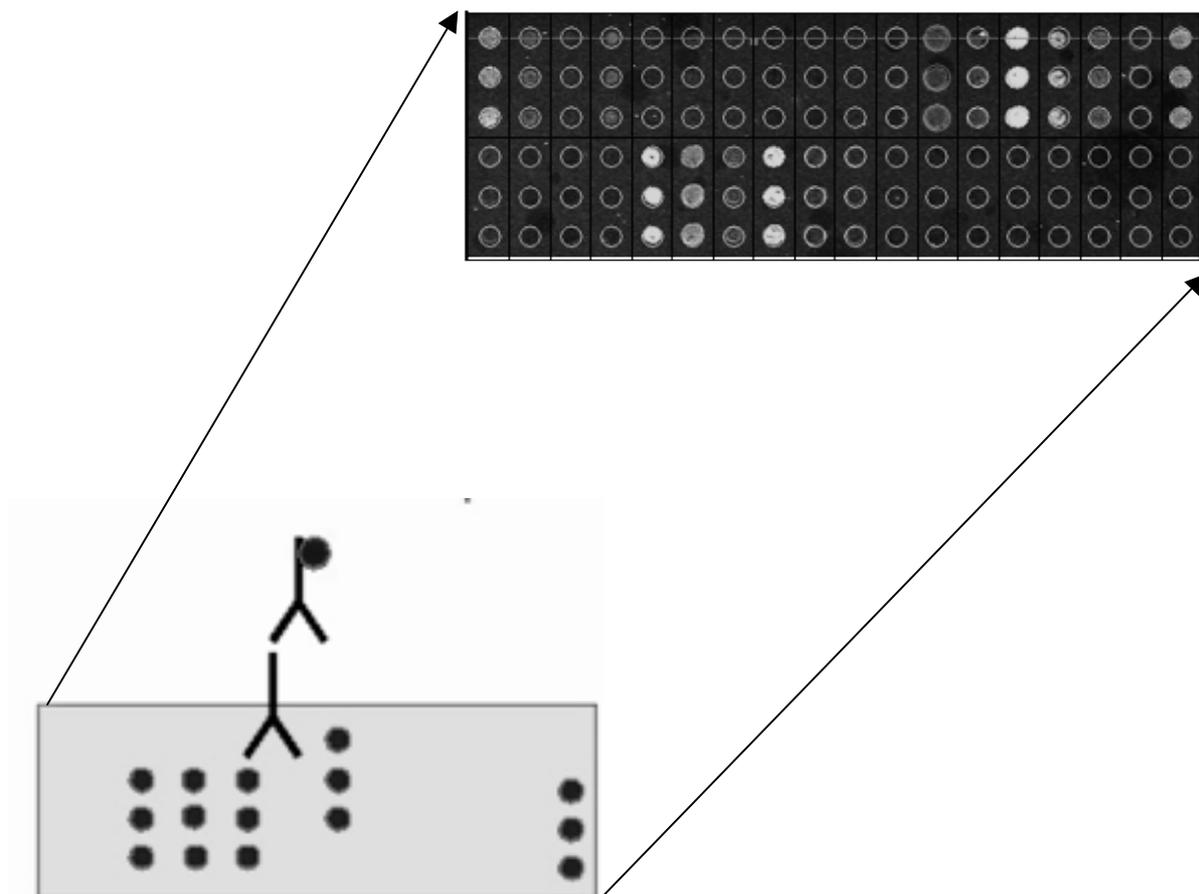


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Immunolabellings: Bindung von Antikörper (IgE) aus dem Patientenserum wird mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen. Dies kann wie rechts oben im Bild mit einem Scanner sichtbar gemacht werden. Jedes Peptid liegt dabei als Triplicate an zwei verschiedenen Stellen vor.

3.6 Datenanalyse

Das Fluoreszenzsignal, das vom ScanArray Gx Scanner detektiert worden war, wurde mit ScanArray Express 4.0 Software (Perkin Elmer, Waltham, Mass, USA) digitalisiert. Diese Software besitzt Algorithmen, um die Spots auf den Slides zu finden und die Fluoreszenz zu quantifizieren. Die Analyse wurde in der Einstellung „Adaptive Threshold“ mit maximalem Spotdurchmesser von 190 μ m durchgeführt. Der Hintergrund für jeden einzelnen Spot wurde in einem Bereich von 342 bis 494 μ m vom Zentrum des Spots gemessen. Nach Auffinden der Spots durch den Algorithmus des Programms, wurde jeder Array auf Artefakte und falsch gesetzte Messbereiche überprüft. Auf Grund von Artefakten wie Verschmutzungen falsch positive Spots wurden entfernt.

Die weiteren Berechnungen erfolgten mit Excel sowie einem individuell angefertigtem Programm (Contec Vision, Waltham, Mass, USA). Dieses war nach Erfahrungen der Auswertung mit Excel erstellt worden. Es erfüllte die Aufgabe, den einzelnen Datenpunkten die Namen der Arrayelemente zuzuordnen. Daneben fasste es die sechs Einzelwerte für jede getestete Probe zusammen, indem es den Median der Werte berechnete. Vor Einführung dieses Programms wurden diese Auswertungsschritte mit im Visual Basic Editor programmierten Excel-Makros durchgeführt.

Die Cluster Analyse wurde mit dem Programm Cluster 3.0 (EisenLab, <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) durchgeführt. Sie wurde mit dem complete linkage Algorithmus und uncentered measurements sowohl für Arrays als auch für Seren durchgeführt. Untersucht wurden in einer Clusteranalyse jeweils Patienten einer Baumnuss-/Sesamgruppe (z.B. erdnussallergische, walnussallergische und erdnussallergische, walnusstolerante Patienten) und Negativkontrollen. Die Darstellung erfolgte mit Java TreeView (EisenLab).

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 11 für Mac OS X.

3.7 Inhibitionsexperimente

Bei den Inhibitionsversuchen erfolgte das Immunolabelling nach dem oben beschriebenen Vorgehen. In diesen Versuchen wurde ein Poolserum aus Seren von fünf erdnussallergischen Patienten verwendet.

Im Unterschied zum einfachen Immunolabelling wurde in diesen Versuchen das Poolserum mit Peptid versetzt, bevor es auf die Arrays appliziert wurde. Für die Inhibition wurde in der höchsten Konzentration 1µl Peptid aus der für den Druck verwendeten Platte (original JPT Peptid 1:3 verdünnt mit ArrayIt Protein Printing Buffer) verwendet. Dies entsprach ca. 0,67nmol Peptid. Das Verhältnis von Peptid zu peptidspezifischem Antikörper ließ sich nur schätzen. Bei einer angenommenen Antikörperkonzentration von 100kU/l wurde von einem Verhältnis von Antikörper zu Peptid von ca. 1:10000 in der höchsten Peptidverdünnung ausgegangen. Die zur Inhibition verwendeten Peptide wurden in einer Verdünnungsreihe von 1, 1:10, 1:1000 und 1:10000 verwendet. Pro Inhibitionsversuch wurde mit bis zu fünf Peptiden gleichzeitig getestet. Dabei wurden immer entweder nur mit Erdnusspeptiden oder nur mit Baumnuss/Sesampeptiden in einem Array inhibiert. Nachdem vergleichend die Inhibition mit Erdnusspeptiden und Baumnuss/Sesampeptiden untersucht wurde (Ara h 1.015, Ara h 1.031, Ara h 3.008, Ara h 3.024 vs. Ses i 3.015, Ses i 3.031, Ses i 6.008, Jug r 4.024), wurden Versuche im Hinblick auf die klinisch charakterisierten Patientengruppen unternommen. Dazu wurden zwei Poolseren hergestellt, von dem Pool 1 sich aus fünf erdnussallergischen, walnussallergischen Patienten zusammensetzte und Pool 2 aus erdnussallergischen, walnusstoleranten Patienten. Hier wurde Inhibitionsexperimente mit Erdnuss- und Walnusspeptiden durchgeführt. Die Seren wurden jeweils mit steigenden Konzentrationen von Ara 1.024, Arah 1.032, Ara h 2.021, Ara h 3.004 und Ara h 3.008 und parallel dazu mit Jug r 2.024, Jug r 2.032, Jug r 1.021, Jug r 4.004 und Jug r 4.008 präinkubiert.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung Fragebögen

Von 287 Fragebögen wurden 110 beantwortet (38,5%), und die klinischen Angaben zu Nussallergien von Kindern (<1-19Jahre) ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und in den Abbildungen 12 – 21 dargestellt. Von den Patienten mit anamnestischen Reaktionen auf Erdnüsse hatten 30,4% Reaktionen auf mindestens eine Baumnuss oder Sesam. 8,7% (4 Patienten) berichteten von Reaktionen auf mehr als eine Baumnuss. Viele Patienten konnten keine Angaben zu Toleranz oder Reaktion auf Baumnüsse oder Sesam machen, weil sie nicht exponiert waren oder sich nicht an eine Exposition erinnern konnten. 16 der 46 Eltern der erdnussallergischen Kinder (34,8%) gaben an, ihr Kind habe entweder aus Angst vor einer Reaktion oder, weil es ihnen geraten worden sei, Haselnüsse, Walnüsse oder Sesam vermieden.

Die Häufigkeit von Reaktionen auf Baumnüsse oder Sesam bei den von uns befragten erdnussallergischen Patienten sind in Abbildungen 12 – 14 dargestellt. Unter den Baumnüssen waren Reaktionen auf Haselnüsse besonders häufig. Reaktionen auf Sesam kamen bei den von uns befragten Patienten selten vor. Die erdnussallergischen Patienten mit Reaktion auf Sesam reagierten mit der Haut als einzigem Organsystem.

Tabelle 5: Auswertung der Fragebögen.

Anzahl Fragebögen	Beantwortete Fragebögen	Reaktion auf Erdnuss	Erdnussallergische Patienten mit Reaktion auf mind. 1 Baumnuss/ Sesam
286	110 (38,5%)	46 Patienten	14/ 46 (30,4%)

Unter den erdnussallergischen Patienten gab es einen großen Anteil mit schweren klinischen Reaktionen (Abbildung 15). In 18 der 46 Fälle (39,1%) gaben die Eltern Atemschwierigkeiten und zum Teil pfeifende Atmung als Symptome der Reaktion an. Die Behandlung erfolgte in den meisten Fällen durch Antihistaminika und Kortison. Adrenalin wurde nur bei einem Patienten eingesetzt, der anamnestisch bewusstlos war. 11 der erdnussallergischen Patienten reagierten mit der Haut als einzigem Organsystem.

Erdnussallergische Patienten: klinische Reaktivität auf Walnuss

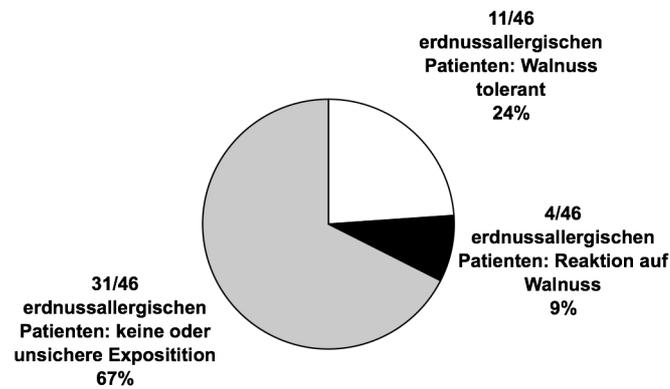


Abbildung 12: Klinische Charakteristika der erdnussallergischen Patienten aus den Fragebögen. Angaben zur Walnussallergie

Erdnussallergische Patienten: klinische Reaktivität auf Haselnuss

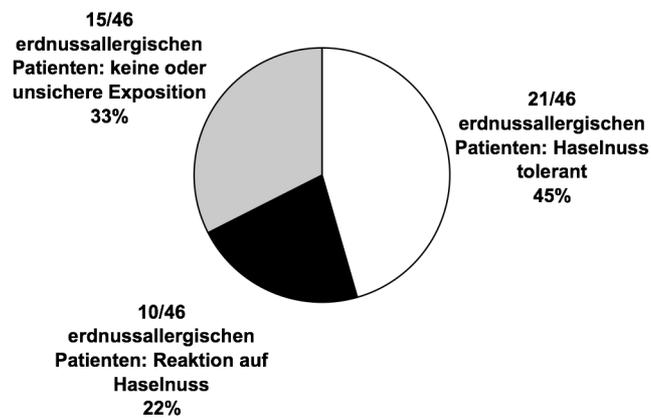


Abbildung 13: Klinische Charakteristika der erdnussallergischen Patienten aus den Fragebögen. Angaben zur Haselnussallergie.

Erdnussallergische Patienten: klinische Reaktivität auf Sesam

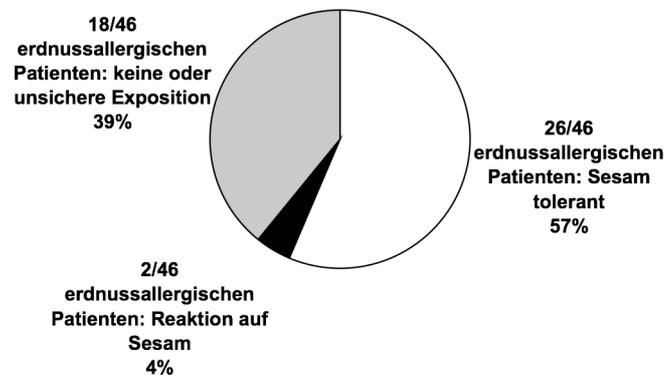


Abbildung 14: Klinische Charakteristika der erdnussallergischen Patienten aus den Fragebögen. Angaben zur Sesamallergie

Symptome der Reaktionen auf Erdnuss bei den 46 erdnussallergischen Patienten

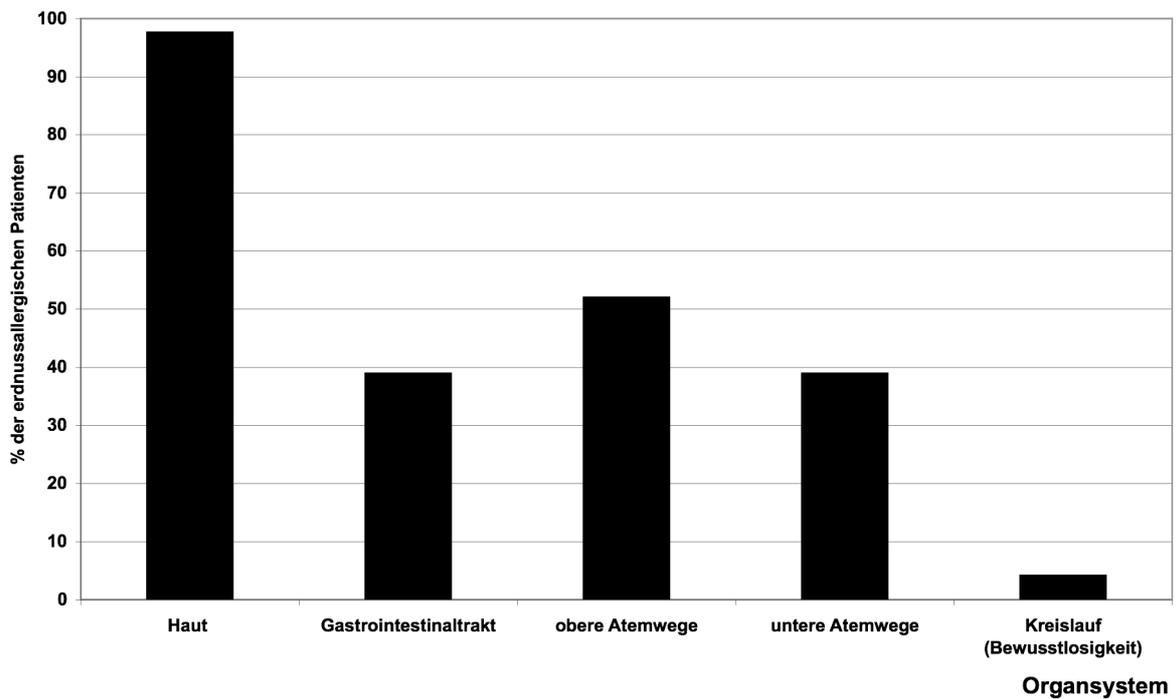


Abbildung 15: Symptome der allergischen Reaktion: betroffene Organsysteme. Mehrfachnennung möglich.

Erdnussallergische Patienten (n=46): Schwere der klinischen Reaktion

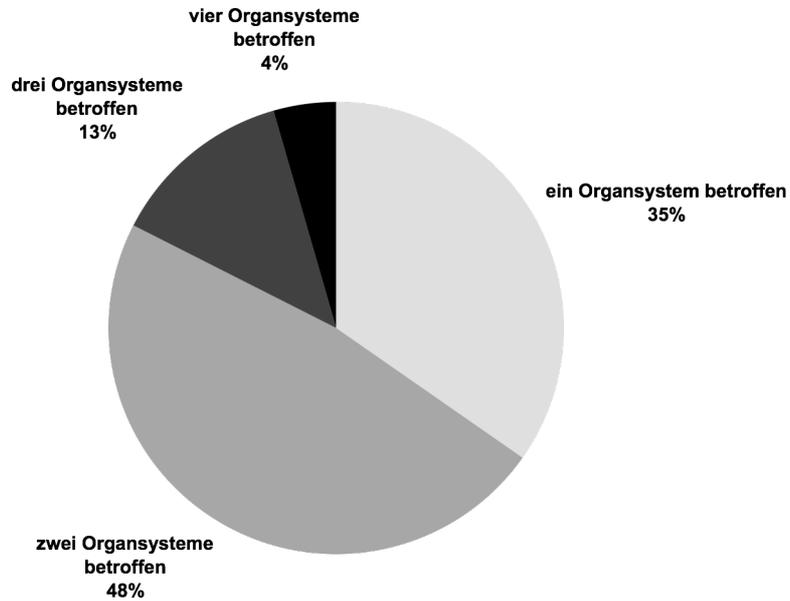


Abbildung 16: Schwere der klinischen Reaktion bei den erdnussallergischen Patienten. Dargestellt ist, mit wie vielen Organsystemen (Haut, Atemwege, Gastrointestinaltrakt, Kreislauf) die einzelnen Patienten reagiert haben.

1. Reaktion auf Erdnuss (Kumulativ): % der erdnussallergischen Patienten

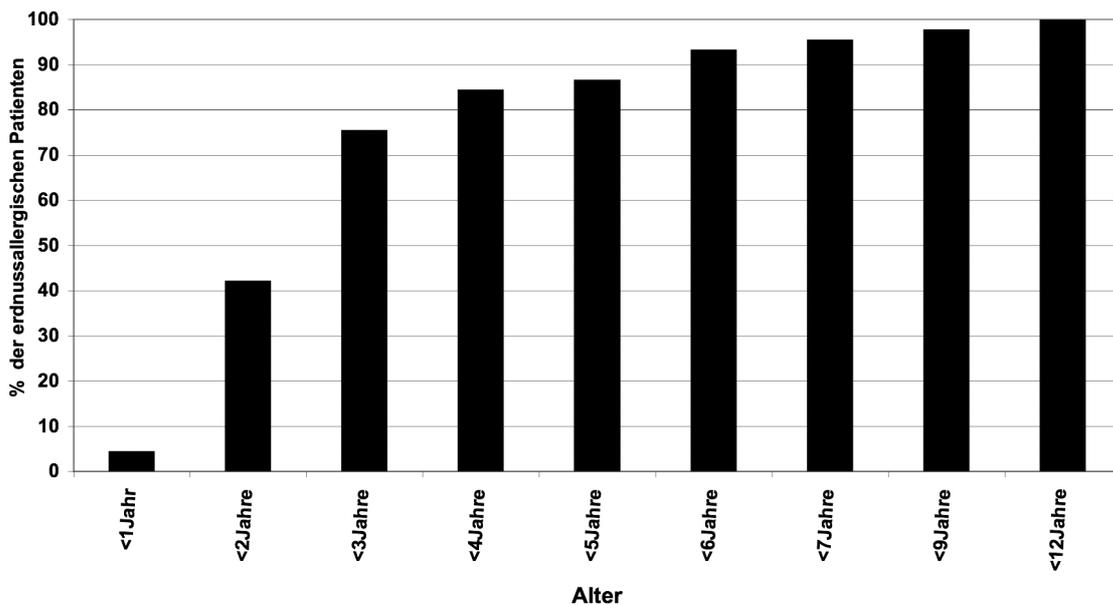


Abbildung 17: Alter bei der ersten Reaktion auf Erdnüsse. Dargestellt ist die kumulative Inzidenz der Erstreaktionen auf Erdnüsse von 45 erdnussreaktiven Patienten. Bei einem der 46 erdnussallergischen Patienten fehlte die Angabe zum Alter bei der ersten Reaktion.

Zeitpunkt der ersten Reaktion: 46 erdnussallergische Patienten

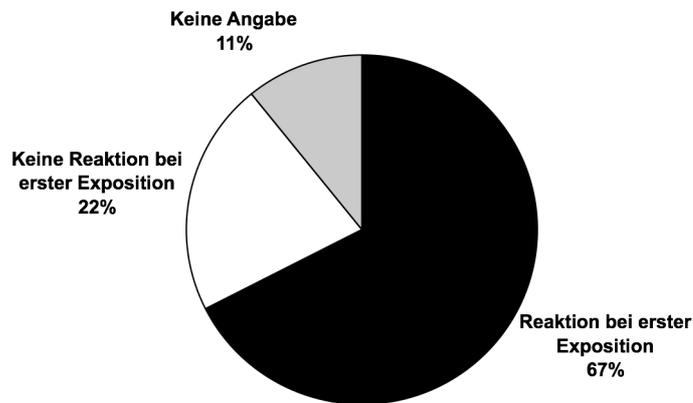


Abbildung 18: Exposition gegenüber Nüssen zum Zeitpunkt der ersten Reaktion. Fast alle Patienten waren gestillt. Erdnüsse wurden nur von 4 Frauen während der Stillzeit bewusst vermieden.

Erdnussallergische Patienten (n=46): Reaktionen gegen andere Nahrungsmittel

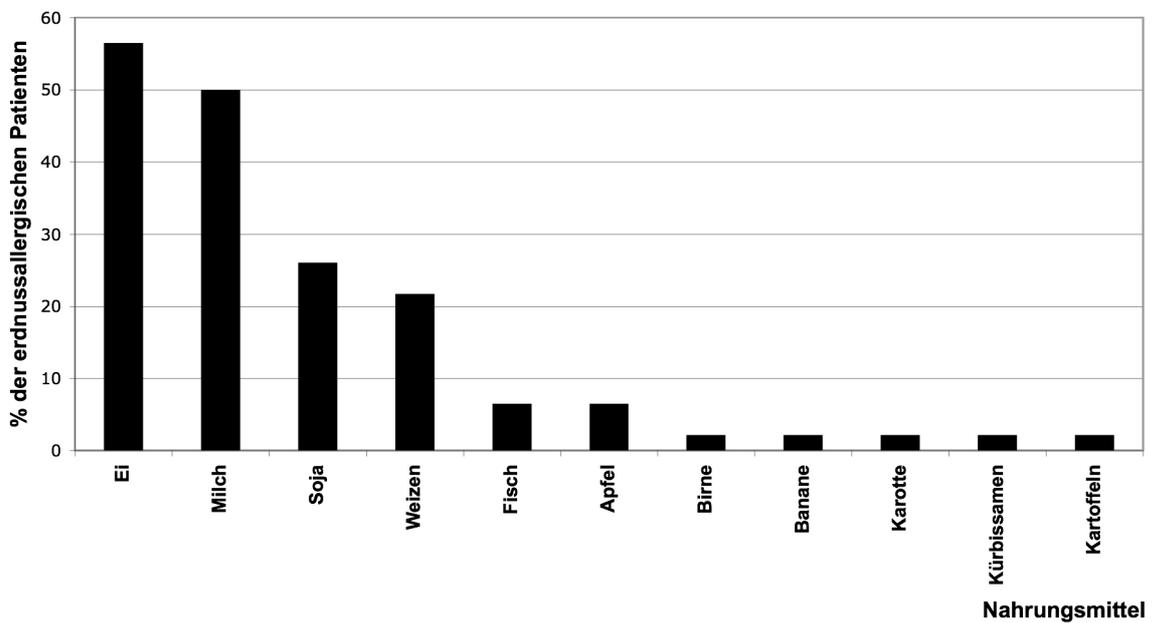


Abbildung 19: Klinische Reaktionen auf andere Nahrungsmittel.

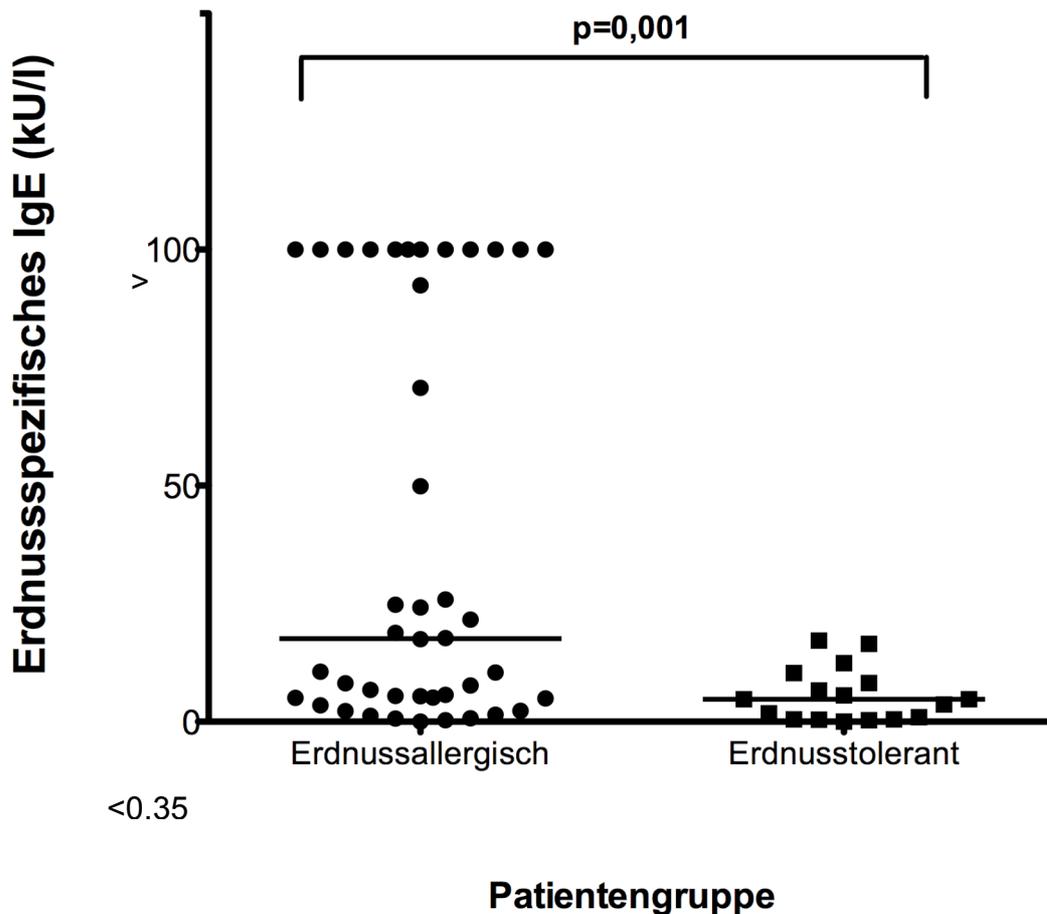


Abbildung 20: Vergleich des spezifischen IgE der erdnussallergischen vs. erdnusstoleranten Patienten. Erdnussallergische Patienten haben zwar signifikant höheres spezifisches IgE, allerdings liegt der Median des spezifischen IgE gegen Erdnuss bei den erdnusstoleranten Patienten in diesem Patientengut bei 3,64kU/l. Der erdnusstolerante Patient mit dem höchsten spezifischen IgE gegen Erdnuss hatte 17,2kU/l. Darüber hatten alle Patienten Reaktionen.

Mehr als 70% der ersten Reaktionen auf Erdnüsse traten bei Kindern unter drei Jahren auf (Abbildung 17). Bei 67% der Patienten trat die erste Reaktion beim ersten Kontakt mit dem Allergen auf (Abbildung 18). Viele Kinder zeigten auch klinische Reaktionen gegenüber anderen Nahrungsmitteln (Abbildung 19). Allein aus den Werten des spezifischen IgE gegen Erdnuss im ImmunoCAP kann bei den befragten Kindern keine klinische Reaktivität vorausgesagt werden. Zwar waren bei den von uns befragten Patienten die Kinder mit spezifischem IgE von $>17,2\text{kU/l}$ alle erdnussallergisch (Abbildung 20). Erdnussallergische Patienten hatten auch signifikant höheres spezifisches IgE gegen Erdnuss als erdnusstolerante Patienten (Abbildung 20). Allerdings waren auch 45,5% der Patienten mit spezifischem IgE zwischen 3,5 und 17,5kU/l (Phadia CAP 3) erdnusstolerant. Ebenso korrelierte die Höhe des spezifischen IgE nicht mit der Schwere der Reaktion. Patienten mit

anamnestischen Atembeschwerden hatten kein signifikant höheres spezifisches IgE gegen Erdnuss als Patienten mit leichteren klinischen Reaktionen (Abbildung 21). Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied in der Höhe des spezifischen IgE von Patienten mit Reaktionen an einem Organsystem im Vergleich mit solchen, die mit mehreren Organsystemen reagierten ($p=0,67$, Mann-Whitney-U-Test).

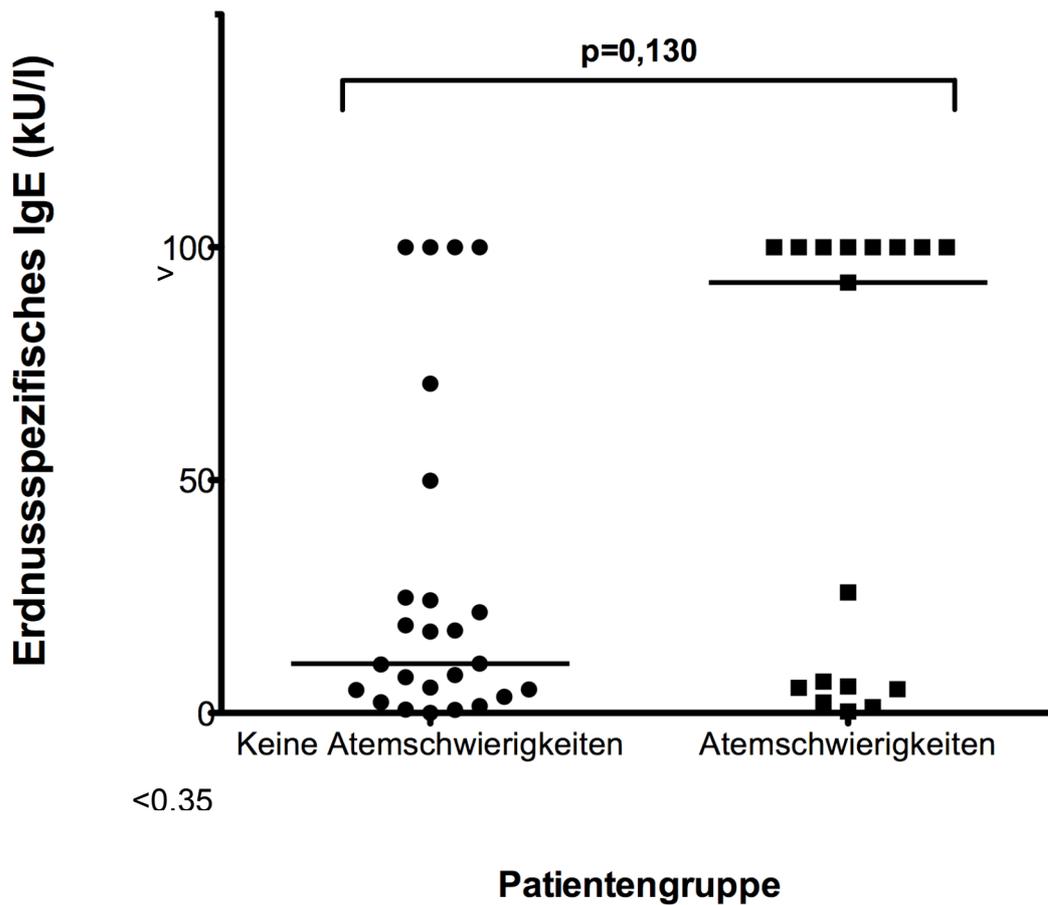


Abbildung 21: Vergleich der Werte für spezifisches IgE gegen Erdnuss bei erdnussallergischen Patienten mit vs. ohne Atemschwierigkeiten während der Reaktion. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen (Mann-Whitney-U-Test).

4.2 Microarrays

4.2.1 Microarrays: Methode

4.2.1.1 Patienten für die Microarrays

In den Microarrays wurden Seren von 79 Patienten und Negativkontrollen aus den USA und Deutschland untersucht, die in Tabelle 6 charakterisiert sind. Einige Patienten können dabei in mehreren Kategorien auftauchen, wenn klinische Daten zu mehr als einem der neben Erdnuss untersuchten Allergene vorlagen. Alle reaktiven Patienten hatten systemische Reaktionen auf das betreffende Allergen.

Tabelle 6: Eigenschaften der untersuchten Patienten

Klinische Eigenschaften	Anzahl	Spezifisches IgE gegen Erdnuss	Spezifisches IgE gegen Baumnuss/ Samen	Alter
Erdnuss reaktiv, Walnuss reaktiv	19	<0,35->100kU/l Median 16,9kU/l	Walnuss: <0,35-42,7kU/l Median 7,5kU/l	3-25 Jahre, Median 8 Jahre
Erdnuss reaktiv, Walnuss tolerant	21	<0,35->100kU/l Median 34,3kU/l	Walnuss: <0,35- 1,31kU/l Median <0,35kU/l ($p=0,001$)	3-23 Jahre Median 6,5 Jahre
Erdnuss reaktiv, Haselnuss reaktiv	12	5,3->100kU/l Median 24,2kU/l	Haselnuss: <0,35- 57,2kU/l Median 5,05kU/l	2-25 Jahre Median 7,5 Jahre
Erdnuss reaktiv, Haselnuss tolerant	14	2,5->100kU/l Median 67,2kU/l	Haselnuss: <0,35- 7,26kU/l Median 1,94kU/l ($p=0,107$)	3-14 Jahre Median 7 Jahre
Erdnuss reaktiv, Sesam reaktiv	19	1,39->100kU/l Median 34,7kU/l	Sesam: <0,35- 24,3kU/l Median 2,06kU/l	2-19 Jahre Median 6 Jahre
Erdnuss reaktiv, Sesam tolerant	26	<0,35->100kU/l Median 44,35kU/l	Sesam: <0,35- 18,6kU/l Median 2,02 ($p=0,33$)	3-19 Jahre Median 8 Jahre
Atopische Negativkontrollen	5	<0,35kU/l	<0,35kU/l	2-29 Jahre
Nicht-atopische Negativkontrollen	6	<0,35kU/l	<0,35kU/l	23-44 Jahre

In den Paarvergleichen Erdnuss reaktiv, Walnuss/Haselnuss/Sesam reaktiv versus Erdnuss reaktiv, Walnuss/Haselnuss/Sesam tolerant unterschieden sich die Werte für das spezifische IgE gegen Erdnuss nicht signifikant: $p=0,45$ für Walnuss allergisch versus tolerant, $p=0,37$ für Haselnuss allergisch versus tolerant, $p=0,51$ für Sesam allergisch versus Sesam tolerant (t-Tests).

4.2.1.2 Arrays

Die Fluoreszenzwerte für die einzelnen Peptide wurden berechnet, indem von den Rohwerten zunächst der Mittelwert plus zwei Standardabweichungen der Fluoreszenzwerte der PPB Proben (protein printing buffer) abgezogen wurden, die als Negativkontrollen auf jeden Slide gedruckt waren.

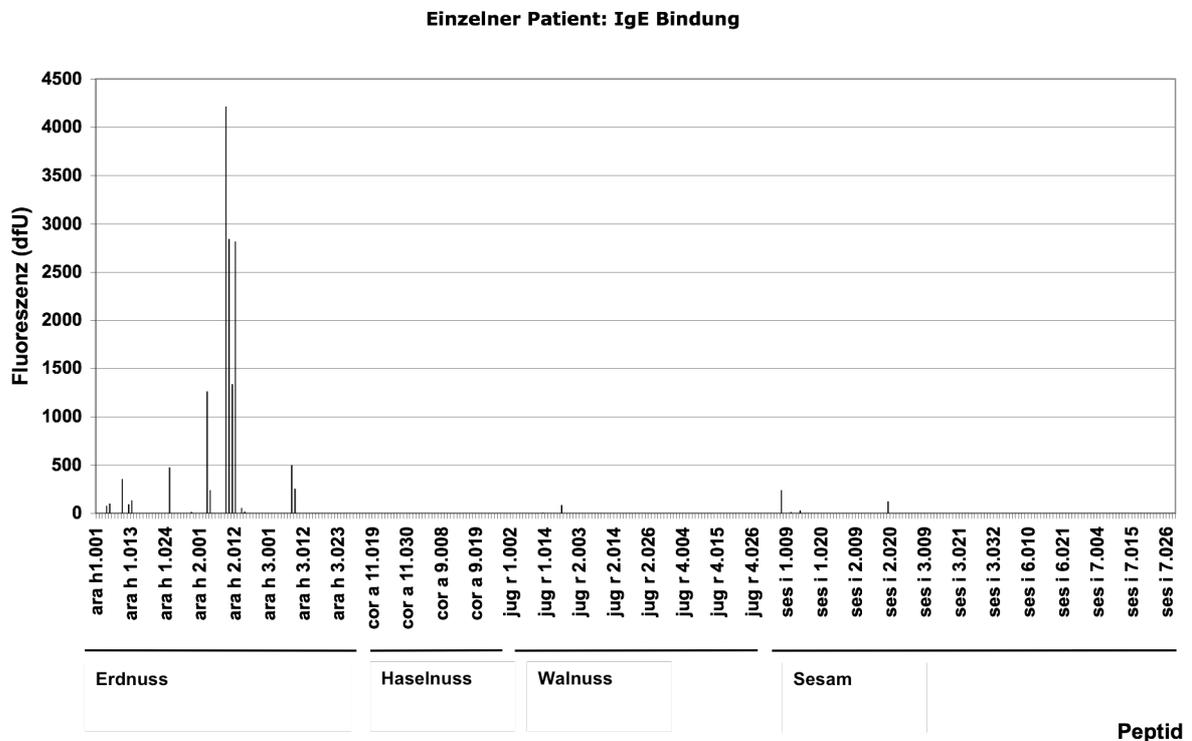


Abbildung 22: Darstellung des IgE-Fluoreszenzmusters für einen einzelnen Patienten.

Um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers sowie mögliche Autofluoreszenz einzelner Peptide auszuschließen, wurde neben diesem intra-slide cut-off wurde ein zweiter Schwellenwert bestimmt. Dieser berechnete sich aus dem Mittelwert plus zwei Standardabweichungen der Fluoreszenzwerte der einzelnen Peptide beim Labelling der Negativkontrollseren. Auch dieser Wert wurde jeweils vom Fluoreszenzwert für jedes Peptid bei den Patienten abgezogen.

Damit erhielt man für jedes Serum ein bestimmtes Muster an IgE (und – hier nicht dargestellt – auch IgG4) Bindung, das in Abbildung 22 exemplarisch bei einem Patienten dargestellt wird.

Auf Grund unspezifischer Bindung wurden folgende Peptide aus der Analyse ausgeschlossen: Ara h 1.025, Jug r 1.008, Cor a 9.026, Ses i 1.007, Ses i 2.008, Ses i 2.021 und Ses i 7.023. Diese Peptide hatten zum einen Bindungen in den Negativkontrollen, zum anderen ließen sich diese Bindungen durch Verdünnen der Seren nicht beeinflussen.

4.2.1.3 Negativkontrollen

Ein Hinweis auf die hohe Spezifität der Bindungen fand sich darin, dass die Negativkontrollen wenig IgE-Bindung an den untersuchten Peptiden zeigten (Abbildungen 23 – 25).

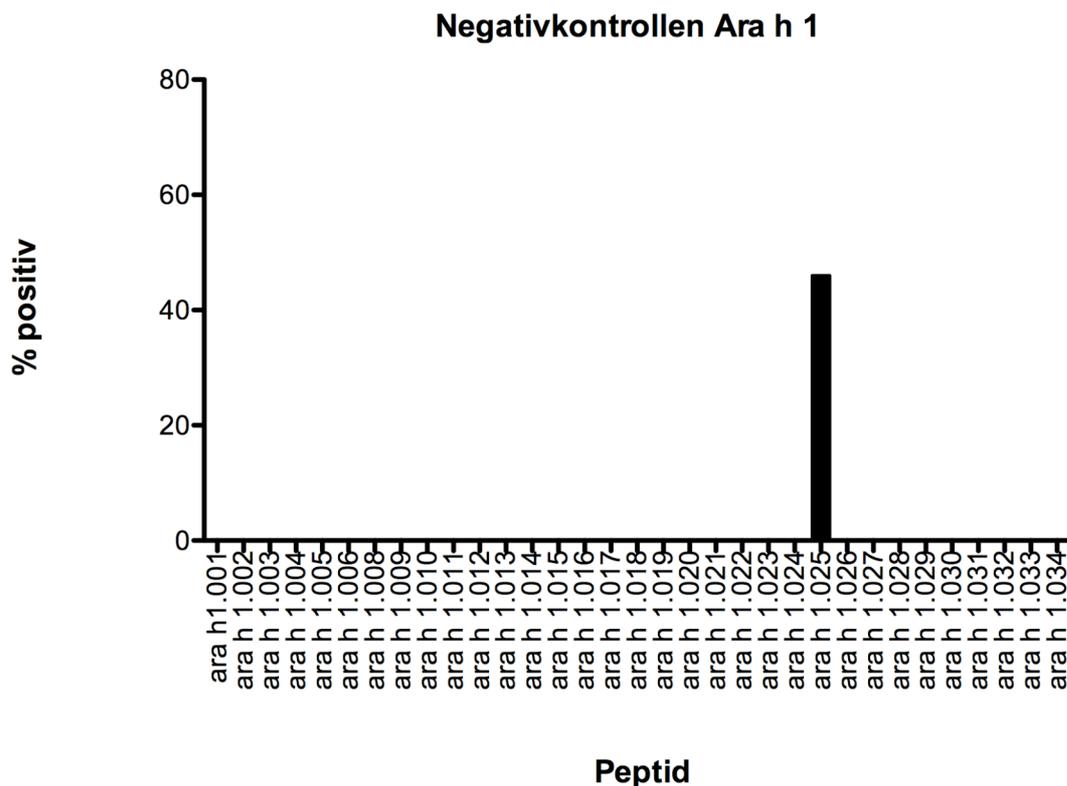


Abbildung 23: Häufigkeit der IgE-Bindung an den Negativkontrollen.

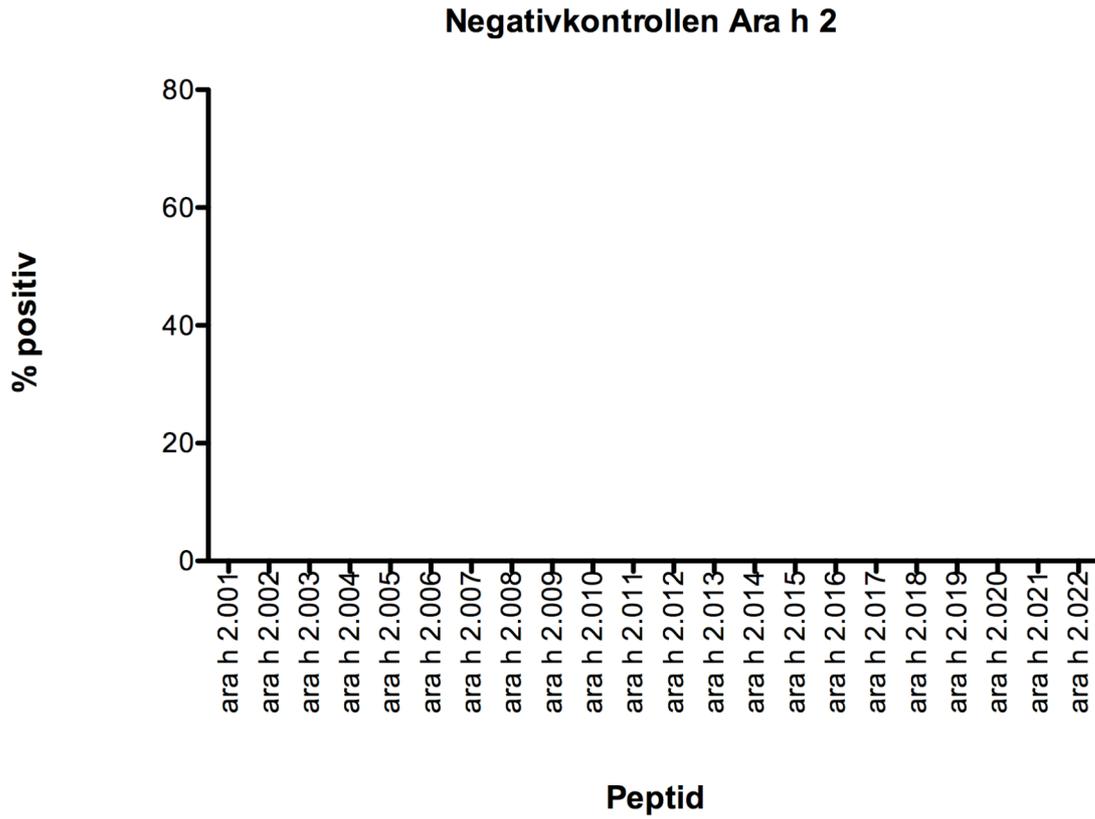


Abbildung 24: Häufigkeit der IgE-Bindung bei den Negativkontrollen

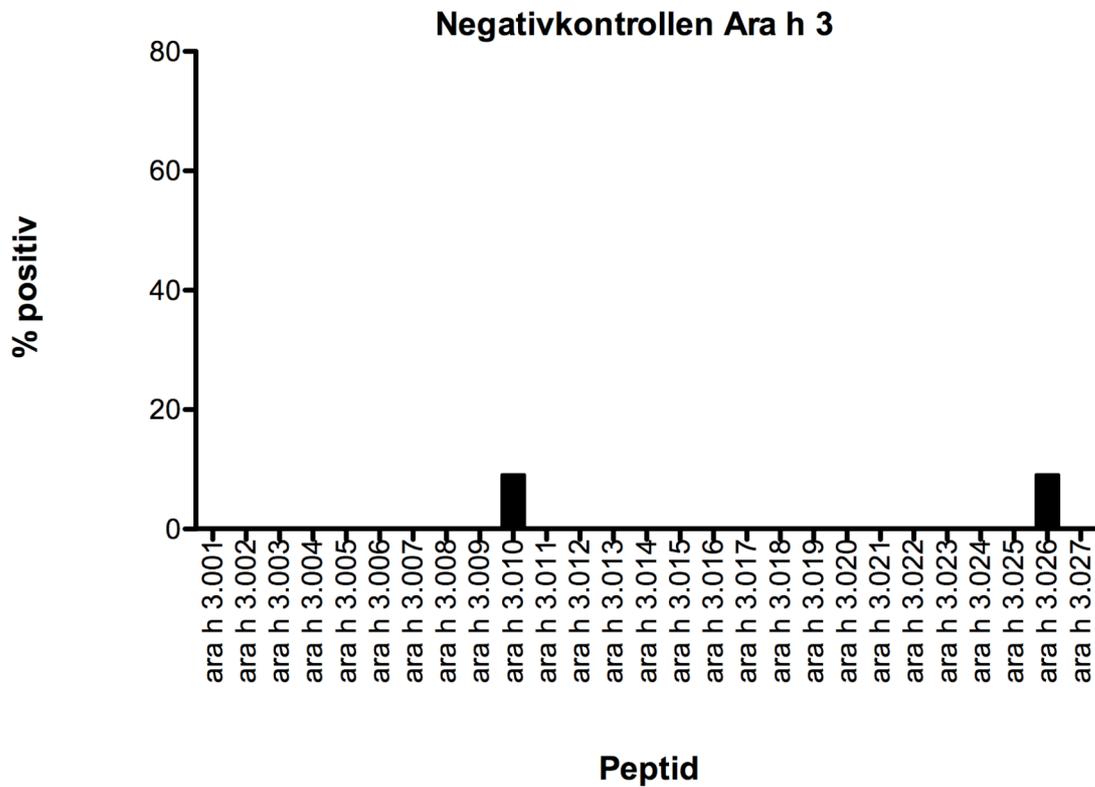


Abbildung 25: Häufigkeit der IgE Bindung bei den Negativkontrollen: Ara h 3.

4.2.1.4 Serielle Verdünnung von Poolserum

Um zu zeigen, dass es sich bei den in den Microarrays nachgewiesenen IgE-Bindungen nicht um unspezifische Bindung von fluoreszenzmarkiertem sekundärem Antikörper an den Peptiden handelte, wurden Versuche mit verschiedenen Verdünnungen von Poolserum unternommen. Die serielle Verdünnung des untersuchten Poolserums führte zu schrittweisem Verlust der Fluoreszenz an den IgE-Bindungsstellen (Abbildung 26). Dies schließt aus, dass die in den Versuchen gemessenen Fluoreszenzwerte nur auf Bindung von sekundärem Antikörper zurückzuführen sind. Es ist ein weiterer Hinweis auf Spezifität der Bindung.

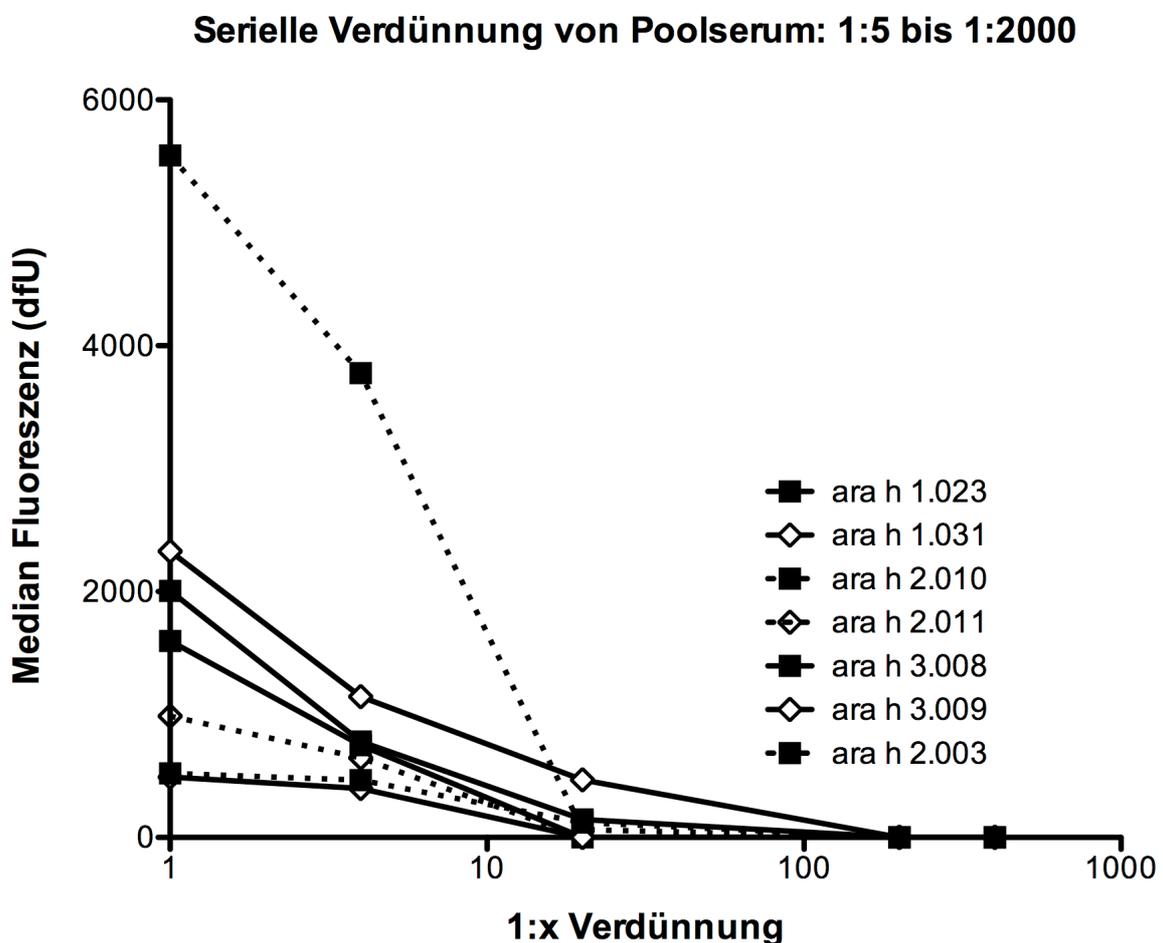


Abbildung 26: Abnahme der Fluoreszenz bei serieller Verdünnung von Poolserum. Hier an einigen Beispielperptiden gezeigt.

4.2.1.5 Bestimmung der optimalen Inkubationszeit

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit für die Patientenseren wurden Arrays für je 2h, 4h und über Nacht mit Poolserum inkubiert. Es zeigten sich wie in Abbildung 27 exemplarisch dargestellt bei steigender Inkubationszeit steigende Fluoreszenzwerte. Nach anfänglich steilem Anstieg der Fluoreszenz fand sich zwischen 4h und Übernacht-Inkubation ein abgeflachter Verlauf. Auf Grund dieser Beobachtung wurden die Patientenseren in unseren Versuchen über Nacht inkubiert.

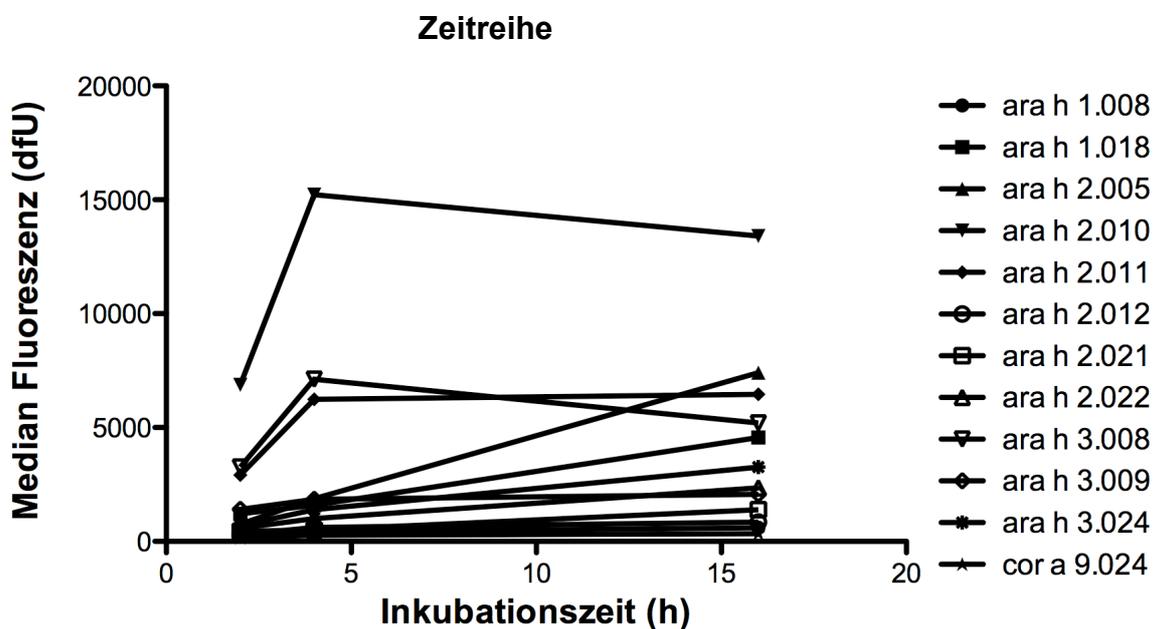


Abbildung 27: Fluoreszenzwerte an Peptiden von Poolserum bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

4.2.1.6 Untersuchung des Einflusses des Waschens auf die Bindung

Unter dem Verdacht, dass durch intensives Waschen der gelabelten Objektträger durch destilliertes Wasser am Ende der Versuche IgE-Bindung verloren geht, wurde der Effekt des Waschvorgangs auf die IgE-Bindung untersucht. Dazu wurde ein Slide in Dreiminutenschritten bis zu 12min länger als nach Standardprotokoll in Aqua dest. gewaschen. Es gab keine IgE-Bindungsstelle, die erst positiv war und nach längerem Waschen verloren ging (Abbildung 28).

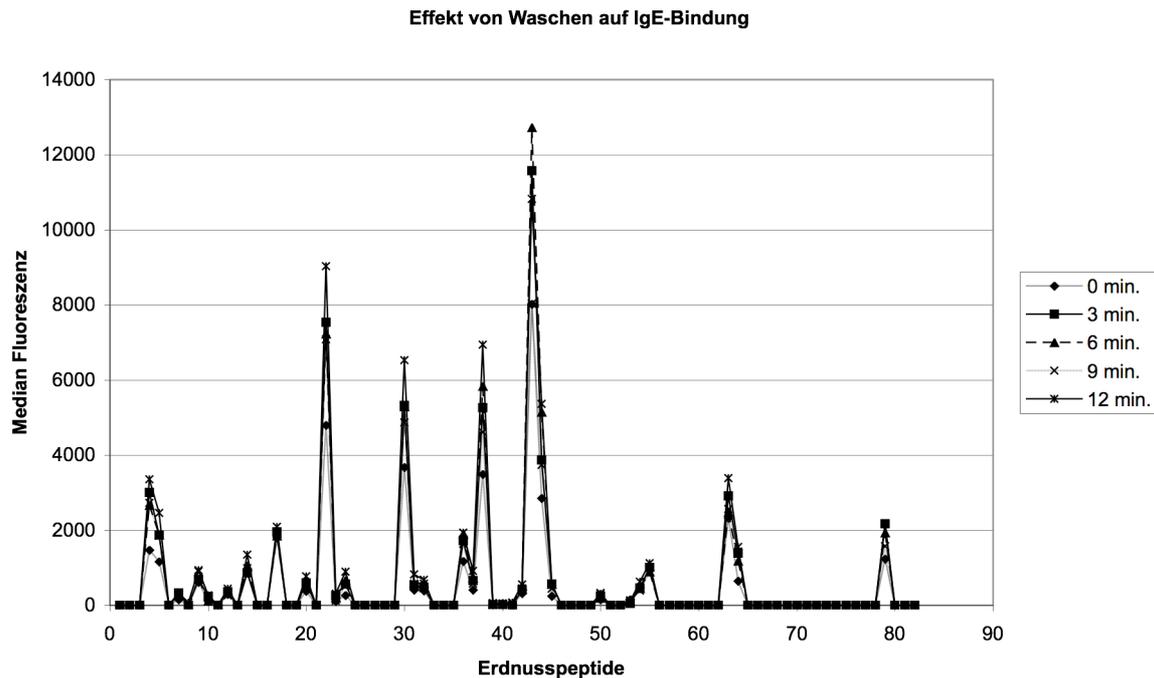


Abbildung 28: Effekt verlängerten Waschens mit destilliertem Wasser auf nachzuweisende IgE-Bindung an Erdnusspeptiden. Es fand sich kein Peptid, das bei diesem Vorgang als IgE-Bindungsstelle verloren ging.

4.2.2 Unterscheidung der Patientengruppen anhand der Peptidbindung

4.2.2.1 Cluster Analyse

Um festzustellen, ob sich in den verschiedenen Patientengruppen bezüglich der IgE und IgG4 Bindung für die jeweilige Gruppe spezifische Bindungsmuster erkennen lassen, die eine Zuordnung zur jeweiligen Gruppe zulassen, wurden orientierend hierarchische Clusteranalysen der IgE/ IgG4 Ratio der Fluoreszenzwerte durchgeführt. Die Hypothese ist, dass erdnussallergische/baumnuessallergische und erdnussallergische/baumnuessintolerante Patienten in abgrenzbaren Gruppen jeweils ein Cluster bilden.

4.2.2.1.1 Cluster Analyse: Walnussgruppe

Bei der Clusteranalyse lassen sich keine der klinischen Unterscheidung von walnussallergischen und walnusstoleranten Patienten entsprechenden Cluster abgrenzen.

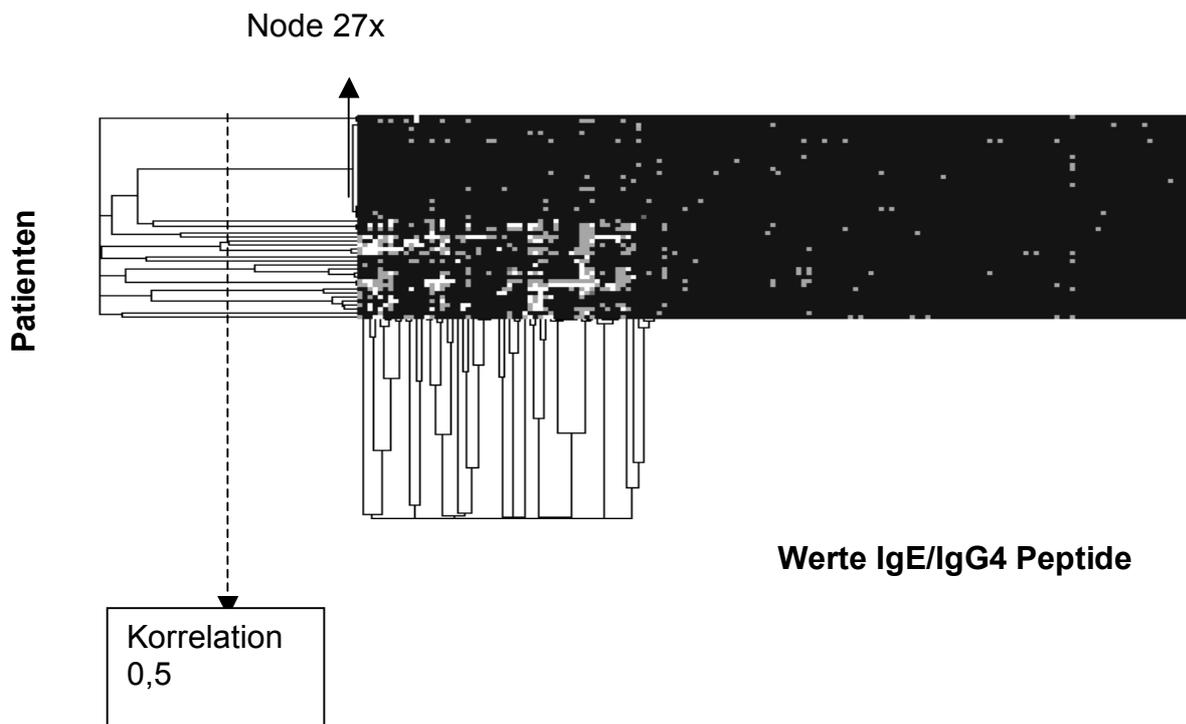


Abbildung 29: Cluster Analyse Walnusspatienten: Geclustert sind hier erdnussallergische, walnussallergische Patienten, erdnussallergische, walnusstolerante Patienten und Negativkontrollen. Der gestrichelte Pfeil zeigt zur Orientierung das Korrelationsniveau von 0,5 an.

Es lässt sich in der Abbildung (Abbildung 29) erkennen, dass die Cluster mit einem Korrelationskoeffizienten $>0,5$ sehr nur wenige Patienten enthalten. Diese enthalten Patienten aus beiden Gruppen.

Eine Ausnahme ist Node 27x. Hier liegt eine Korrelation von 0,98 vor. In diesem Cluster finden sich die Negativkontrollen. Daneben finden sich in diesem Cluster 13 Patienten mit wenigen Bindungen aus den beiden erdnussallergischen Gruppen.

4.2.2.1.2 Cluster Analyse: Haselnussgruppe

Bei der orientierenden Clusteranalyse finden sich keine Gruppen, die eine Einteilung gemäß klinischer Reaktivität zulassen.

Node 17x (Abbildung 30) hat eine Korrelation von 0,98. Er enthält alle Negativkontrollen und 6 Patienten.

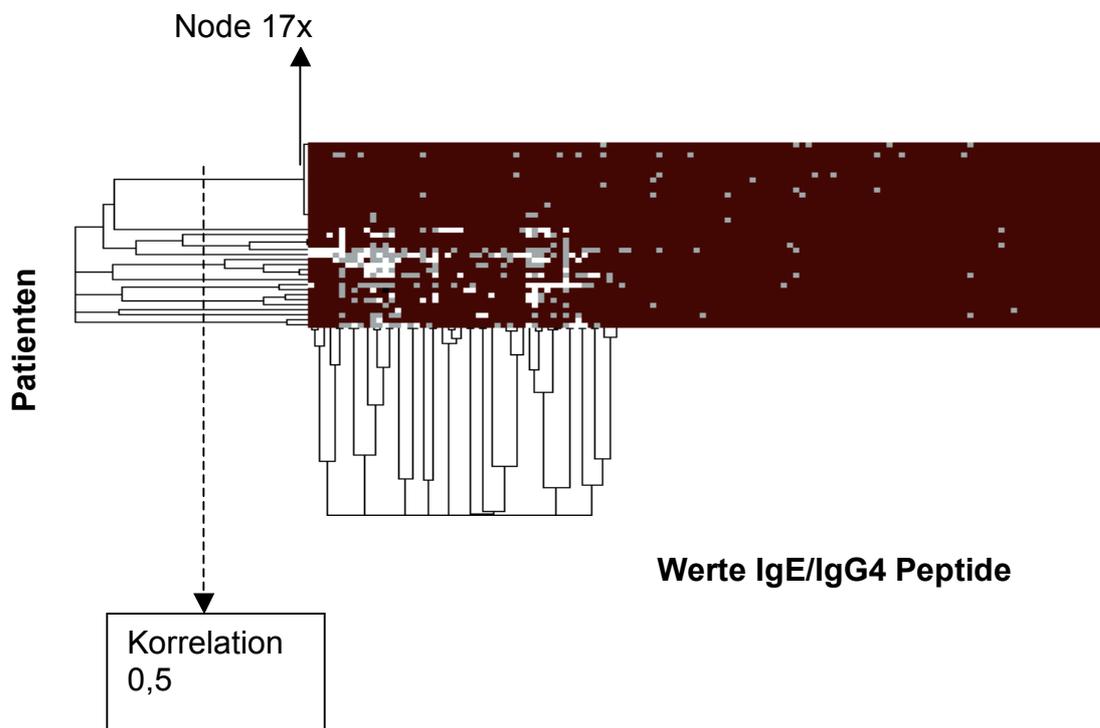


Abbildung 30: Cluster Analyse Haselnusspatienten: erdussallergische/ haselnussallergische Patienten, erdnussallergische/ haselnusstolerante Patienten, Negativkontrollen. Der gestrichelte Pfeil zeigt orientierend ein Korrelationsniveau von 0,5 an.

4.2.2.1.3 Cluster Analyse: Sesamgruppe

Es lassen sich auch hier die nach klinischer Reaktivität zusammengestellten Gruppen nicht nach dem Bindungsmuster voneinander abgrenzen.

Node 19x hat eine Korrelation von 0,99 und enthält 7 der 11 Negativkontrollen. Daneben finden sich in diesem Cluster aber auch 8 sesamtolerante und 2 sesamallergische Patienten (Abbildung 31).

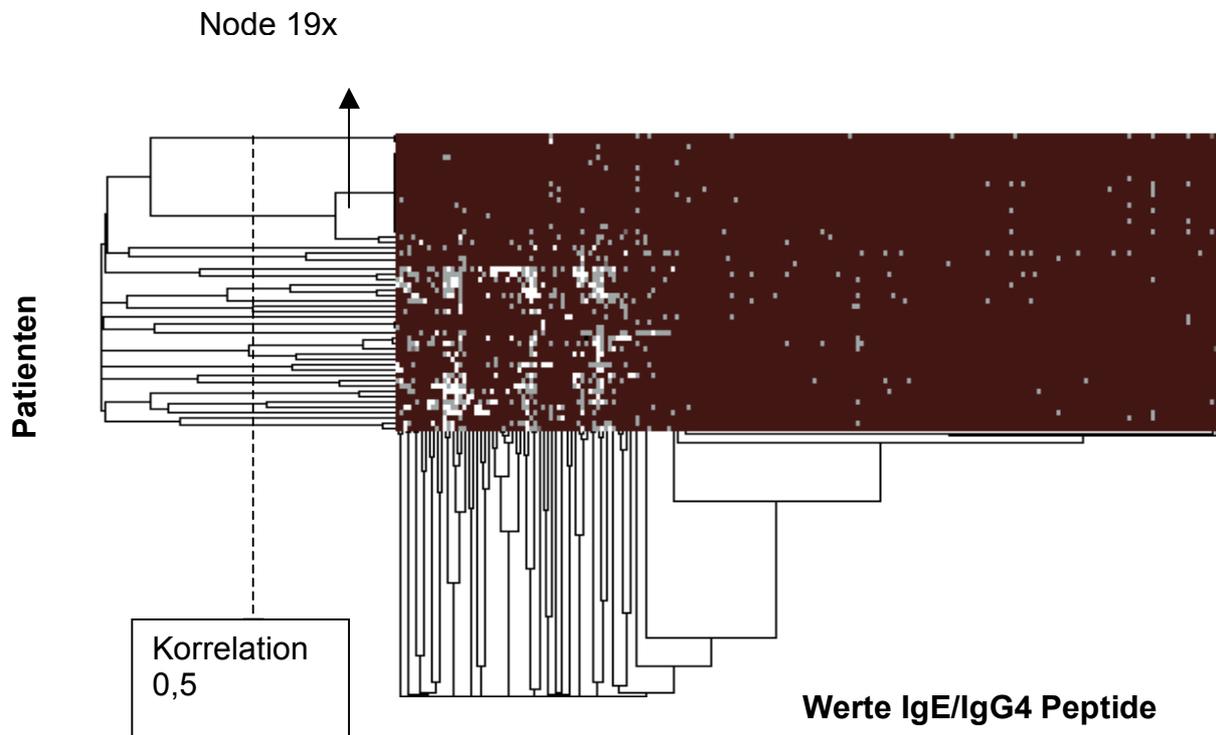


Abbildung 31: Clusteranalyse Sesamgruppe: erdnussallergische/ sesamallergische Patienten, erdnussallergische/ sesamtolerante Patienten, Kontrollseren. Gestrichelter Pfeil: Korrelation 0,5.

4.2.2.2 Analyse der Häufigkeiten von IgE-Bindungen in den verschiedenen Gruppen

Da mit den Clusteranalysen keine Einteilung der Patienten gemäß klinischer Reaktivität möglich ist, werden im Folgenden die Unterschiede der Gruppen in der Bindung an einzelnen Peptiden untersucht. Dazu wurde für jede Baumnuss/ Sesam verglichen, wie viele Patienten der jeweiligen Gruppe unabhängig von der Höhe der einzelnen Fluoreszenzwerte an einem Peptid binden.

4.2.2.2.1 Häufigkeitsanalyse Walnussgruppe

Es wurden die walnussallergischen, erdnussallergischen Patienten, die ein Peptid erkennen, den walnusstoleranten, erdnussallergischen Patienten gegenübergestellt (Abbildungen 32 – 35). Die Höhe der Balken in den Abbildungen zeigt an, wie viel Prozent der Patienten pro Gruppe das jeweilige Peptid erkannten.

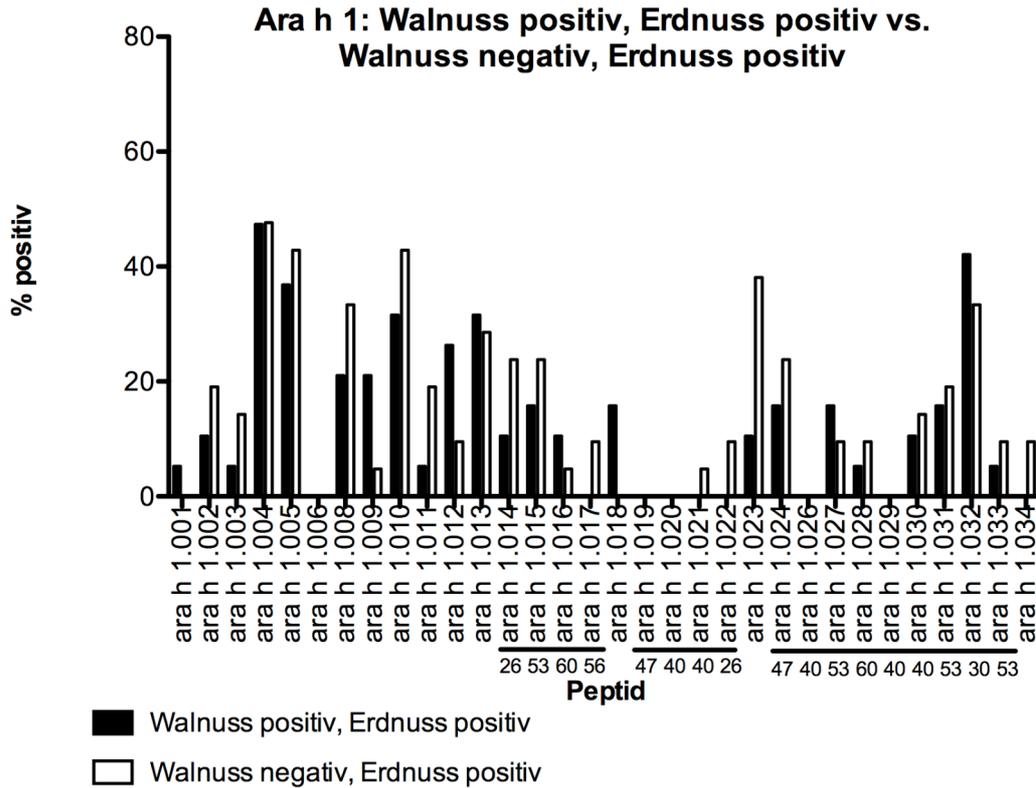


Abbildung 32: IgE Bindungen am Erdnuss 7S Globulin Ara h 1. Dargestellt ist, welcher Anteil der Patienten jeder Gruppe an einem Peptid bindet. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Jug r 2 aufweisen, sind gekennzeichnet.

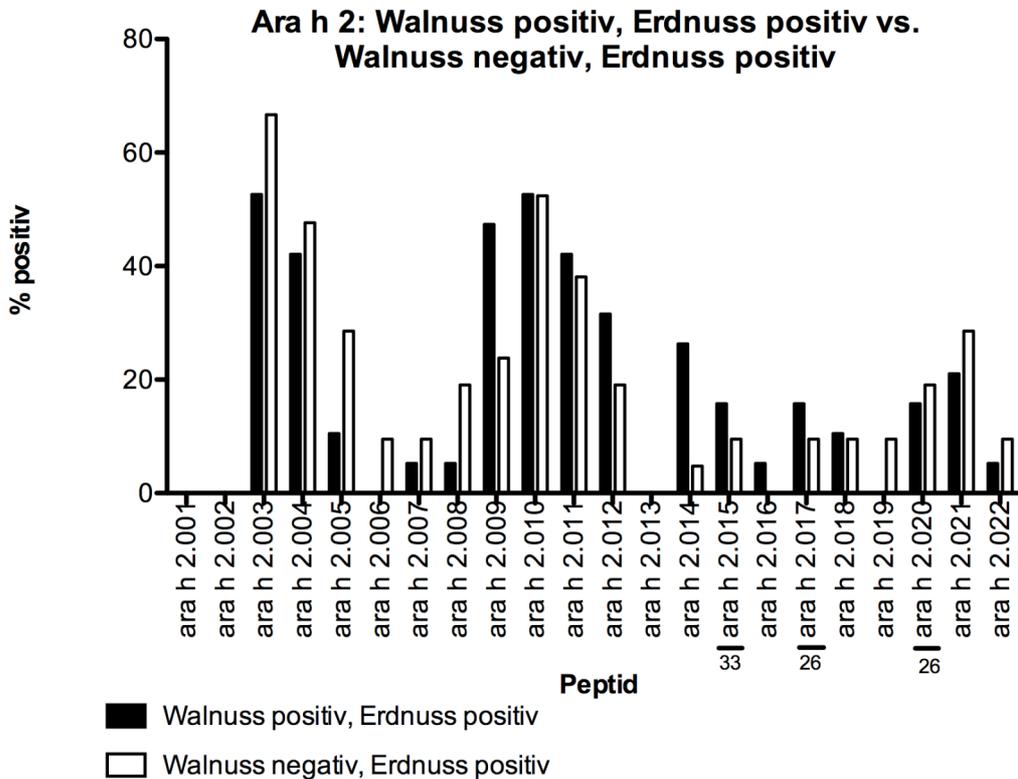


Abbildung 33: IgE Bindungen am 2S Albumin der Erdnuss, Ara h 2. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Jug r 1 aufweisen, sind gekennzeichnet.

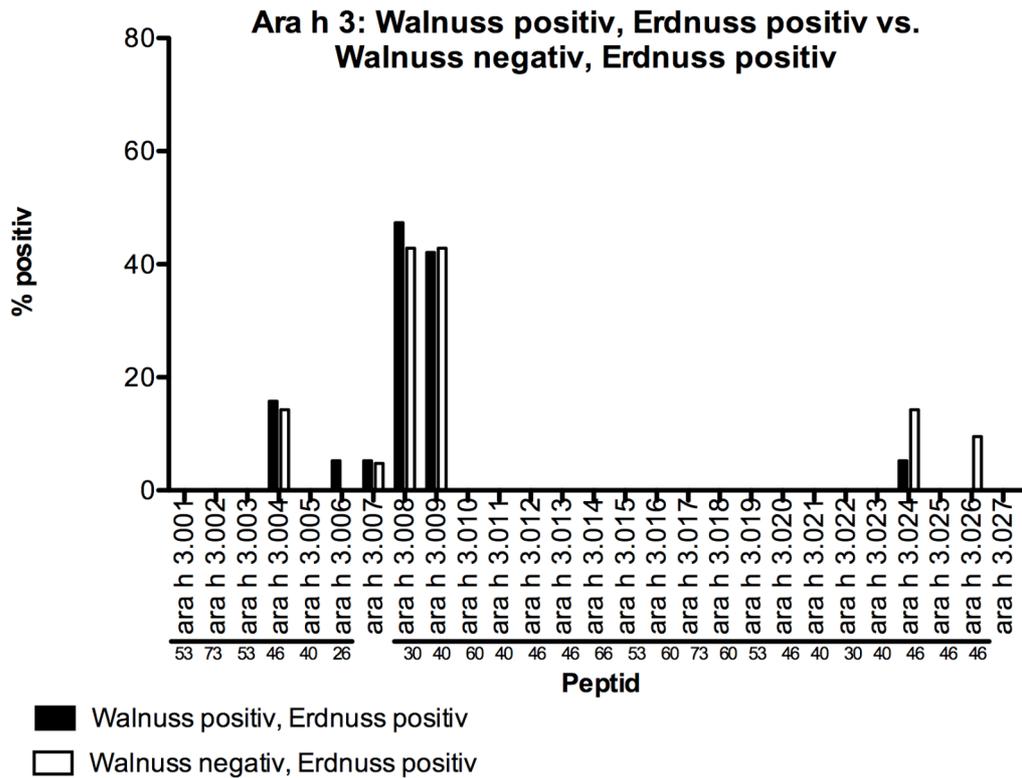


Abbildung 34: IgE Bindungen am 11S Globulin der Erdnuss, Ara h 3. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Jug r 4 aufweisen, sind gekennzeichnet.

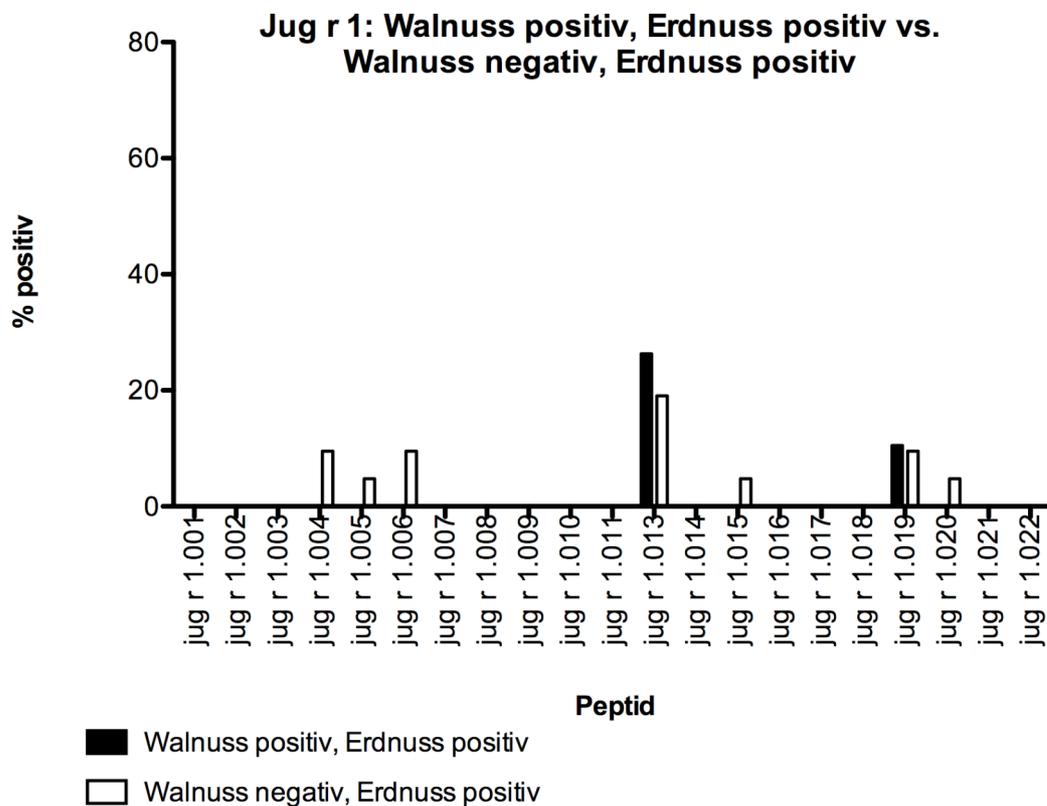


Abbildung 35: IgE Bindungen an den Walnusspeptiden.

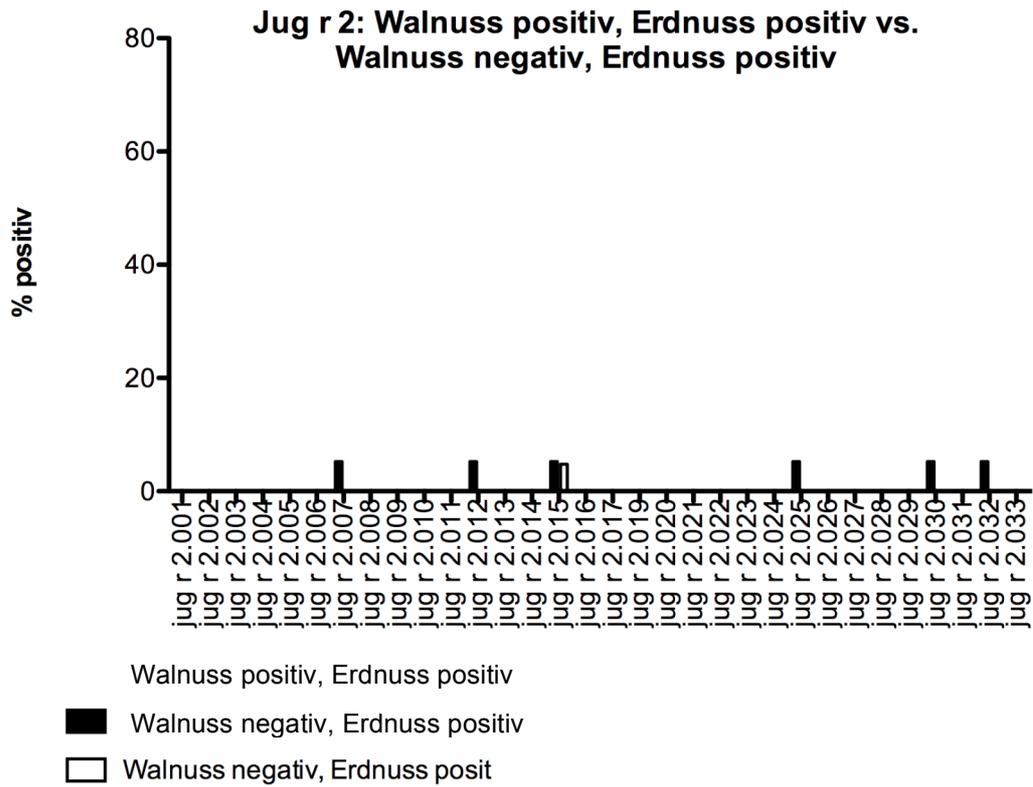


Abbildung 36: IgE-Bindungen an Walnusspeptiden

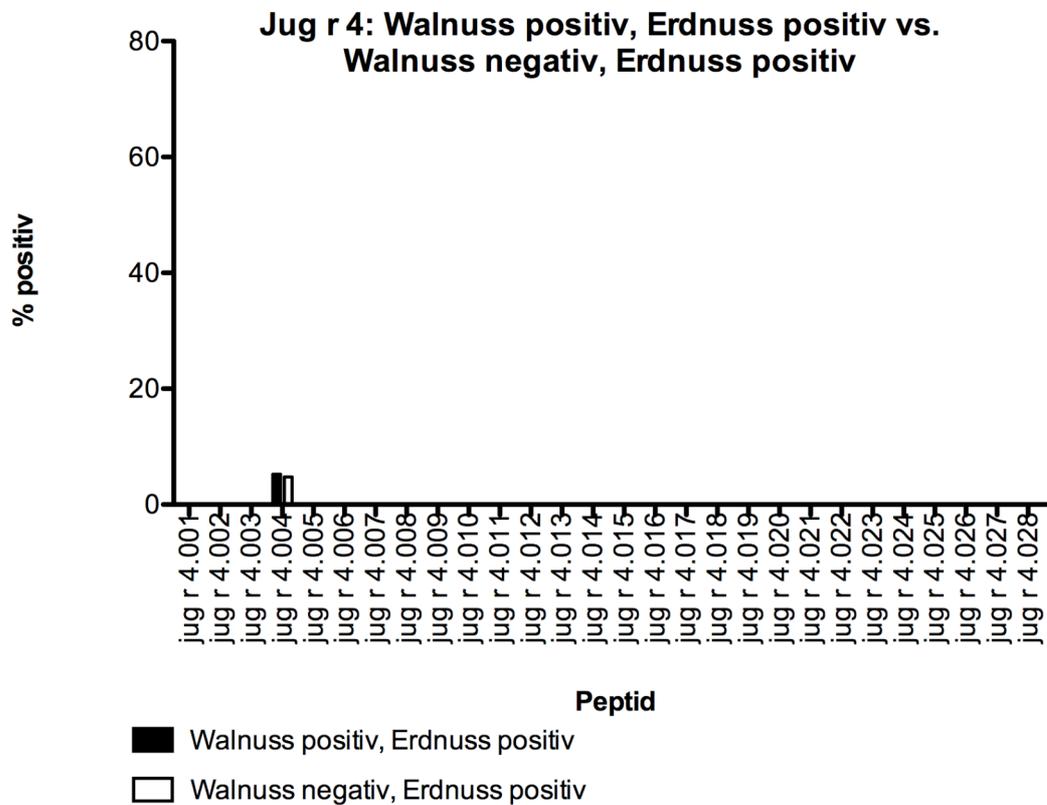


Abbildung 37: IgE-Bindung an Walnusspeptiden

Zum Vergleich der Häufigkeit der Bindung an den Peptiden in den beiden untersuchten Patientengruppen wurde zunächst für jedes Peptid ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Nach Bonferroni-Korrektur wegen multiplen Testens war keins der Ergebnisse signifikant. Es konnte also kein zur Unterscheidung der Gruppen geeignetes Peptid identifiziert werden.

Daneben wurde verglichen wie viele Peptide die einzelnen Patienten in den beiden Gruppen erkennen (Abbildung 38). Die Unterschiede zwischen den untersuchten erdnussallergischen, walnussallergischen und die erdnussallergischen, walnusstoleranten Patienten waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

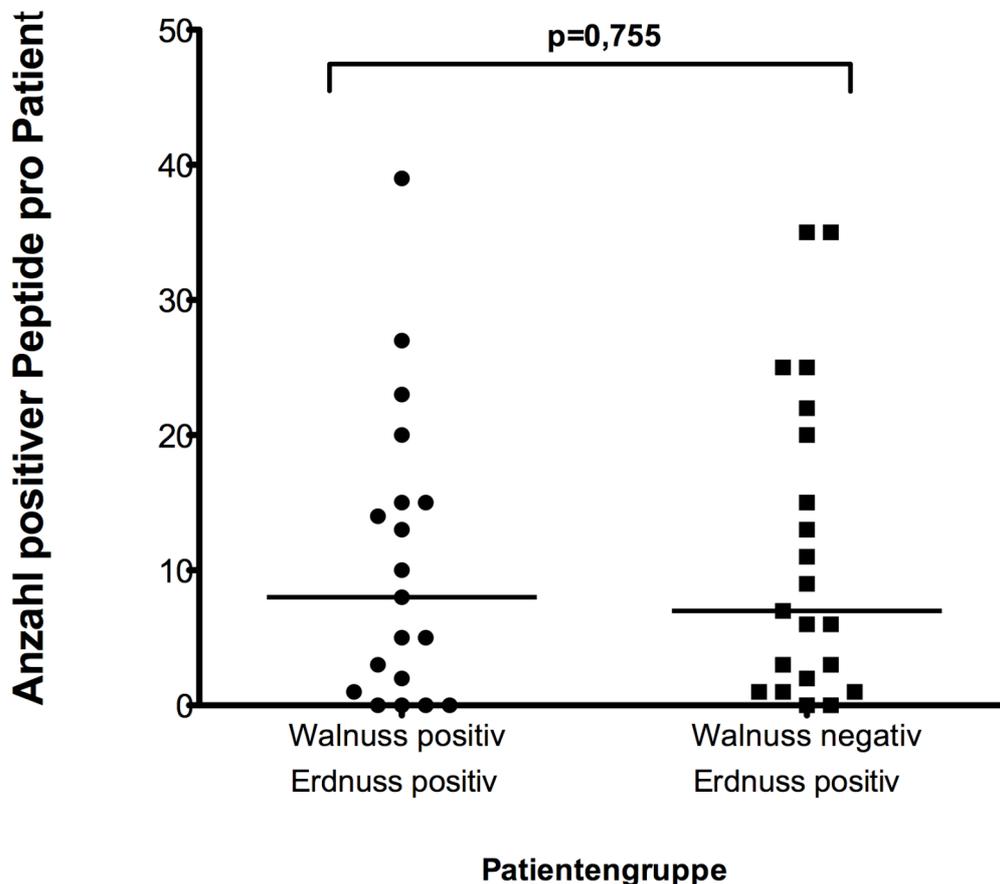


Abbildung 38: Anzahl der positiven Peptide pro Patient bei den Walnusspatienten (von allen untersuchten Erdnuss- und Walnusspeptiden).

In Abbildung 32 - Abbildung 37 sind Regionen großer Homologie markiert. Viele der nachgewiesenen Bindungen liegen nicht in stark konservierten Regionen. Sowohl walnusstolerante als auch walnussallergische Patienten erkennen nur selten

Walnusspeptide. Nur ein Walnusspeptid (Jug r 1.013) wird von mehr als 20% der Patienten einer Gruppe erkannt (Abbildung 35).

Nach der Hypothese, dass die Ähnlichkeit der Peptidsequenzen für die klinische Kreuzreaktivität verantwortlich ist, müssten bei Sequenzen großer Ähnlichkeit sowohl Erdnuss- als auch Walnusspeptide Bindungen zeigen. Dies wurde an Peptiden mit häufiger Bindung und großer Aminosäurehomologie geprüft. Es wurden Peptide untersucht, die im Vergleich zur korrespondierenden Walnusssequenz mindestens 30% identische Aminosäuren aufweisen und von mindestens 20% der Patienten mindestens einer Gruppe erkannt werden. Dies trifft für Ara h 1.015, Ara h 1.024 und Ara h 1.032 zu (Tabelle 7). Auch an diesen häufig erkannten Peptiden finden sich aber nur wenige Bindungen an den korrespondierenden Walnusssequenzen.

Tabelle 7: Vergleich der IgE-Bindung an korrespondierenden Erdnuss- und Walnusssequenzen. Für die untersuchten Peptide ist die Hypothese, dass unabhängig von der Reaktivität auf Grund der Ähnlichkeit der Sequenzen gleich viele Patienten an beiden Sequenzen binden, abzulehnen. Untersucht werden hier alle erdnussallergischen Patienten (n=40), unabhängig davon, ob sie walnussallergisch (n=19) oder walnusstolerant (n=21) sind.

Peptidvergleich	Identische AS von Erdnuss- und Walnusspeptid	Anzahl der Bindungen am Erdnusspeptid	Anzahl der Bindungen am Walnusspeptid	Vergleich der Häufigkeit (Chi-Quadrat-Test)
Ara h 1.015 vs. Jug r 2.015	53%	8/40	2/40	p=0,043
Ara 1.024 vs. Jug r 2.024	46%	8/40	0/40	p=0,003
Ara h 1.032 vs. Jug r 2.032	33%	15/40	1/40	p=0,000

Wenn sich auch keine signifikanten Unterschiede in der IgE-Bindung an den einzelnen Peptiden im Vergleich der walnussallergischen und der walnusstoleranten Erdnussallergiker finden, sollen im Folgenden rein deskriptiv Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt werden, die sich in den Microarrays finden. Die betreffenden Peptide können als Kandidaten behandelt werden, die eine Unterscheidung der Gruppen doch möglich machen. Sie müssen gezielt weiter untersucht werden. In Abbildung 10 werden dazu die Peptide aus unseren Versuchen dargestellt, deren Häufigkeit der Bindung sich in den beiden Patientengruppen sich um >15% unterscheidet.

Die ebenfalls in Abbildung 39 dargestellten Walnusspeptide sind deutlich seltener positiv als die Erdnusspeptide. Eine Ausnahme ist Jug r 1.013, das im Vergleich zu Ara h 2.014 33% identische Aminosäuren aufweist. Es wird von ähnlich vielen Patienten erkannt wie Ara h 2.014. Dies sind aber nicht alle die gleichen Patienten

(Tabelle 8). Es kann aus dieser Beobachtung kein Rückschluss auf Kreuzreaktivität gezogen werden.

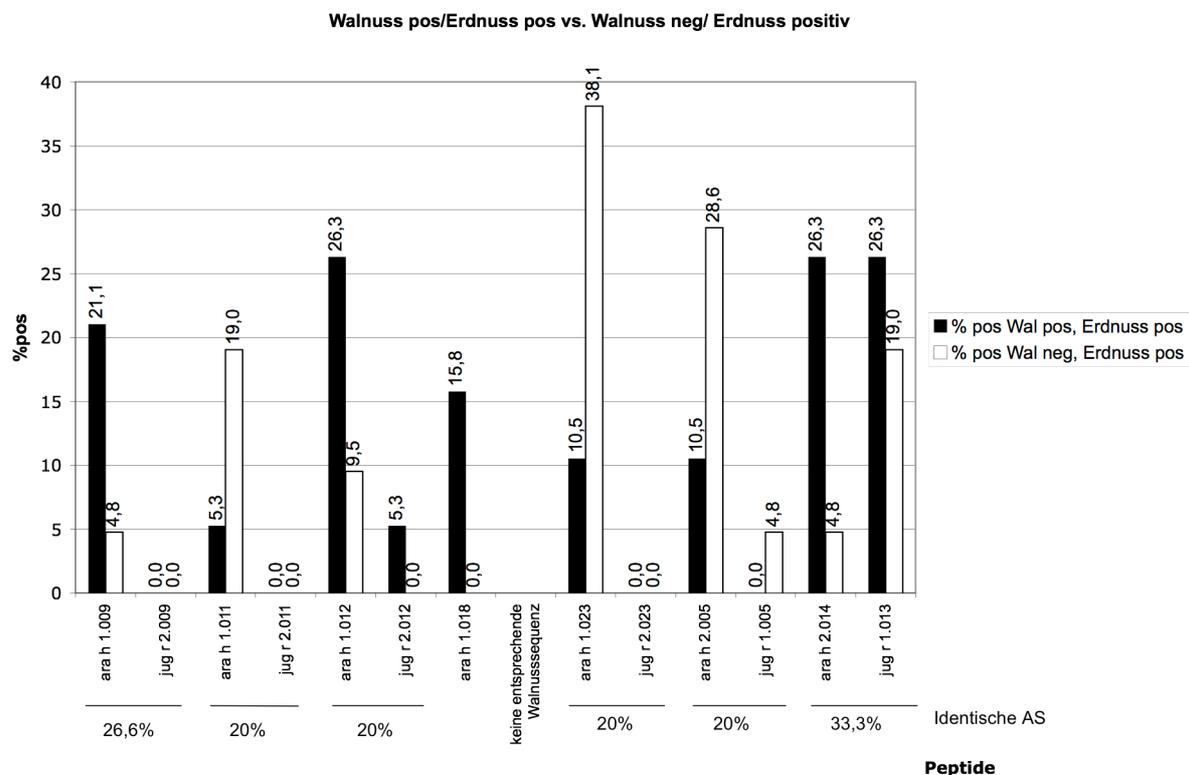


Abbildung 39: Peptide, die bei walnussallergischen/ erdnussallergischen und walnusstoleranten/ erdnussallergischen Patienten unterschiedlich häufig positiv sind. Absolute Differenz >15%. Diese Peptide sind Kandidaten, die eine Unterscheidung der Gruppen möglich machen könnten. Daneben sind die zu den Erdnusspeptiden sequenzhomologen Walnusspeptide abgebildet.

Tabelle 8: Dargestellt sind alle walnussallergischen und walnusstoleranten Patienten, die entweder Ara h 2.014 oder Jug r 1.013 erkennen. Die Patienten, die an Ara h 2.014 positiv sind, erkennen nur zum Teil auch Jug r 1.013. Patienten No. 6 und 7 erkennen nur Jug r 1.013 und nicht Ara h 2.014. Die walnusstoleranten Patienten, die IgE gegen Jug r 1.013 haben, haben fast alle auch IgG 4 gegen diese Sequenz.

Klinik	Patient	Ara h 2.014: IgE	Jug r 1.013: IgE	Jug r 1.013: IgG4
Walnuss positiv/ Erdnuss positiv	1	X	X	X
	2	X	X	-
	3	X	X	-
	4	X	-	-
	5	X	-	X
	6	-	X	-
	7	-	X	X
Walnuss negativ/ Erdnuss positiv	8	X	X	X
	9	-	X	X
	10	-	X	X
	11	-	X	X
	12	-	X	-

4.2.2.2.2 Häufigkeitsanalyse Haselnusspatienten

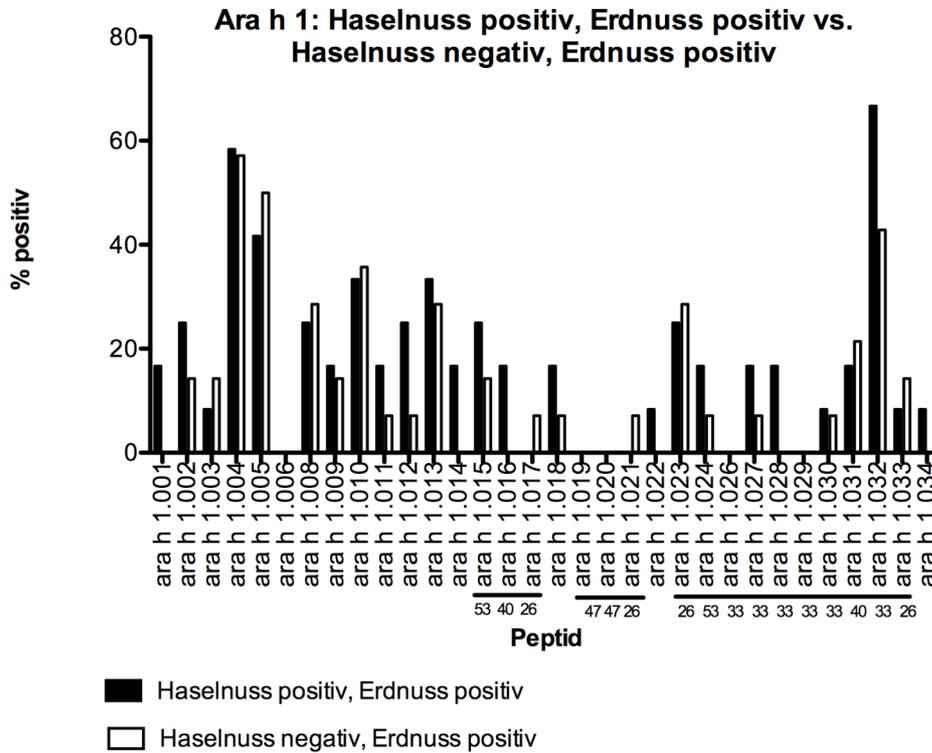


Abbildung 40: Häufigkeit von IgE Bindung an Peptide vom Erdnuss 7 S Globulin Ara h 1. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Cor a 11 aufweisen, sind gekennzeichnet.

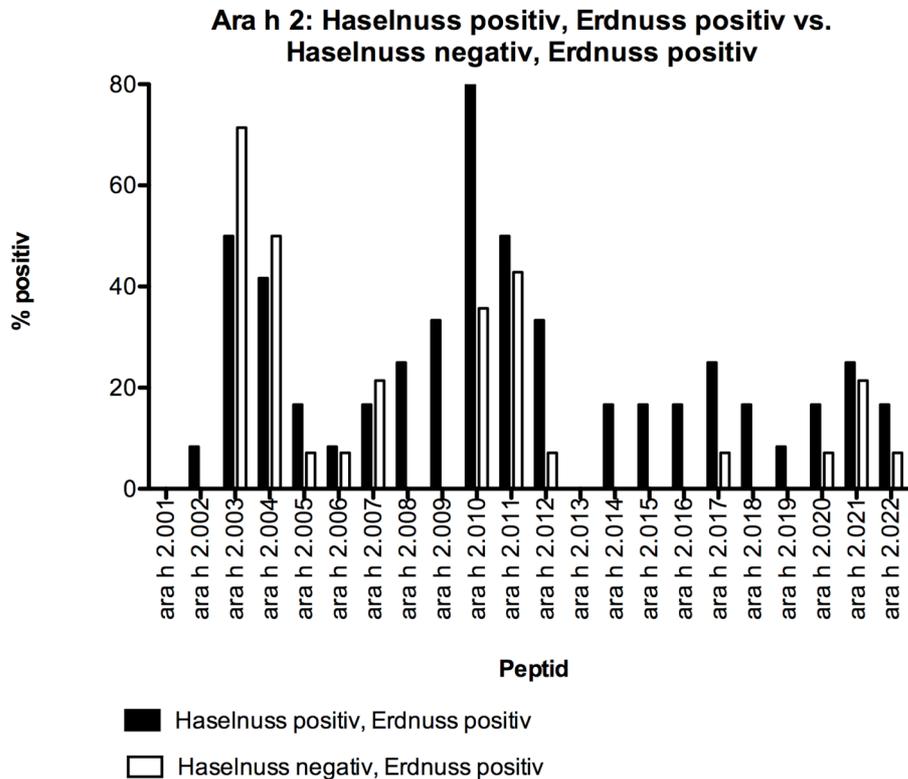


Abbildung 41: Häufigkeit von IgE Bindung am 2 S Albumin der Erdnuss, Ara h 2.

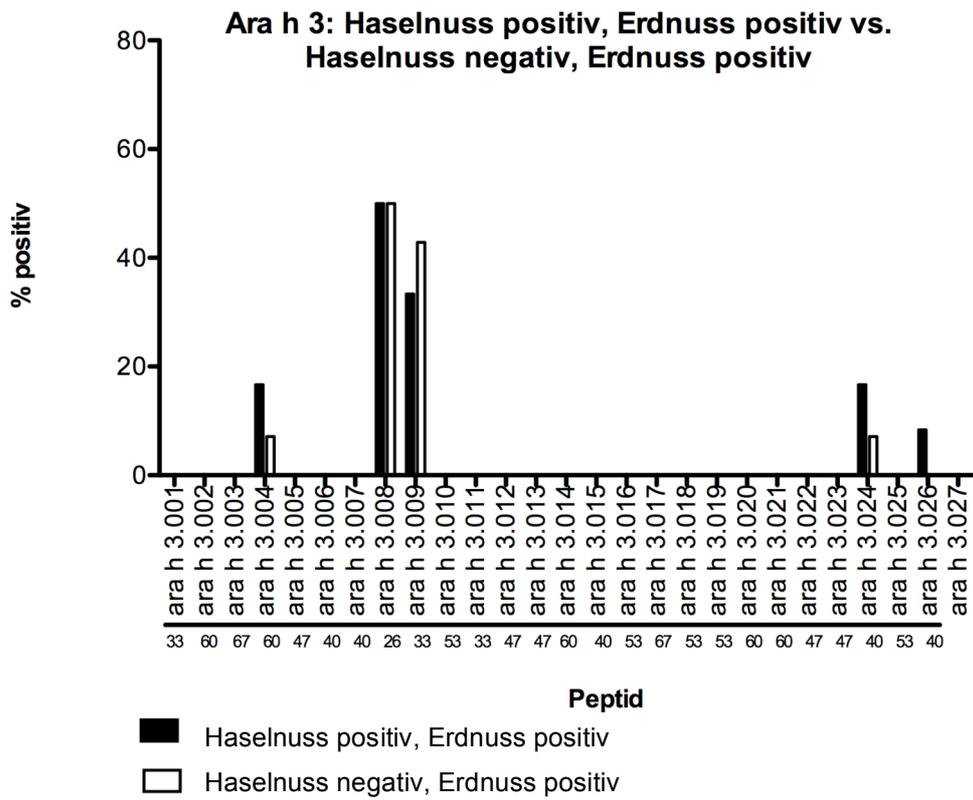


Abbildung 42: IgE Bindung am 11 S Globulin der Erdnuss, Ara h 3. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Cor a 9 aufweisen, sind gekennzeichnet.

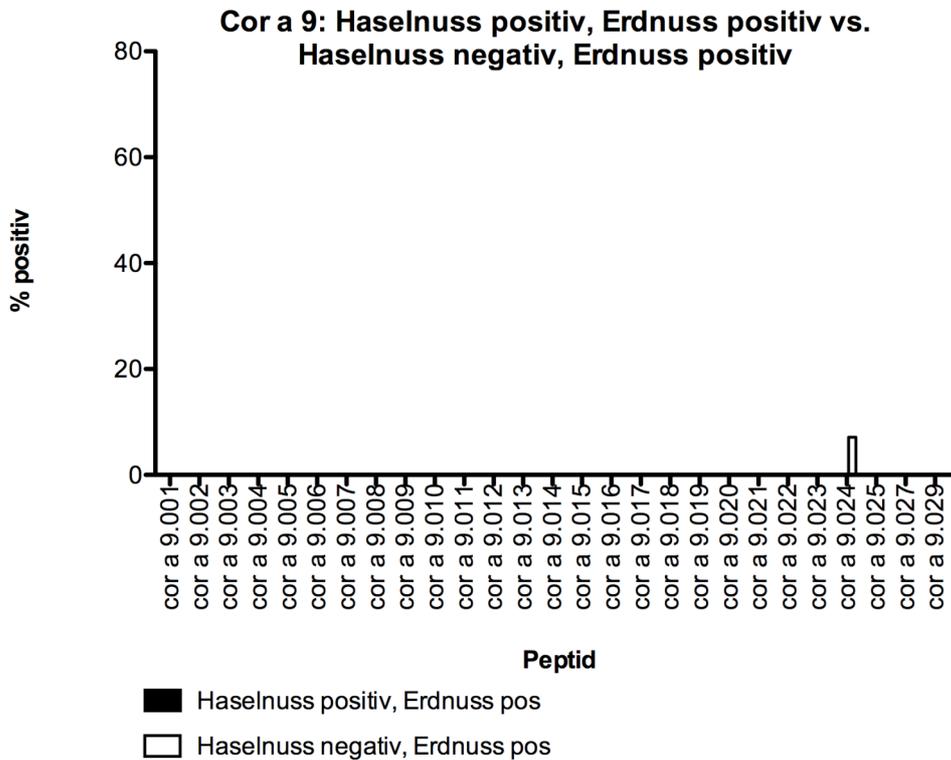


Abbildung 43: Bindungen an den Haselnusspeptiden von Cor a 9 (11 S Globulin)

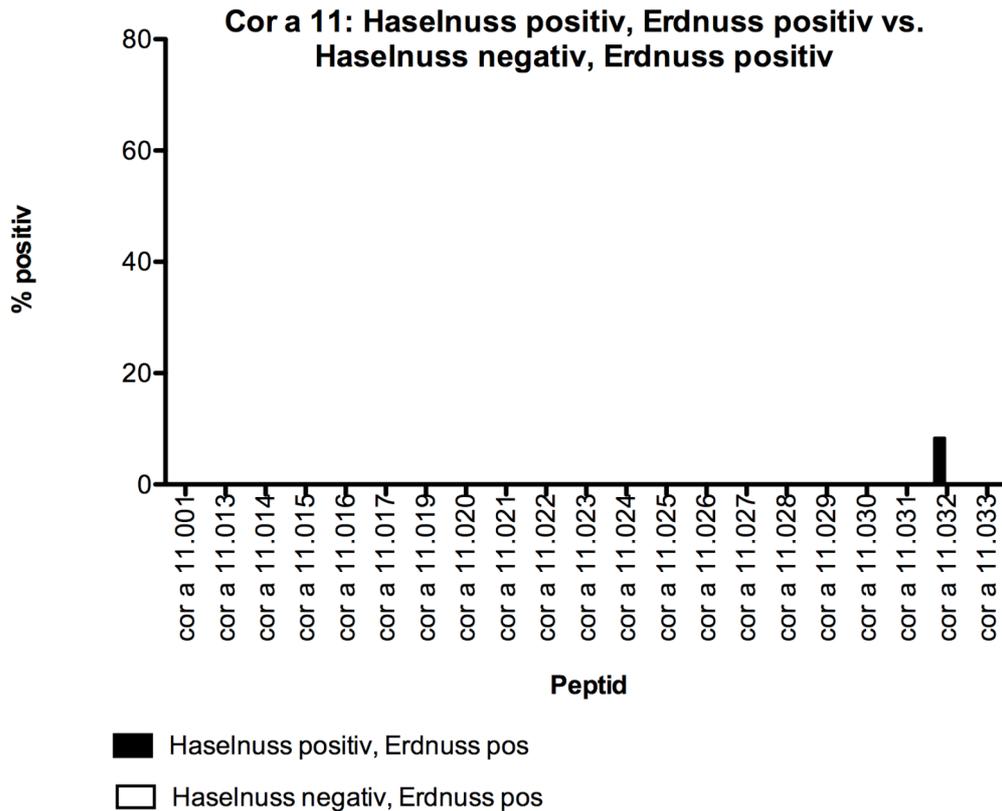


Abbildung 44: Bindungen an den Haselnusspeptiden von Cor a 11 (7S Globulin)

In Abbildung 40- Abbildung 44 sind die relativen Häufigkeiten von IgE-Bindungen an den untersuchten Peptiden von haselnussallergischen und haselnusstoleranten Erdnussallergikern gegenübergestellt.

Zum Vergleich der Häufigkeit der IgE-Bindung an die Peptide von Erdnuss- und Haselnussallergenen bei haselnussallergischen und haselnusstoleranten Erdnussallergikern wurden auch hier Chi-Quadrat-Tests für alle Peptide durchgeführt. Wegen multiplen Testens wurde auch hier das α -Niveau durch Bonferroni-Korrektur angepasst. Es fand sich mit dieser Methode kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Bindung an einem der Peptide. Es konnte also auf diese Weise kein Peptid gefunden werden, das für eine diagnostische Unterscheidung der Patientengruppen geeignet wäre.

Daneben wurde untersucht, ob die Patienten in den beiden Gruppen unterschiedlich viele Peptide erkennen (Abbildung 45). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test).

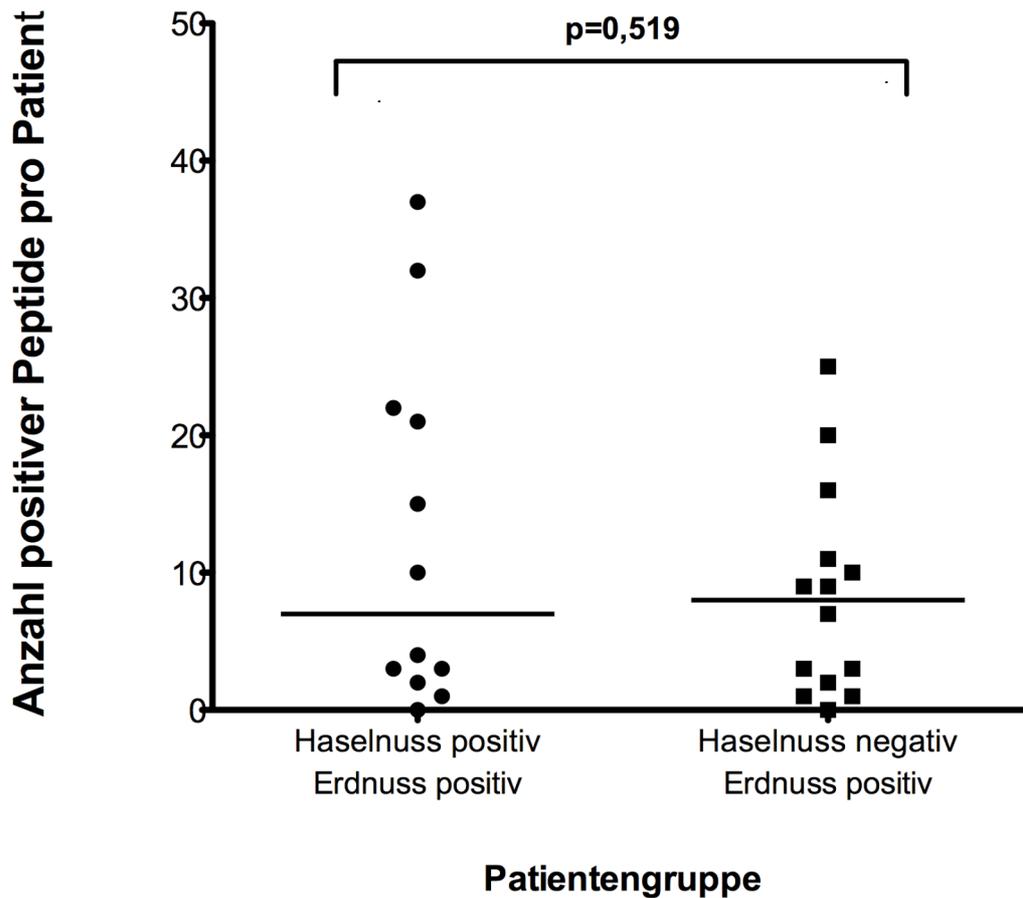


Abbildung 45: Anzahl von Peptiden mit IgE-Bindung in den untersuchten Patientengruppen. Patientengruppe 1: Haselnussallergische, erdnussallergische Patienten; Patientengruppe 2: Haselnusstolerante, erdnussallergische Patienten. Mann-Whitney-U-Test.

Im Folgenden werden einzelne Regionen dargestellt, die Hinweise auf Unterschiede zwischen den Gruppen liefern. Dies sind Peptide, bei denen der Anteil der positiven Werte in den beiden Gruppen um mehr als 15% auseinander liegt. Dieser Wert ist wie bei der Untersuchung der Walnussgruppe willkürlich gewählt. Er soll nur dazu dienen, Kandidatenpeptide zu definieren, die später weiter untersucht werden müssen. Peptide, auf die dieses Kriterium zutrifft, sind in Abbildung 46 dargestellt.

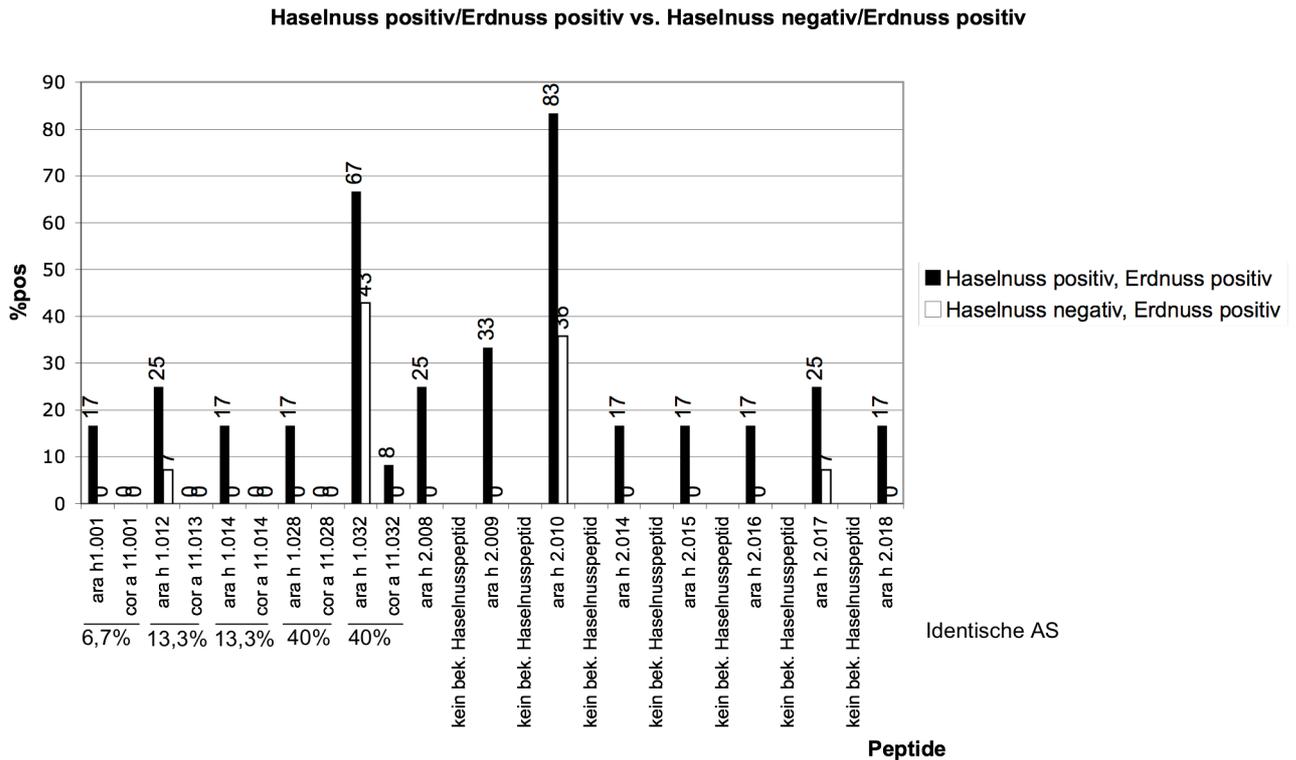


Abbildung 46: Peptide, die von haselnussallergischen und haselnusstoleranten Patienten unterschiedlich oft gebunden werden. Diese können als Kandidatenpeptide gezielt weiter untersucht werden. Besonders große Unterschiede finden sich bei Ara h 2.008, 009 und 010. Die p-Werte im Chi-Quadrat-Test sind hier 0,047, 0,019 und 0,014 (wegen multiplen Testens aber nicht signifikant).

Besonders bei Ara h 2.008, 009 und 010 finden sich große Unterschiede. Die p-Werte der Einzeltests an den drei Ara h 2-Peptiden sind $<0,05$ (0,047, 0,019 und 0,014). Dies ist zwar auf Grund der Anpassung des α -Fehlers bei multipltem Testen nicht signifikant. Es handelt sich aber hier um überlappende Peptide, so dass Ara h 2.008 noch 5 Aminosäuren mit Ara h 2.010 teilt. Drei der fünf haselnusstoleranten Patienten, die Ara h 2.010 erkennen, sind haselnussensibilisiert (spezifisches IgE 6,05; 2,47; 1,03kU/l), bei einem war das spezifische IgE gegen Haselnuss nicht bekannt. Damit wird hier nicht nur ein diagnostisches Kandidatenpeptid identifiziert, sondern auch eine mögliche Sequenz als Primer für die Suche nach einem Haselnuss-2S-Albumin.

4.2.2.2.3 Häufigkeitsanalyse Sesampatienten

In Abbildung 47- Abbildung 53 werden die Peptidbindungen von sesamallergischen und sesamtoleranten erdnussallergischen Patienten gegenübergestellt.

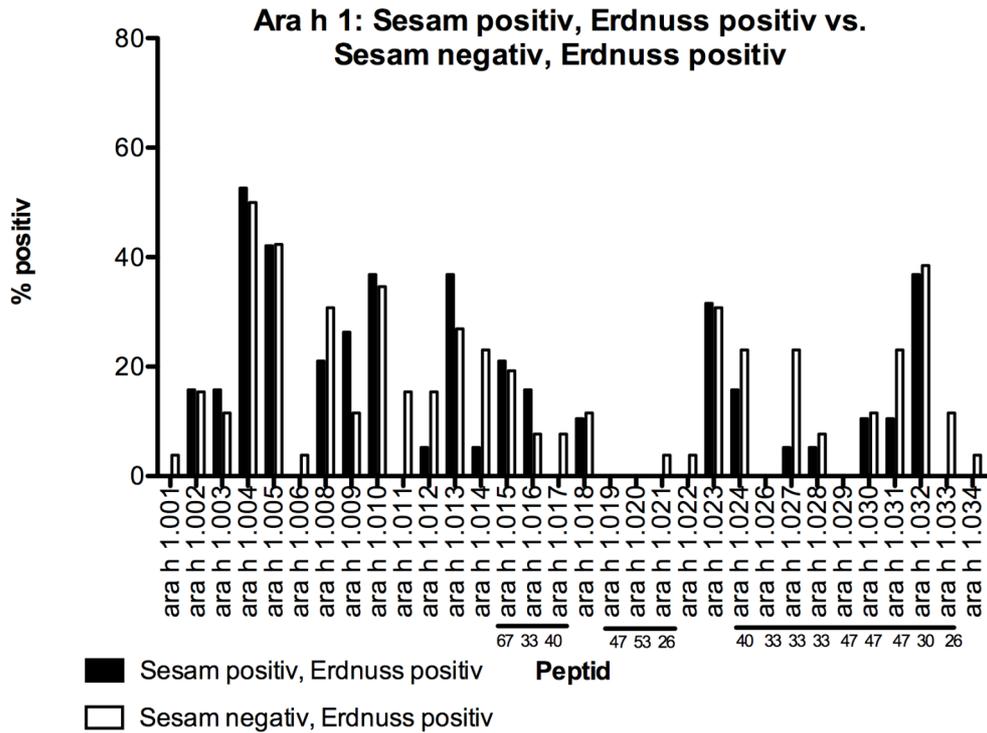


Abbildung 47: Häufigkeit der IgE-Bindungen an Peptide vom Erdnuss 7 S Globulin Ara h 1. Sesamallergische, erdnussallergische Patienten und sesamtolerante, erdnussallergische Patienten. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Ses i 3 aufweisen, sind gekennzeichnet.

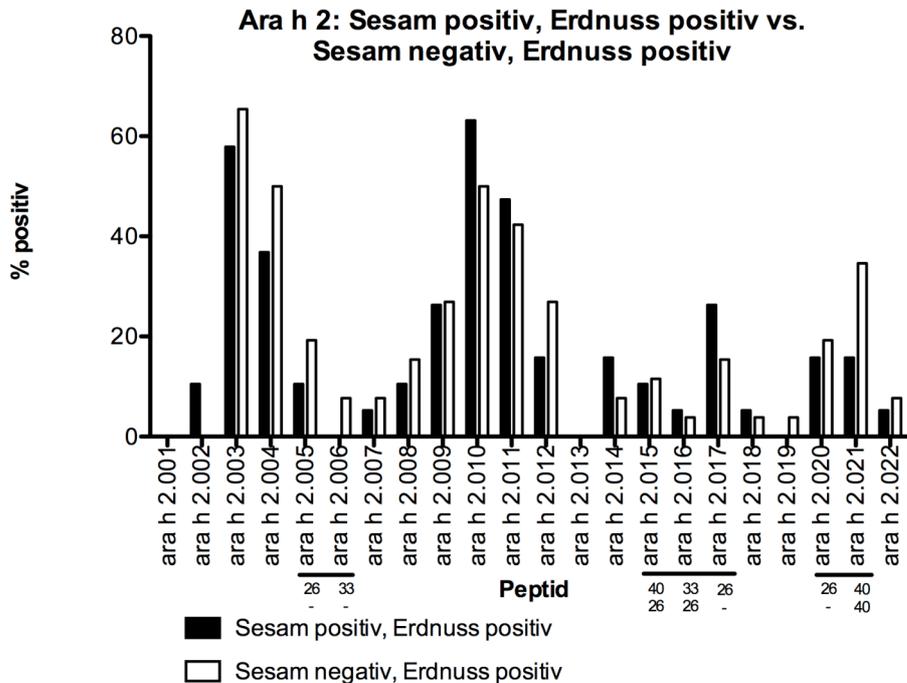


Abbildung 48: Häufigkeit der Bindungen am 2 S Albumin der Erdnuss, Ara h 2. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Ses i 2 (obere Zahl) bzw. Ses i 1 (untere Zahl) aufweisen, sind gekennzeichnet.

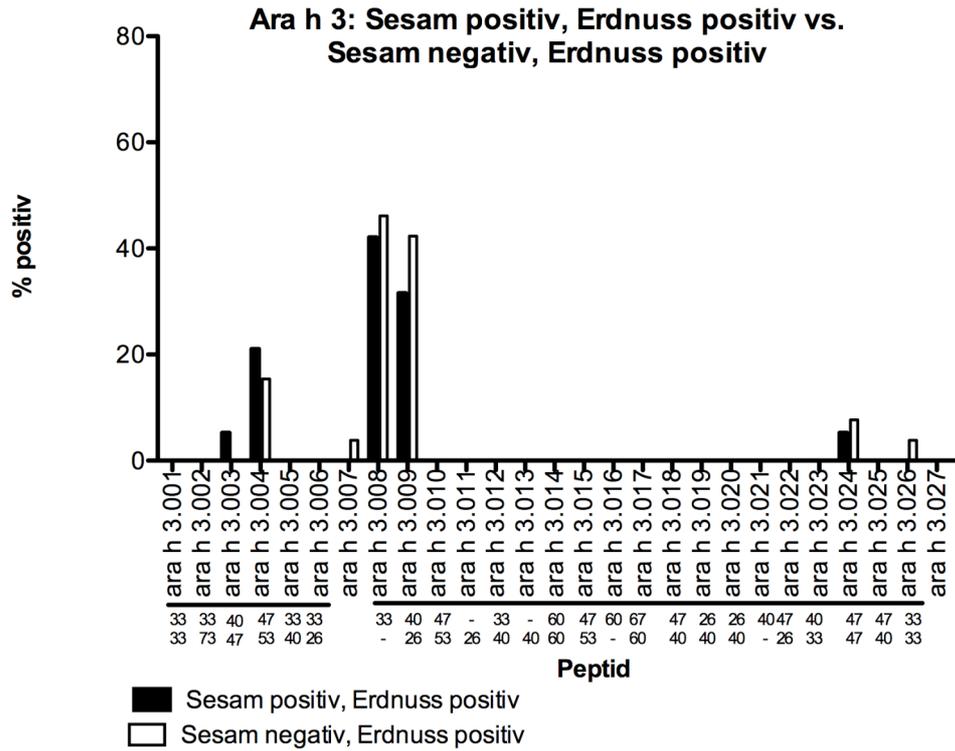


Abbildung 49: Häufigkeit von Bindungen am 11 S Globulin der Erdnuss, Ara h 3. Peptide, die >25% identische Aminosäuren mit Ses i 6 (obere Zahl) bzw. Ses i 7 (untere Zahl) aufweisen, sind gekennzeichnet.

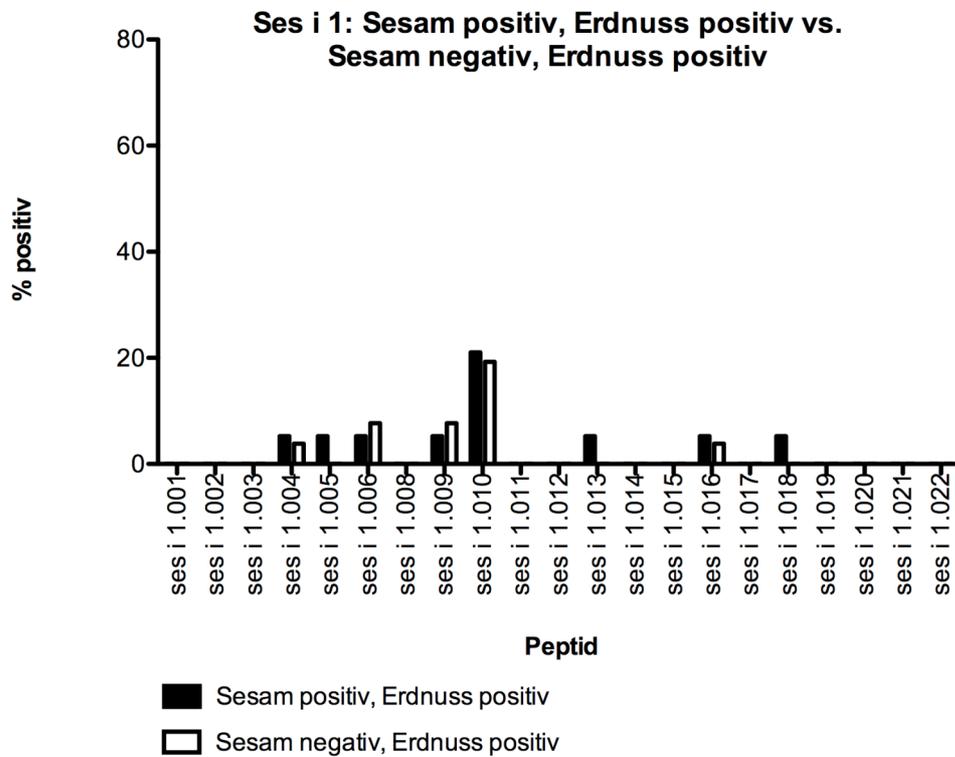


Abbildung 50: Häufigkeit der Bindung an Sesameptide: 2 S Albumin von Sesam , Ses i 1.

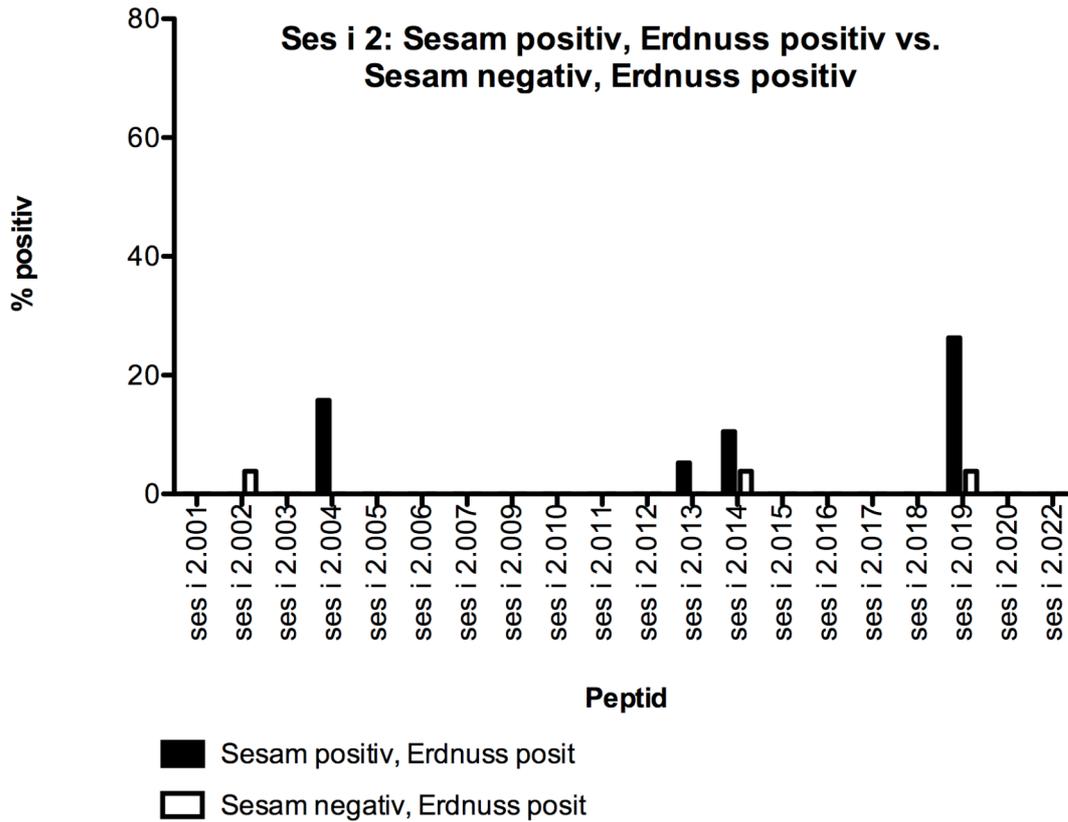


Abbildung 51: Häufigkeit der Bindung an Sesampeptide: 2 S Albumin von Sesam , Ses i 2.

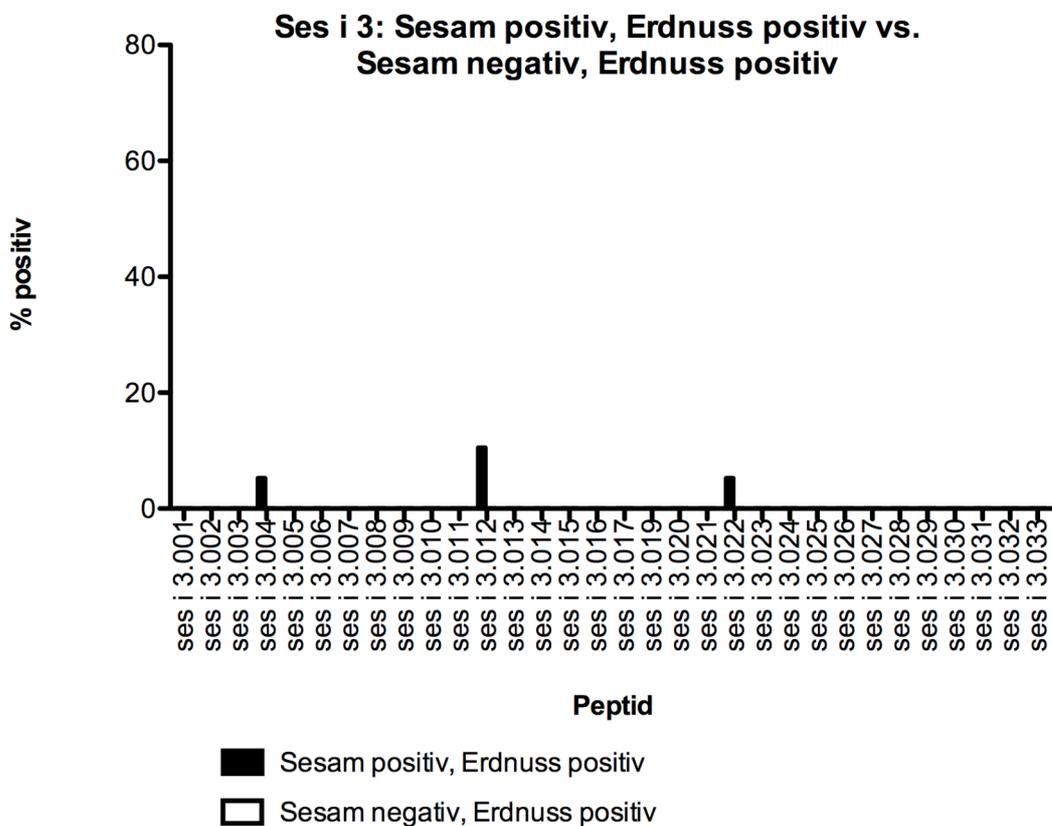


Abbildung 52: Häufigkeit der Bindung an Sesampeptide: 7S Globulin, Ses i 3.

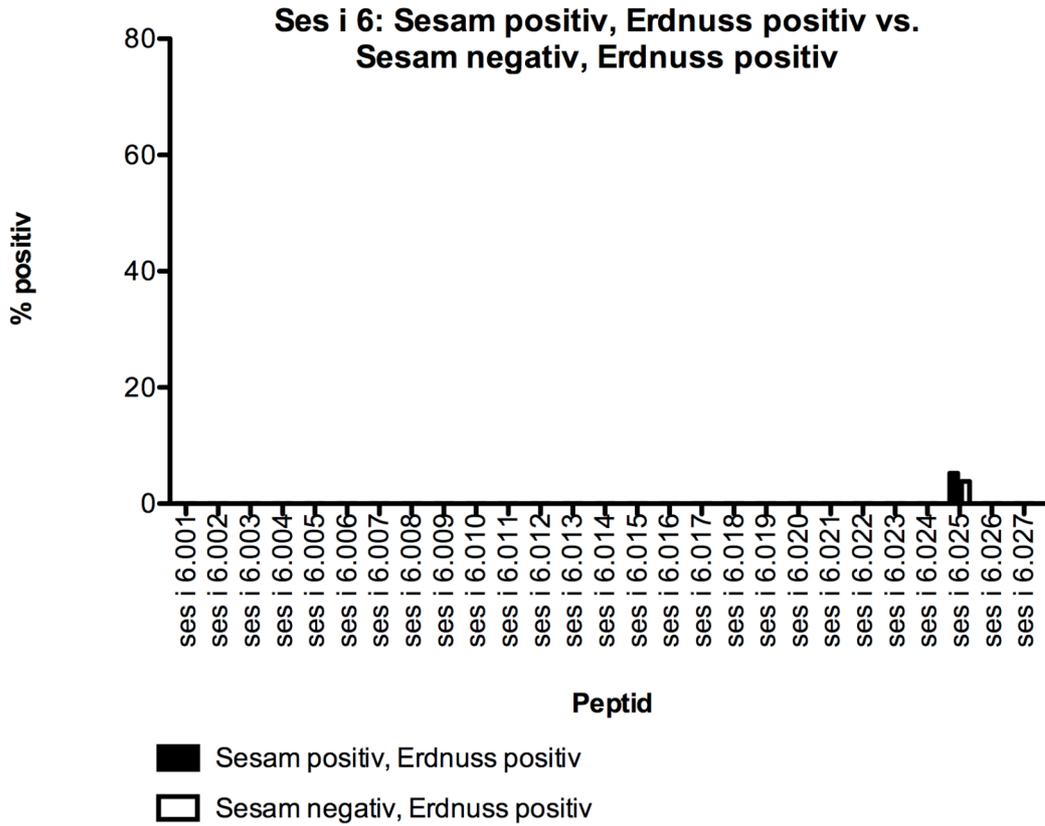


Abbildung 53: Häufigkeit der Bindung an den untersuchten Peptiden von Ses i 6 (11 S Globulin)

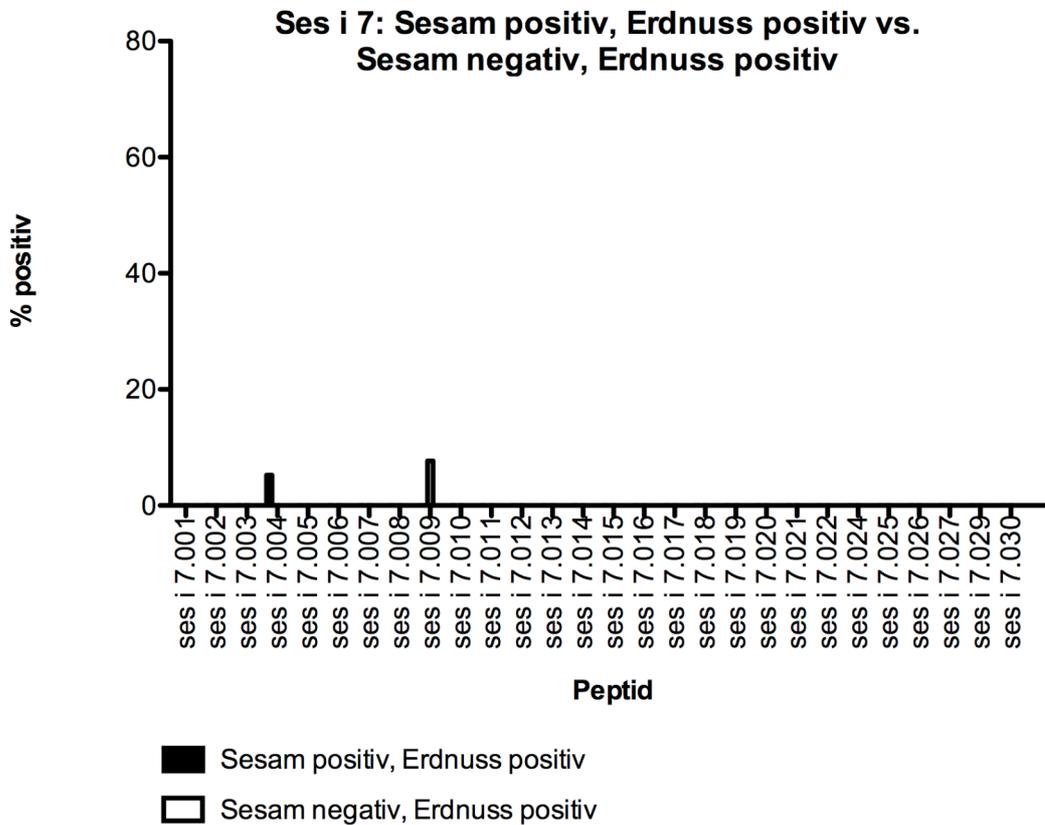


Abbildung 54: Häufigkeit der Bindung an Sesampeptide: Ses i 7, 11S Globulin.

Auch hier wurden die Häufigkeiten an den einzelnen Peptiden mit Chi-Quadrat-Tests untersucht. Wegen α -Fehler Kumulierung bei multiplem Testen wurde auch hier eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Es fanden sich mit diesem Vorgehen an keinem der untersuchten Peptide signifikante Unterschiede zwischen sesamallergischen und sesamtoleranten Erdnussallergikern.

Daneben wurde untersucht, wie viele Peptide die einzelnen Patienten in den beiden Gruppen binden (Abbildung 55). Es finden sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Mann-Whitney-U-Test).

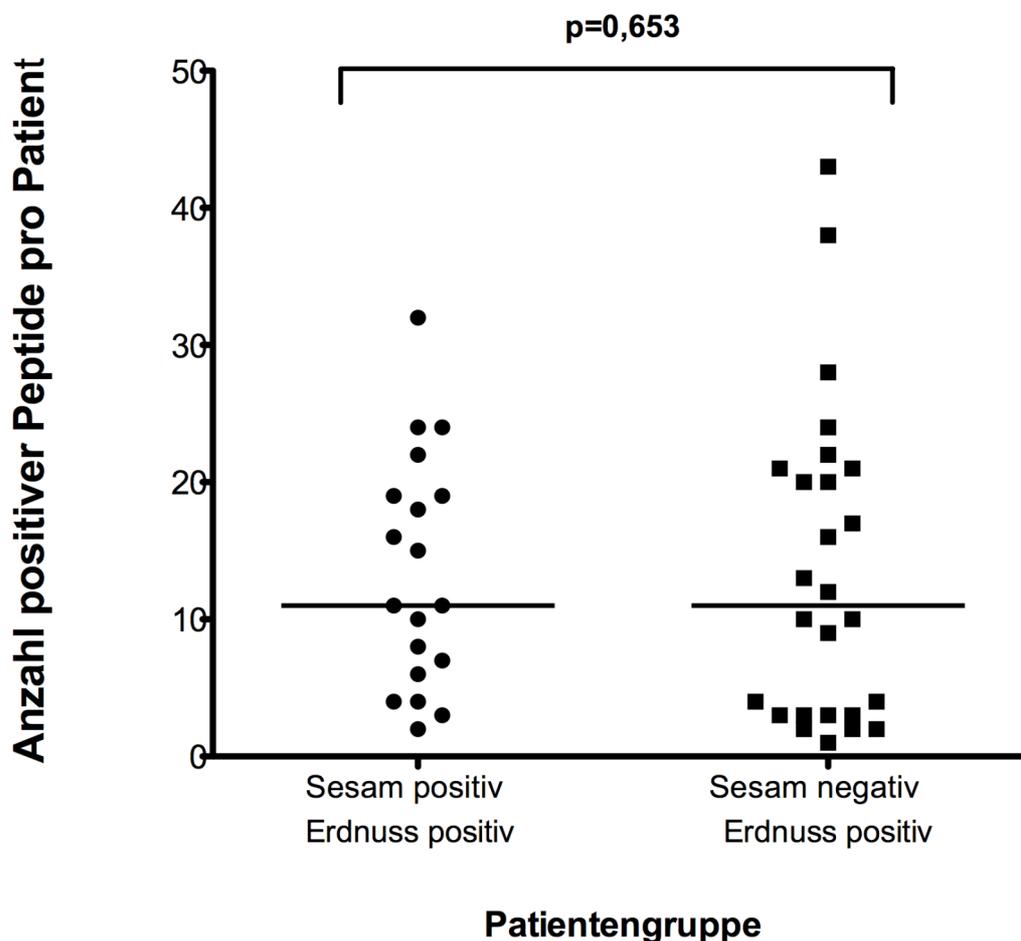


Abbildung 55: Anzahl von IgE Bindungen an Peptide in den beiden untersuchten Patientengruppen. Patientengruppe 1: Sesamallergische, erdnussallergische Patienten, Patientengruppe 2: Sesamtolerante, erdnussallergische Patienten. Mann-Whitney-U-Test.

Peptide, deren Anteile der Bindungen pro Gruppe um >15% unterschiedlich waren, sind in Abbildung 56 dargestellt.

Sesam positiv/Erdnuss positiv vs. Sesam negativ/Erdnuss positiv

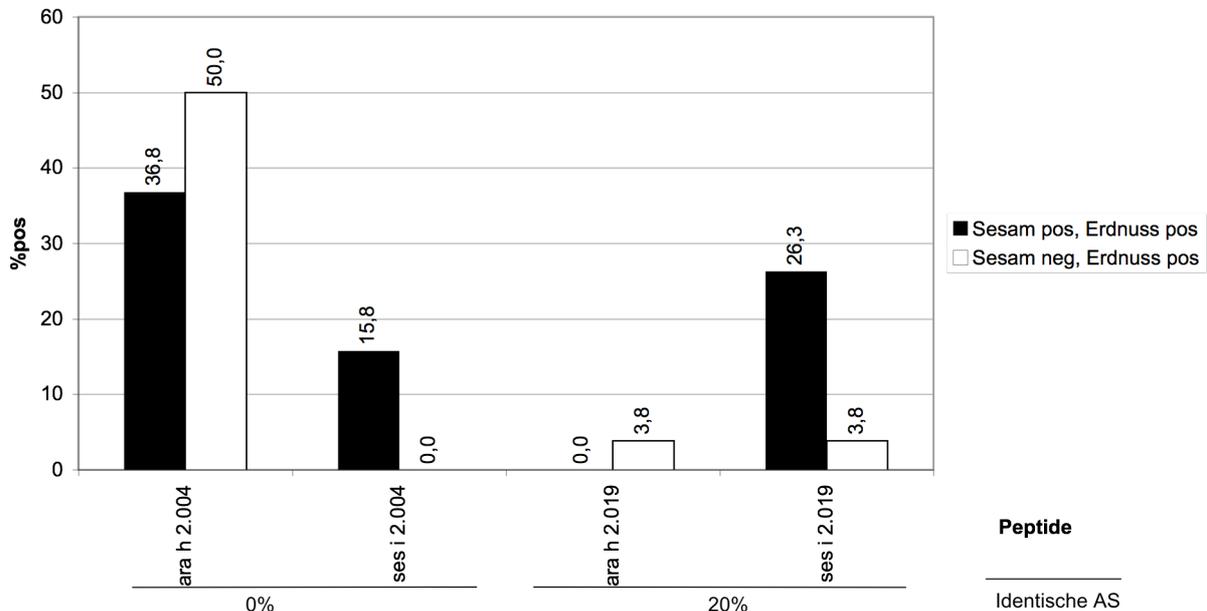


Abbildung 56: Sesampeptide, die von sesamallergischen und sesamtoleranten Erdnussallergikern unterschiedlich häufig erkannt werden. Diese sind Kandidatenpeptide, die für die Unterscheidung der Gruppen eine Rolle spielen können.

Unterschiede von >15% zwischen den Gruppen finden sich bei den Sesampeptiden Ses i 2.004 und Ses i 2.019. Der sesamtolerante Patient, der Ses i 2.019 positiv ist, ist sesamsensibilisiert (spezifisches IgE gegen Sesam 7,13kU/l). Diese Peptide sind damit Kandidatenpeptide für eine Unterscheidung der Patientengruppen, die weiter untersucht werden müssen.

4.2.2.3 Analyse der Häufigkeit der IgG4-Bindung in den verschiedenen Gruppen

Neben IgE-Bindungen an lineare Epitope wurde in den Experimenten auch IgG4 gemessen. Die Häufigkeit der IgG4-Bindungen in den unterschiedlichen Gruppen wird in Abbildung 57- Abbildung 75 dargestellt. Bis auf wenige Ausnahmen wurden die einzelnen Peptide von IgG4 von <20% der Patienten erkannt. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von IgG4 Bindung im jeweiligen Vergleich Baumnuss/ Sesam positiv versus Baumnuss/ Sesam tolerant (Chi-Quadrat-Test, Bonferroni Korrektur).

4.2.2.3.1 Häufigkeit der IgG4 Bindungen in der Walnussgruppe

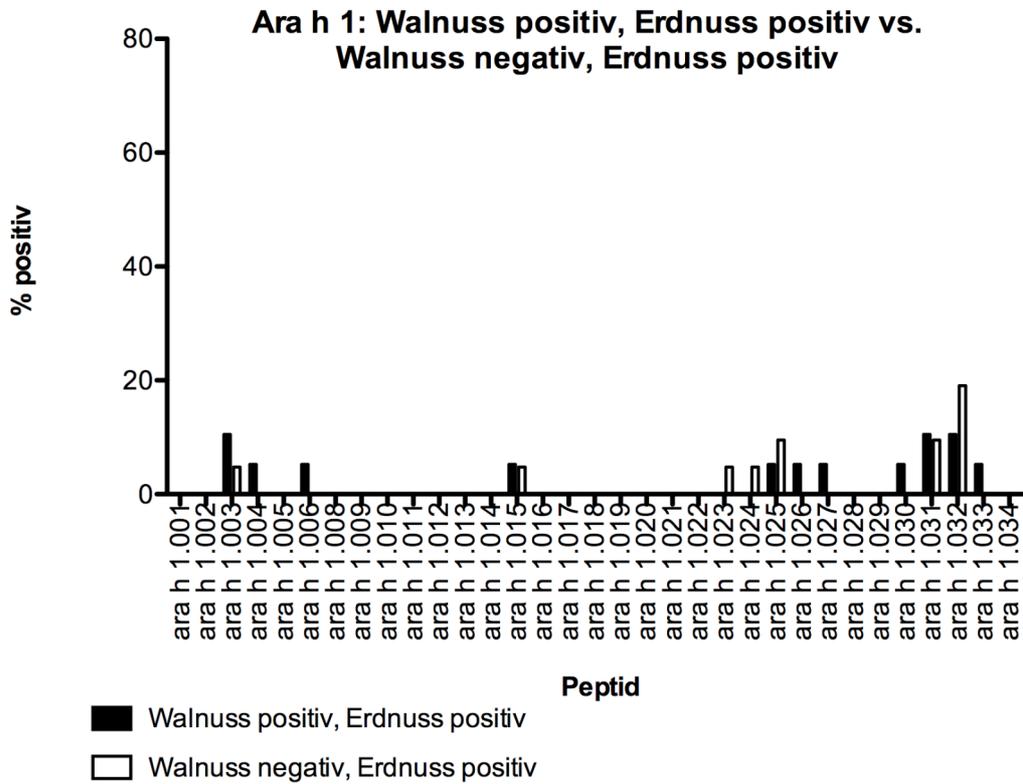


Abbildung 57: Häufigkeit der IgG4 Bindungen an den Peptiden von Ara h 1.

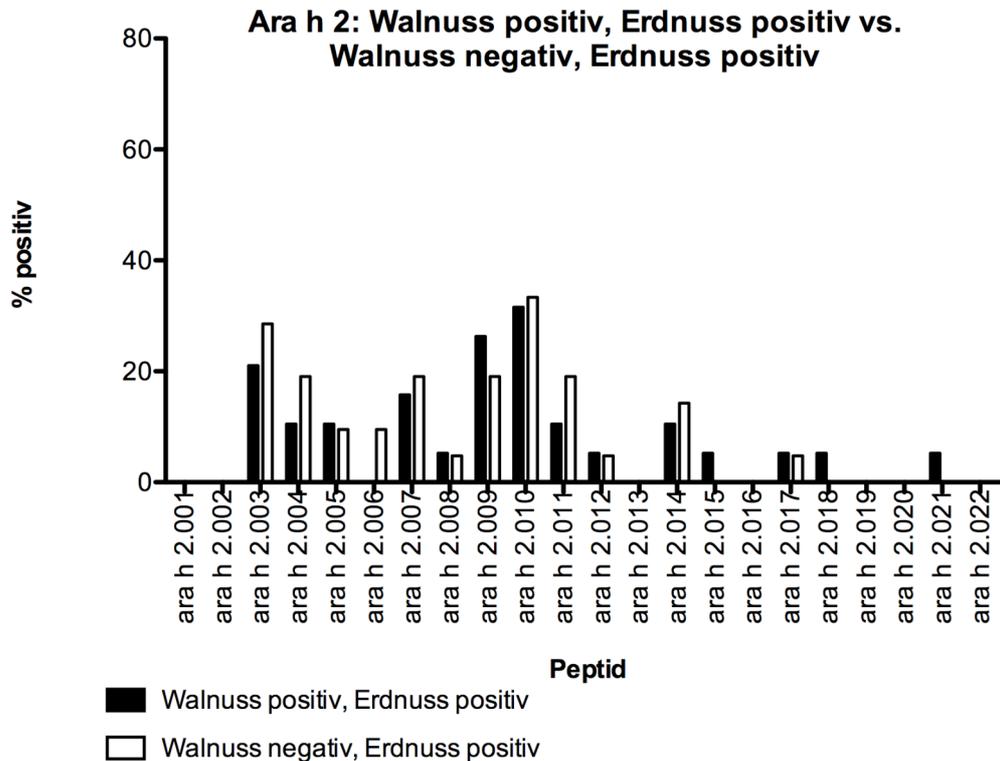


Abbildung 58: Häufigkeit der IgG4 Bindungen an den Peptiden von Ara h 2.

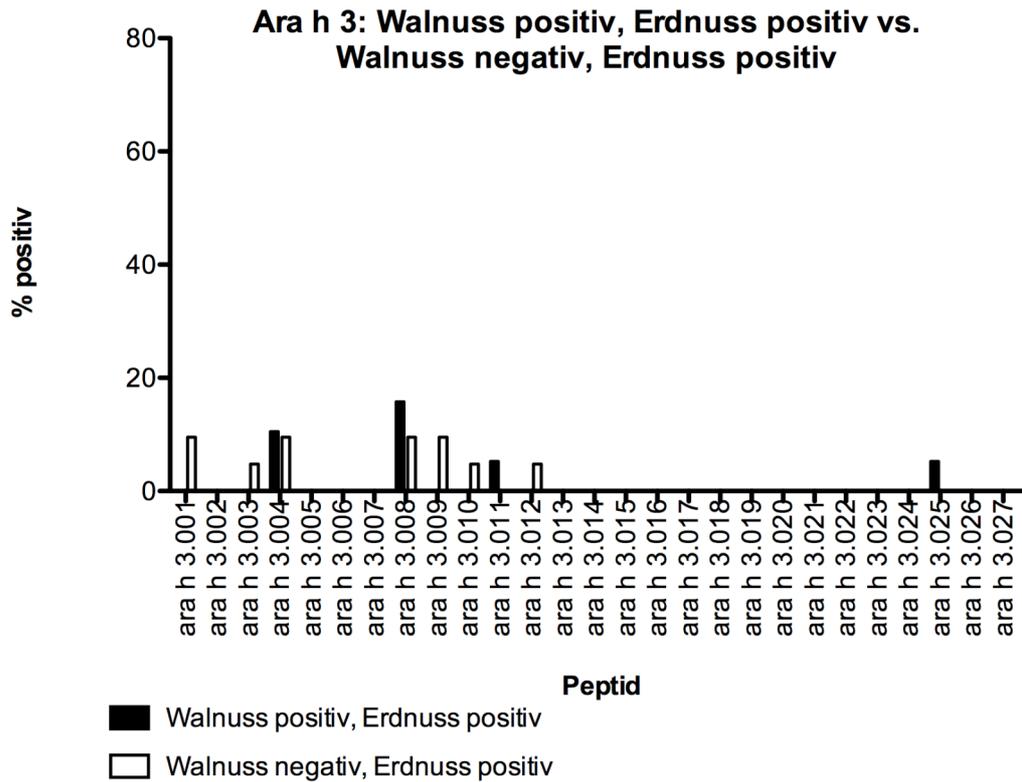


Abbildung 59: Häufigkeit der IgG4 Bindungen an den Peptiden Ara h 3.

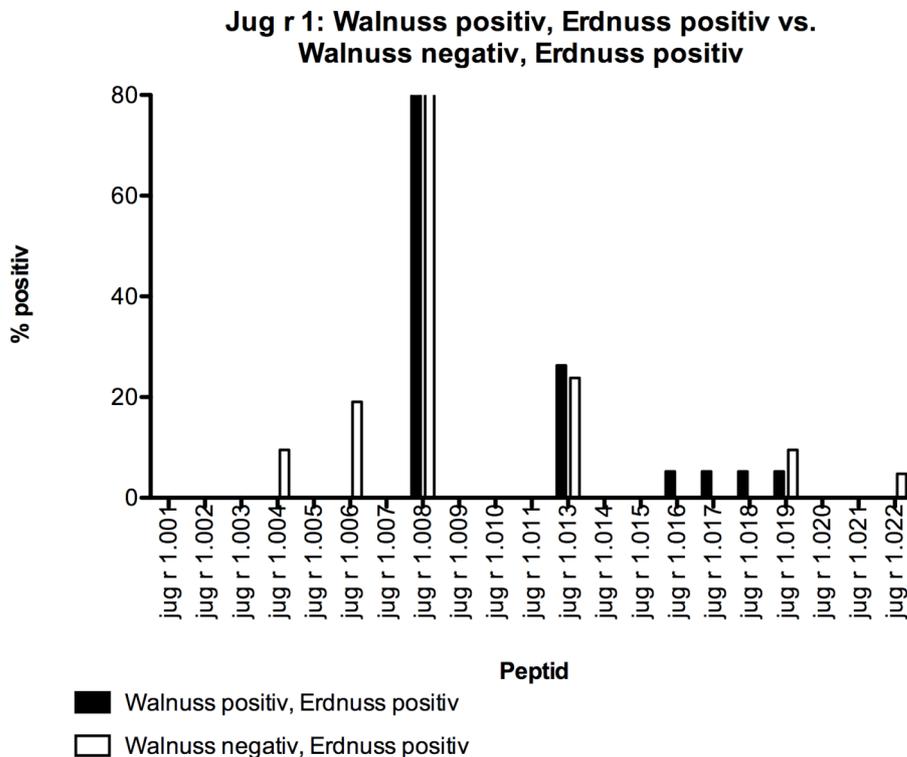


Abbildung 60: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Jug r 1.

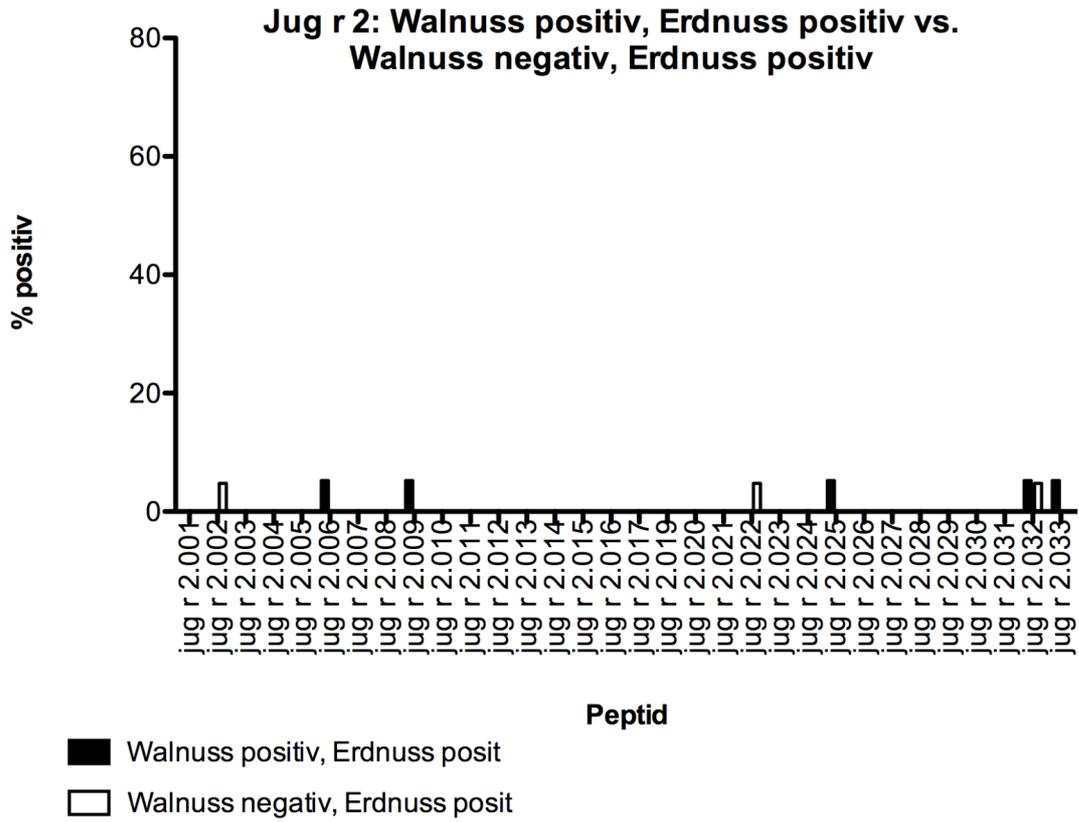


Abbildung 61: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Jug r 2.

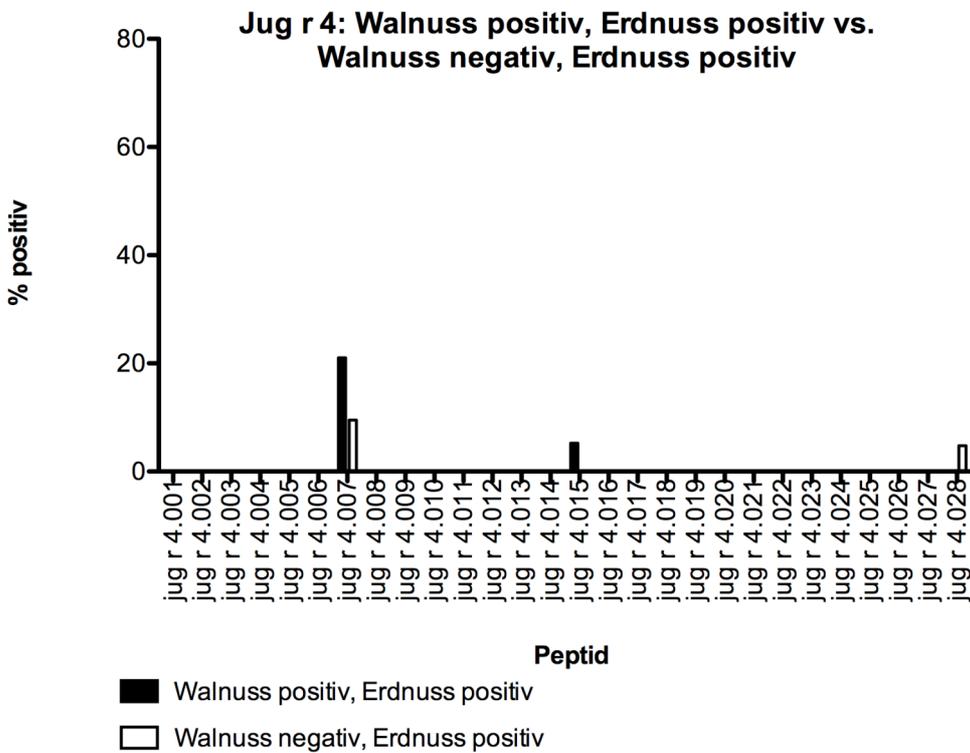


Abbildung 62: Häufigkeit der IgG4-Bindung an Jug r 4.

4.2.2.3.2 Häufigkeit IgG4: Haselnussgruppe

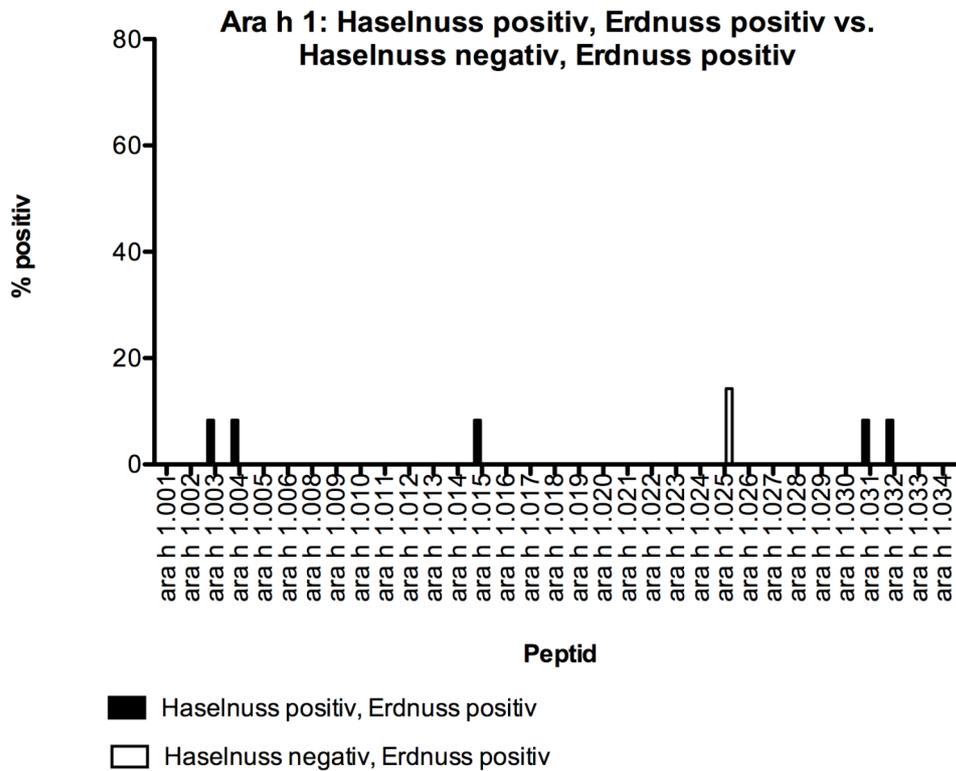


Abbildung 63: Anteile der Patienten (Haselnuss positiv vs. Haselnuss negativ) mit Bindung an IgG4.

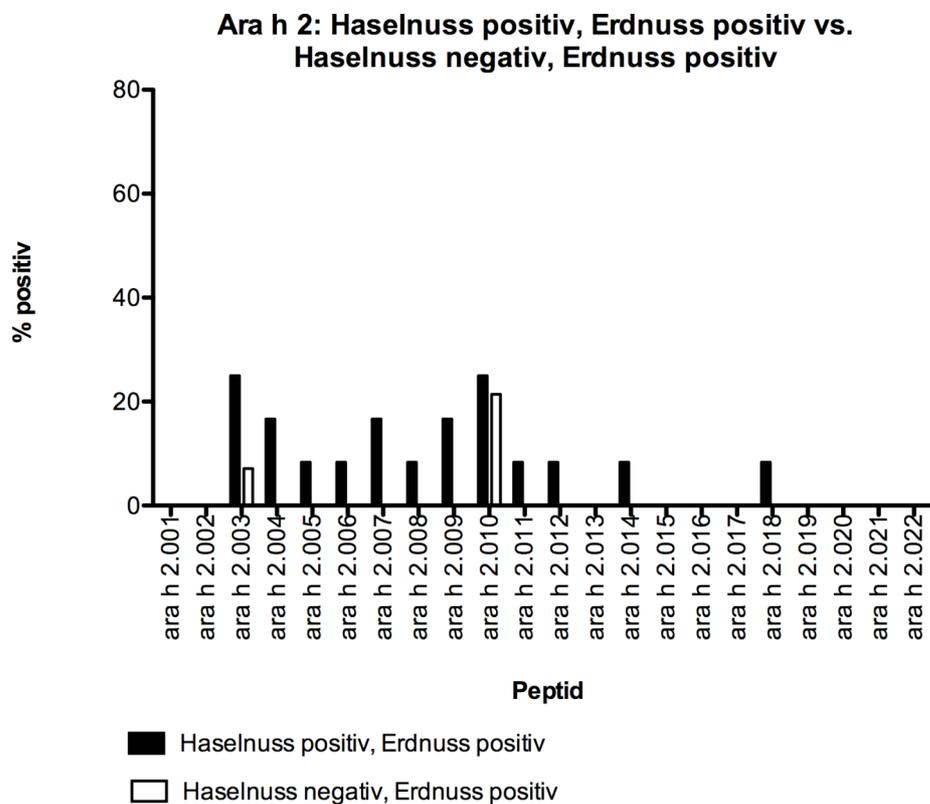


Abbildung 64: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ara h 2.

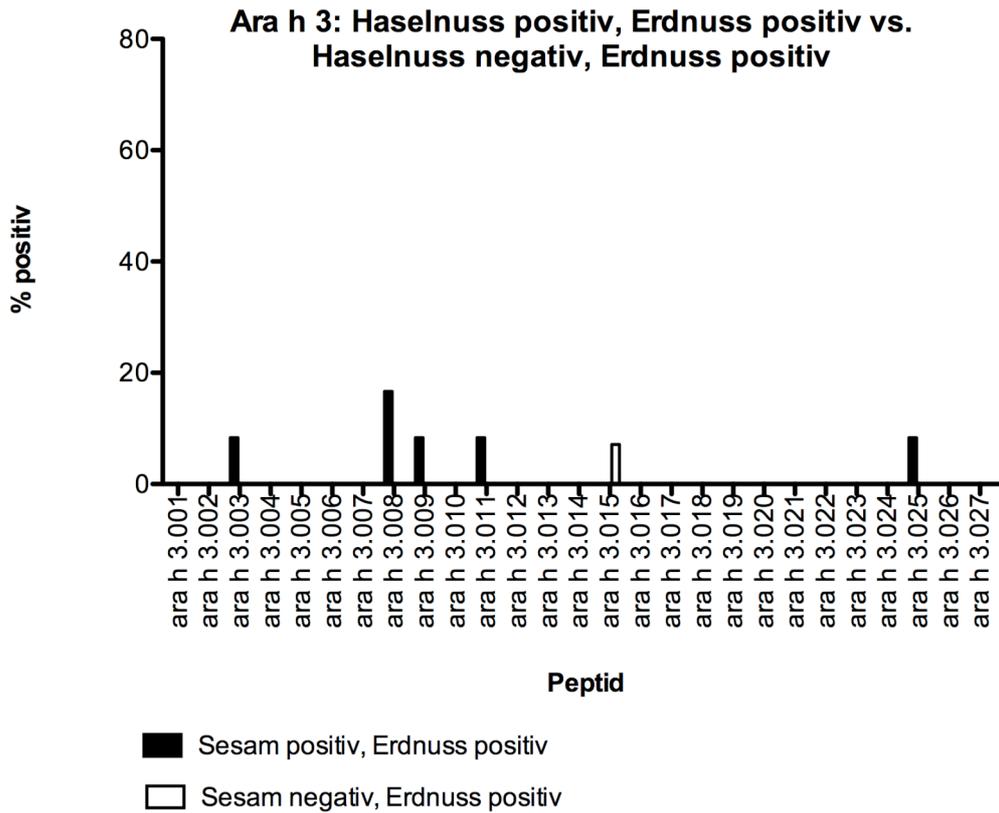


Abbildung 65: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ara h 3.

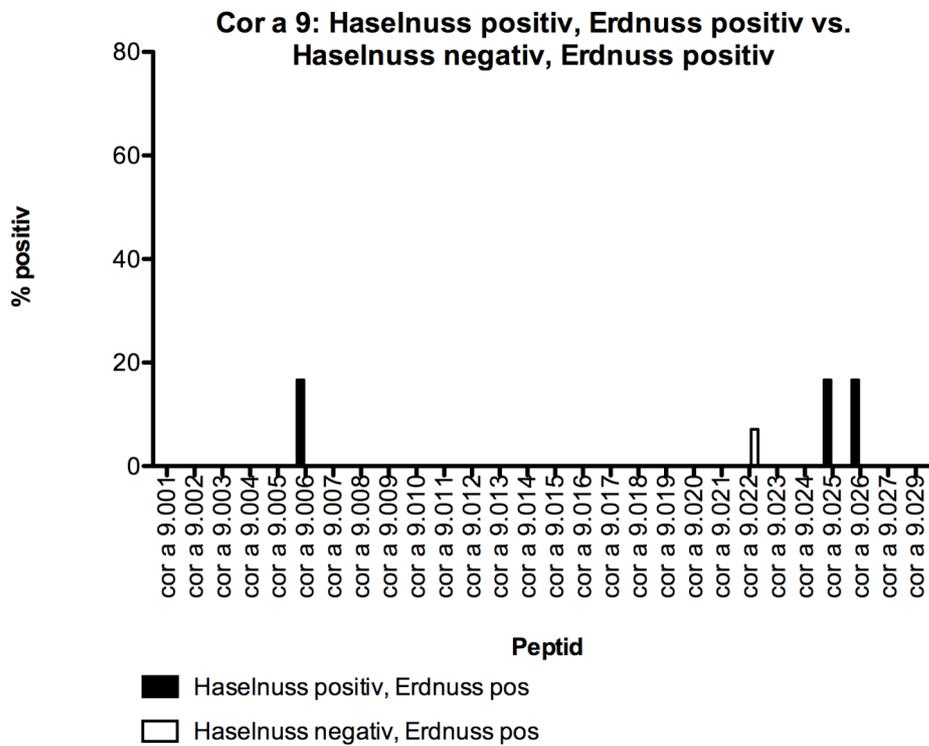


Abbildung 66: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Cor a 9.

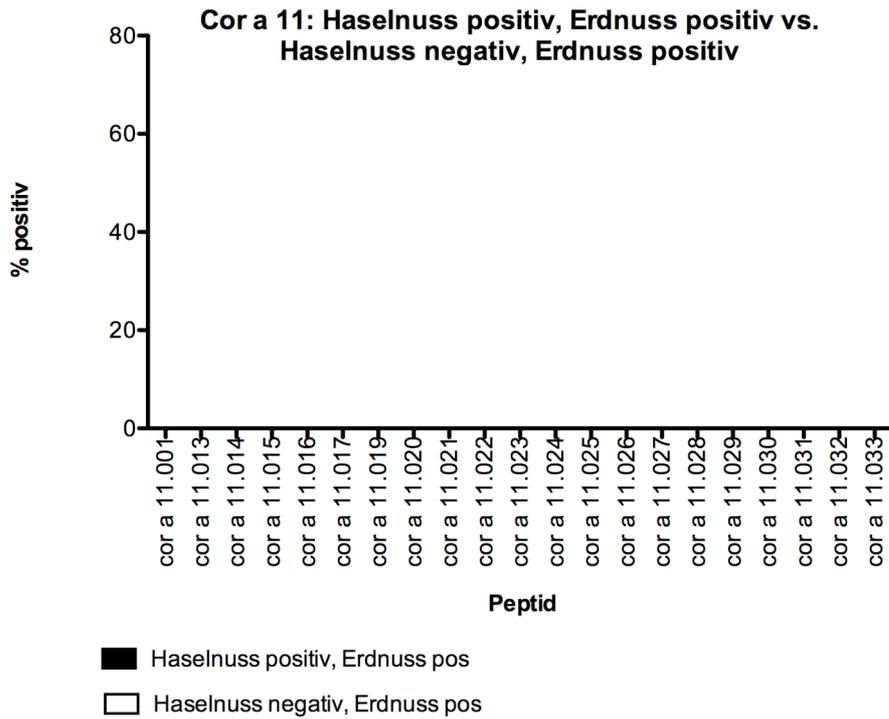


Abbildung 67: IgG4-Bindung an Cor a 11.

4.2.2.3.3 Häufigkeit IgG4: Sesamgruppe

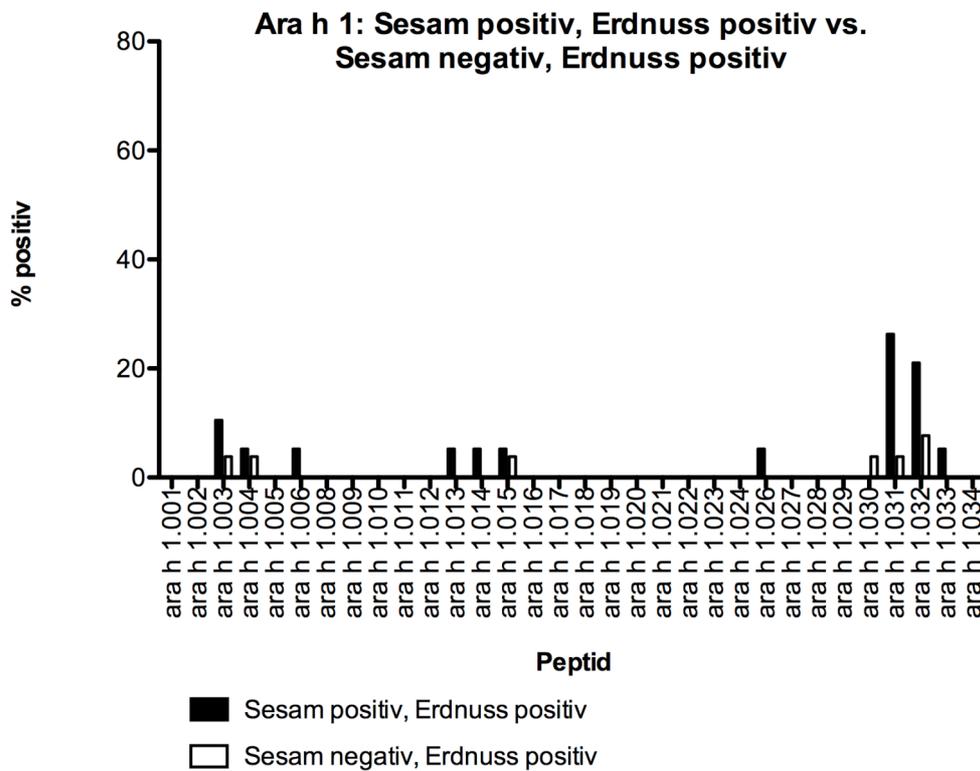


Abbildung 68: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ara h 1.

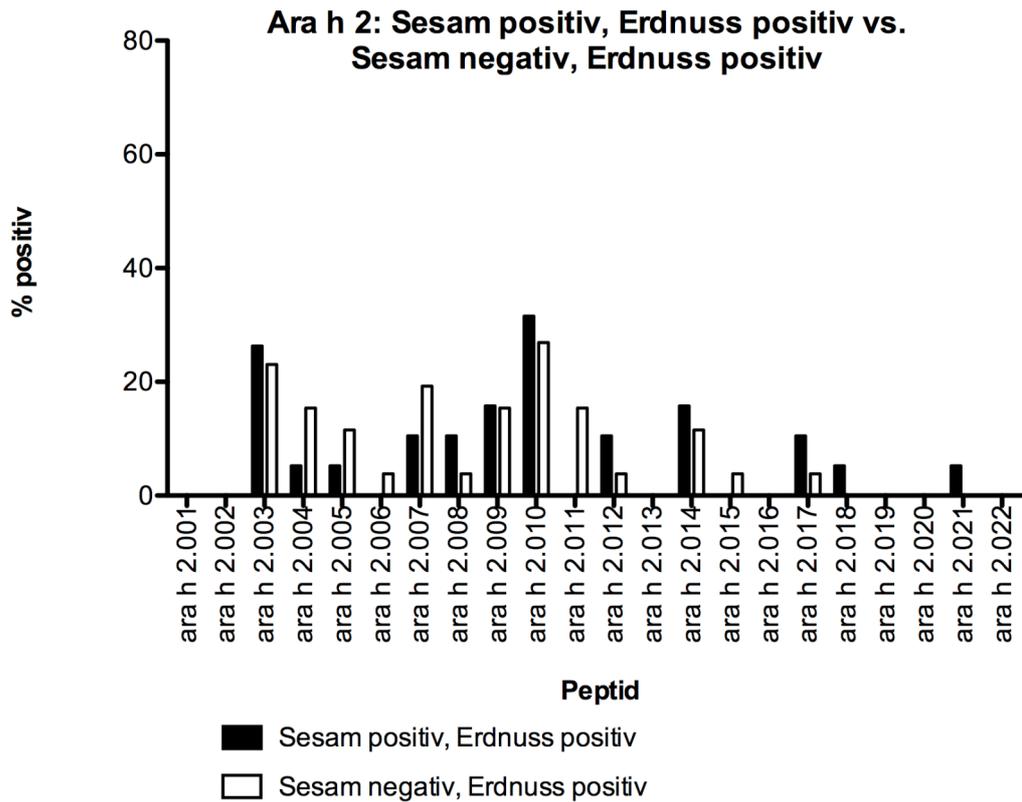


Abbildung 69: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ara h 2.

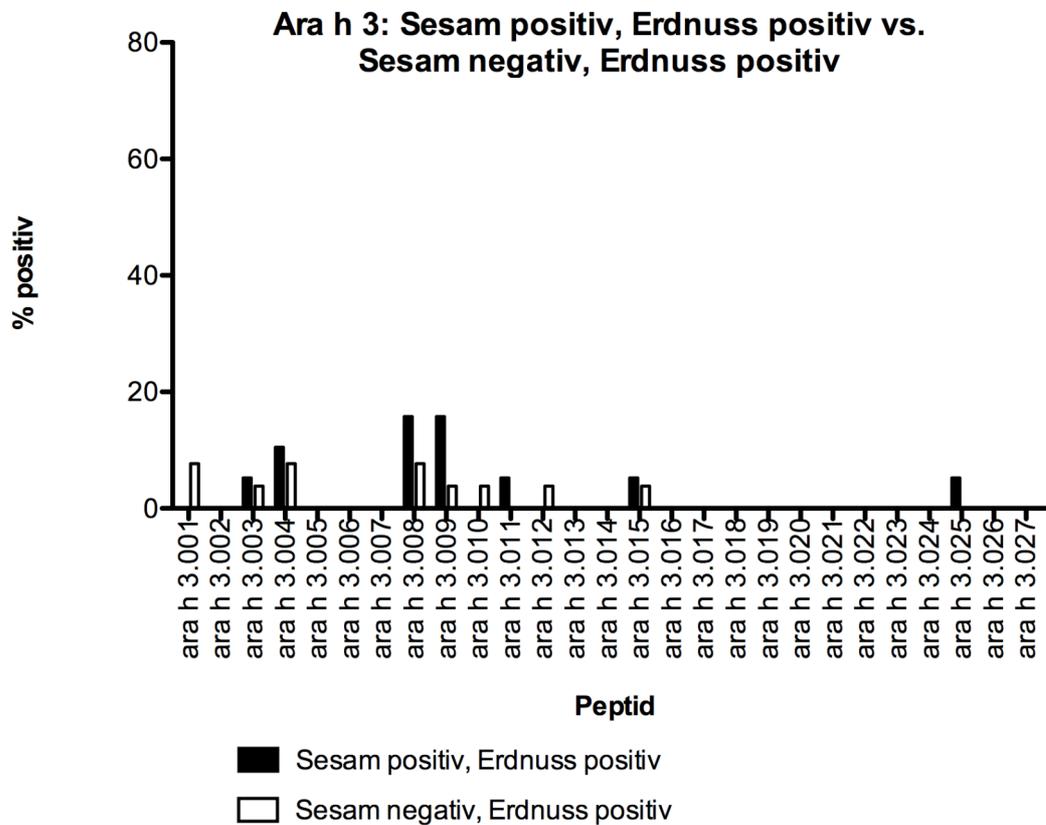


Abbildung 70: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ara h 3.

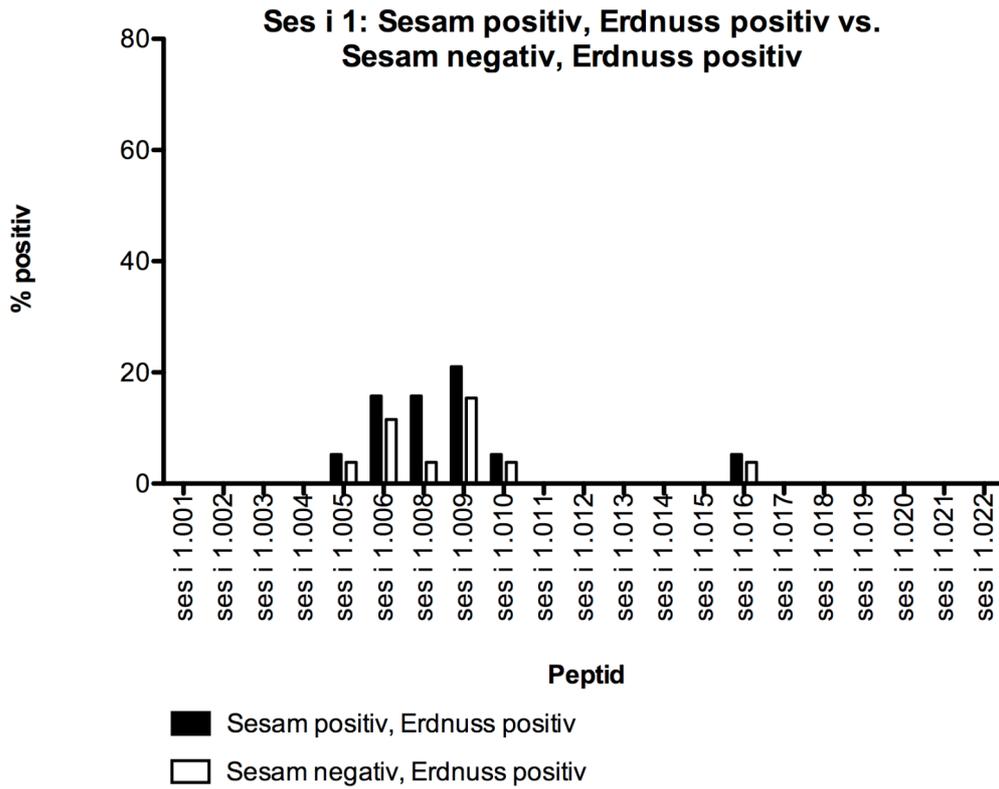


Abbildung 71: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ses i 1.

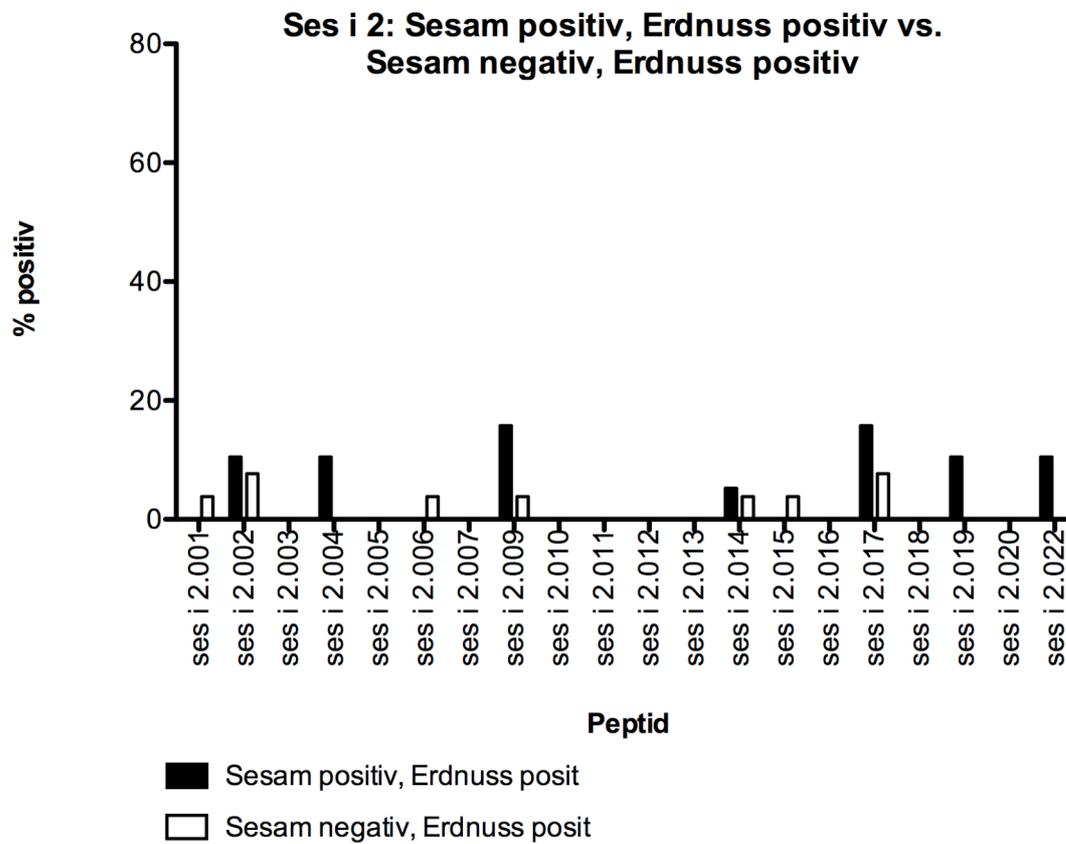


Abbildung 72: Häufigkeit der Bindung an Ses i 2.

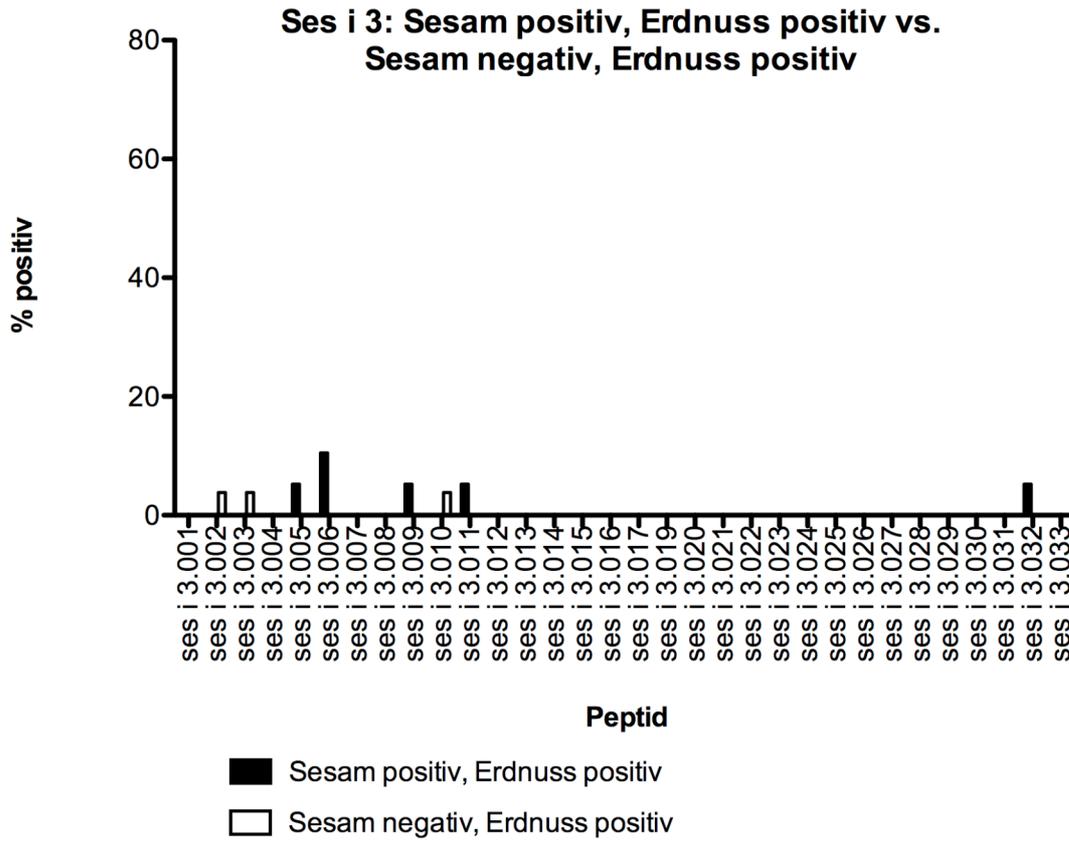


Abbildung 73: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ses i 3.

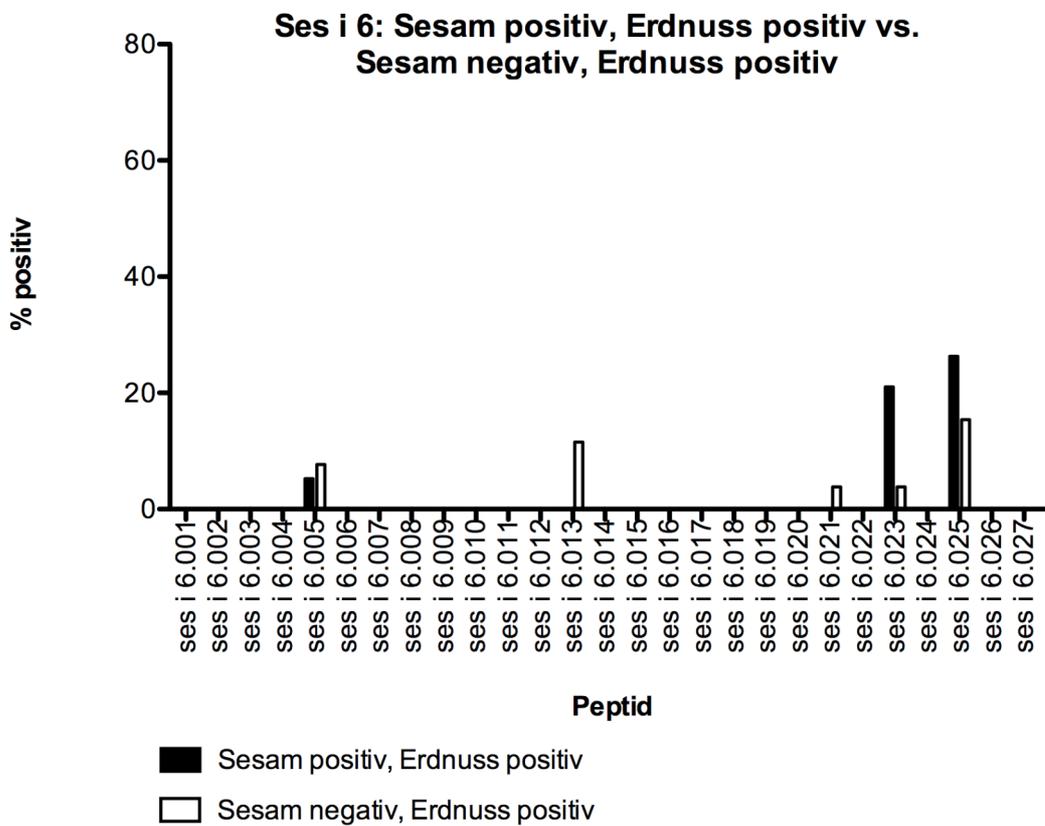


Abbildung 74: Häufigkeit der IgG4 Bindung an Ses i 6.

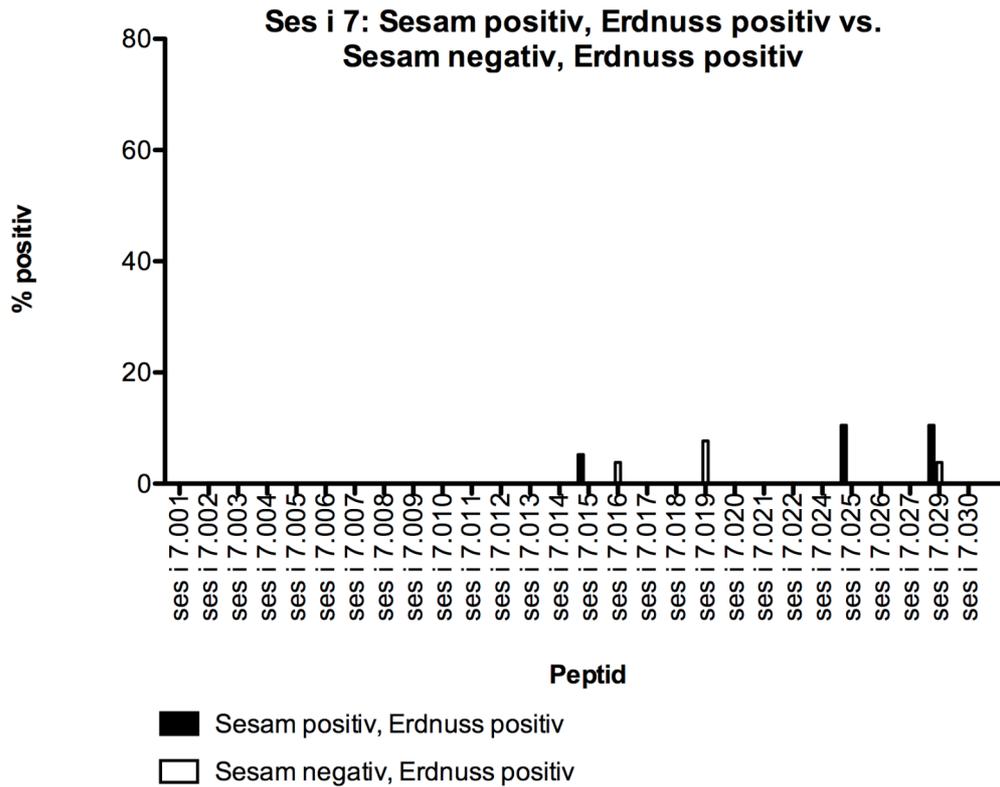


Abbildung 75: Häufigkeit der IgG4-Bindung an Ses i 7.

4.2.2.4 IgE/IgG4 Ratio

Der Vergleich der Ratio IgE/IgG4 in den einzelnen Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede für die Paarvergleiche der walnuss-/ haselnuss-/ sesamallergischen Erdnussallergiker versus walnuss-/ haselnuss-/ sesamtolerante Erdnussallergiker (Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni Korrektur). Die einzig signifikanten Einzelwerte vor Bonferroni Korrektur fanden sich beim Vergleich der haselnussallergischen mit den haselnusstoleranten Erdnussallergikern bei Ara h 2.009 ($p=0,02$) und Ara h 2.010 ($p=0,016$).

4.2.3 Inhibitionsexperimente

Vor dem Hintergrund, dass bei den Vergleichen von baumnuss-/sesamallergischen vs. baumnuss-/sesamtoleranten Erdnussallergikern keine sicheren Hinweise auf kreuzreagierende IgE-Antikörper gegen lineare Epitope von Erdnuss und Baumnüssen/Sesam gefunden werden konnten, sollte versucht werden, diese in Inhibitionsversuchen nachzuweisen.

4.2.3.1 Spezifität der IgE-Bindung an Erdnusspeptide

Poolseren mit starker IgE-Bindung gegen Erdnusspeptide wurden mit verschiedenen Peptiden der Erdnuss präinkubiert (Ara h 2.005, Ara h 2.009, Ara h 2.010, Ara h 3.024). Wie Abbildung 76 zeigt konnte dadurch eine starke Inhibition der IgE-Bindungen an den betreffenden Peptiden erreicht werden. Diese war auch insofern spezifisch, als außer überlappenden Sequenzen keine anderen Bindungen gehemmt wurden.

Die Eigenschaft war in mehreren Versuchen reproduzierbar.

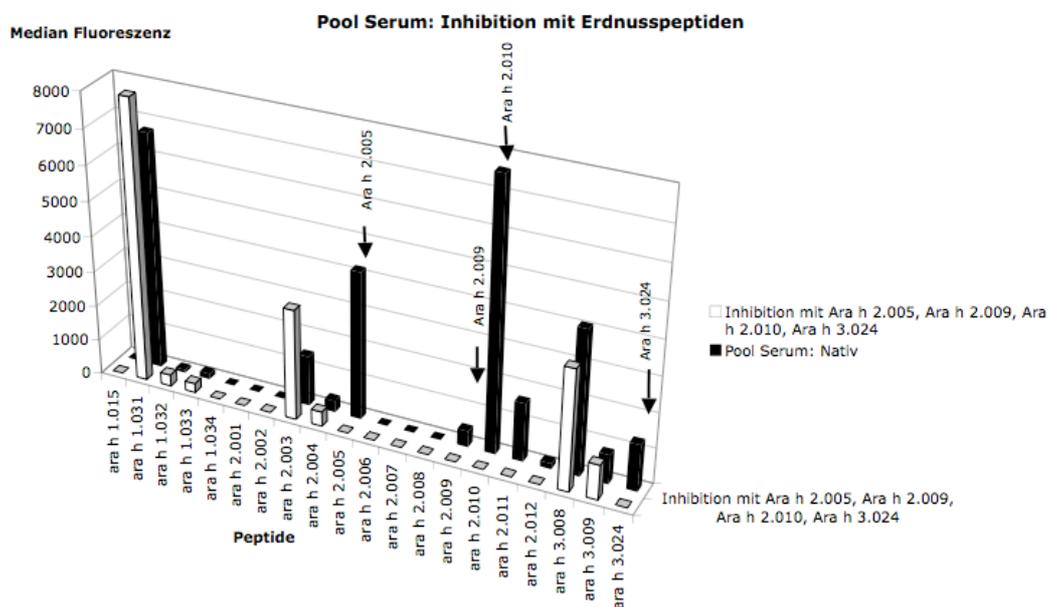


Abbildung 76: Inhibition von IgE-Bindung an Sequenzen der Erdnuss durch Präinkubation der Seren mit Erdnusspeptiden. Die IgE-Bindung an den nicht-inhibierten Sequenzen bleibt erhalten. Ara h 2.011 ist eine um 10 Aminosäuren überlappende Sequenz mit Ara h 2.010 und wird mit inhibiert.

4.2.3.2 Kreuzreaktivität von IgE-Antikörpern gegen homologe Peptidsequenzen

Um Aussagen über Kreuzreaktivität von erdnusspeptidspezifischen IgE-Antikörpern zu machen, wurde versucht, IgE-Bindung an Erdnusspeptiden durch Walnuss- und Sesampeptide zu inhibieren.

Dazu wurden Seren jeweils parallel mit steigenden Konzentrationen von Erdnuss- und Walnuss-/Sesampeptiden präinkubiert.

Abbildung 77- Abbildung 79 zeigen die konzentrationsabhängige und spezifische Inhibition von IgE-Bindung an Erdnusspeptiden auf den Microarrayslides durch Präinkubation der Seren mit Erdnusspeptiden.

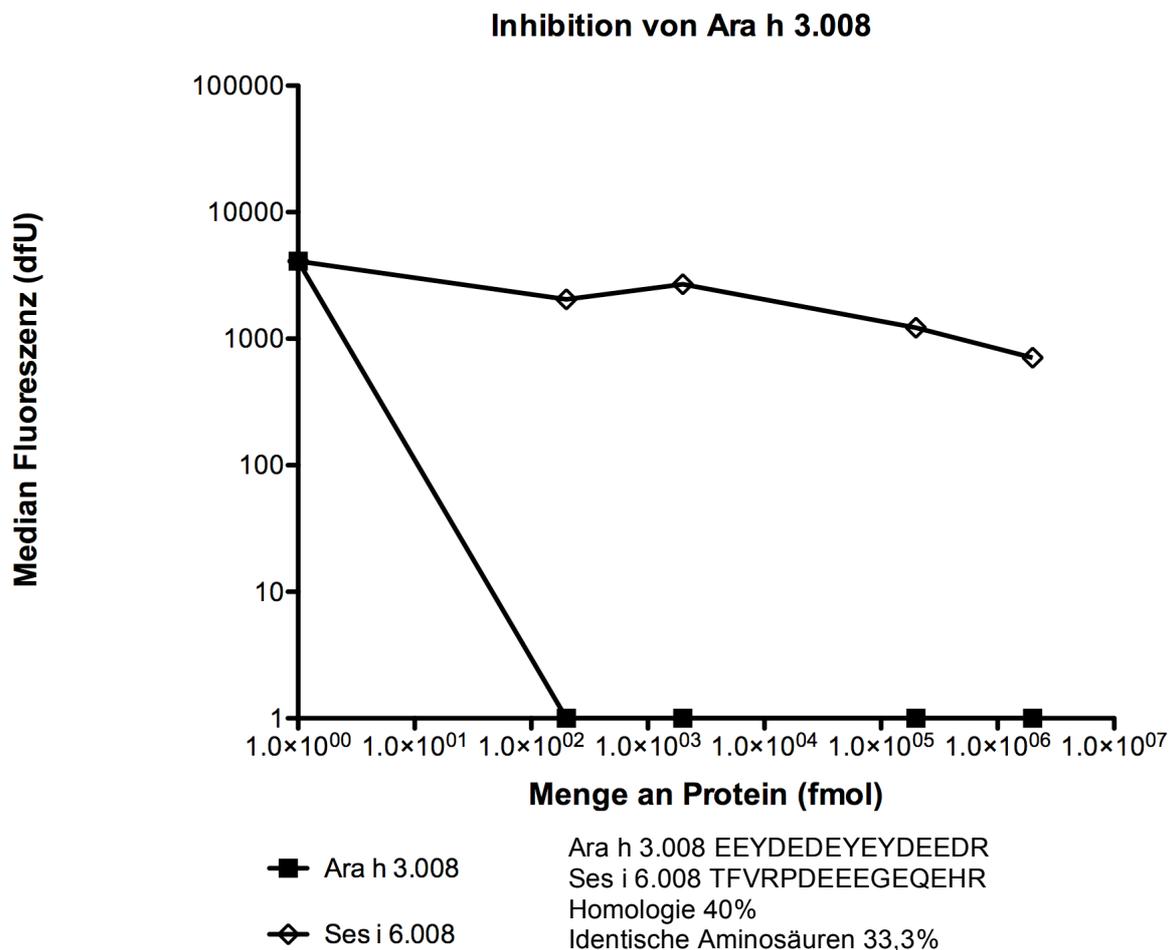


Abbildung 77: Inhibition von IgE Bindung an Ara h 3.008 durch Ara h 3.008 und Ses i 6.008. Poolseren wurden parallel mit Ara h 3.008 und Ses i 6.008 inhibiert. Homologie der Aminosäuren bedeutet Ähnlichkeit der Sequenzen in Hydrophilie oder Polarität, bestimmt durch Vector NTI.

Anders stellten sich die Versuche der Inhibition der IgE-Bindung an den Erdnusspeptiden durch Präinkubation der Seren mit den korrespondierenden Sesam- oder Walnusspeptiden dar. So war es- wie Abbildung 77 und Abbildung 78 andeuten- in einem Teil der Fälle zwar auch möglich, eine geringe Inhibition von IgE-Bindung an Erdnusspeptiden durch Präinkubation der Seren mit Walnuss) oder Sesampeptiden zu erreichen. Es wurden aber im Vergleich zur Inkubation mit Erdnusspeptiden deutlich höhere Konzentrationen von Sesam- oder Walnusspeptid zur Inhibition benötigt. Bei Jug r 4.024 wurde eine im Vergleich zur Erdnusssequenz etwa 10000fache Konzentration Peptid benötigt, um eine zu Ara h 3.024

vergleichbare Inhibition zu erzielen. Bei Ses i 6.008 war die benötigte Konzentration noch höher. Es war in beiden Fällen nicht möglich, eine Inhibitionskinetik mit vollständiger Inhibition der IgE-Bindung an der Erdnussesequenz nachzuweisen. Inhibition durch korrespondierende Sequenzen war auch nicht in allen Fällen möglich. So zeigte Präinkubation der Seren mit Ses i 3.031 keine Inhibition der IgE-Bindung an Ara h 1.031 (Abbildung 79).

Wie das unterschiedliche Verhalten bei den verschiedenen Sequenzen zeigt, ist allein aus der Anzahl der identischen Aminosäuren keine Vorhersage zu kreuzreagierenden IgE-Antikörpern zu machen. Ses i 3.031 führt trotz großer Homologie zur Erdnussesequenz zu keiner konzentrationsabhängigen Inhibition der IgE-Bindung an Ara h 1.031. („Homologie“ in bedeutet Ähnlichkeit in Polarität, Hydrophilie bestimmt durch Vector NTI Alignment Software.)

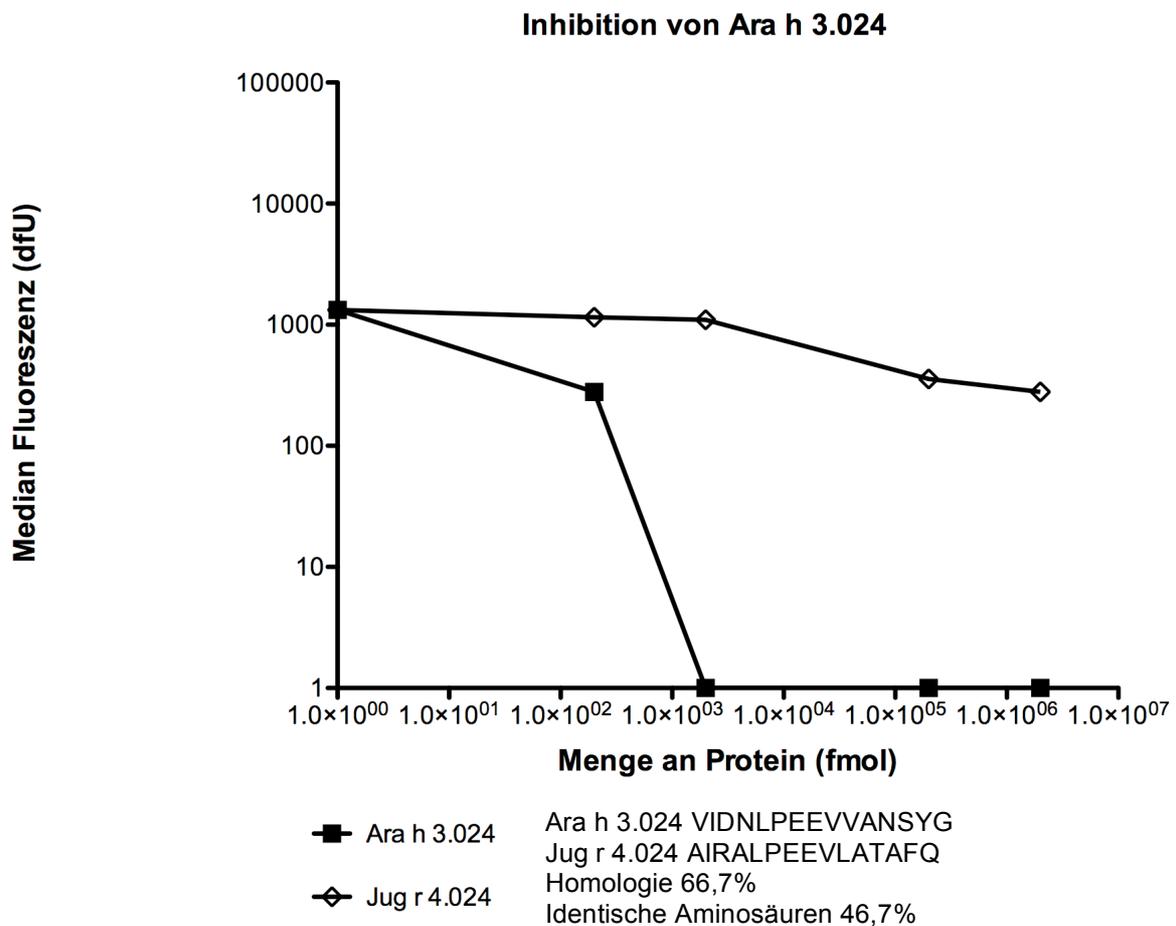


Abbildung 78: Inhibition von Ara h 3.024 durch Präinkubation von Seren mit Ara h 3.024 und Jug r 4.024. Es kann hier keine vollständige Inhibition der IgE Bindung an Ara h 3.024 durch Präinkubation mit Jug r 4.024 gezeigt werden.

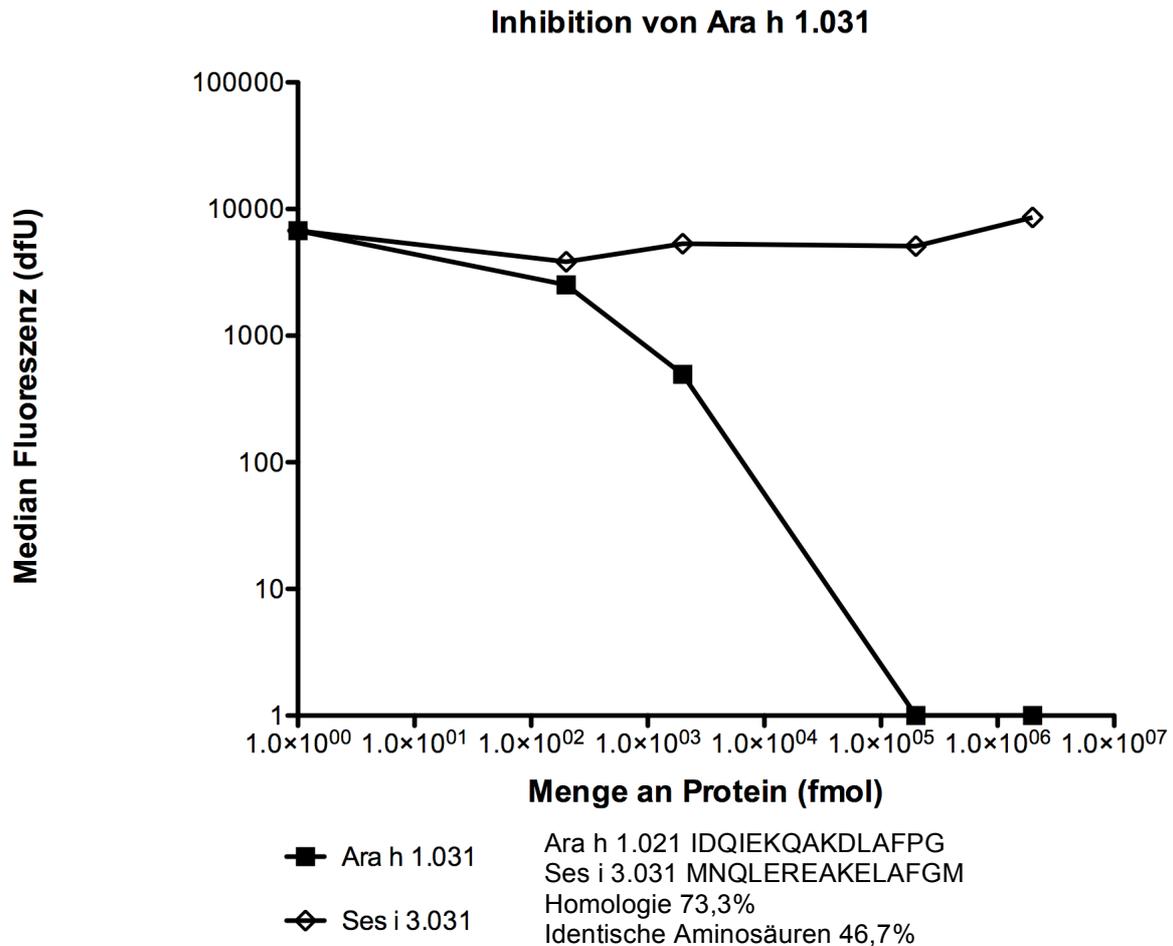
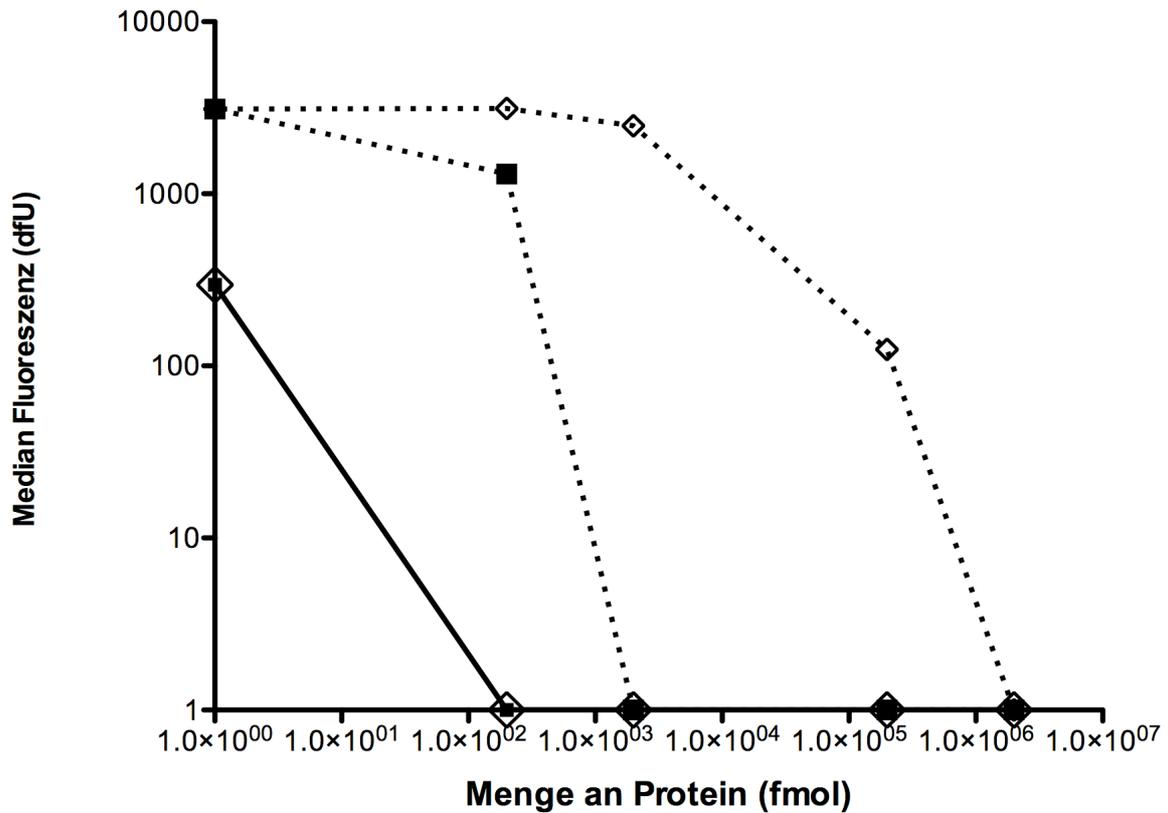


Abbildung 79: Fluoreszenzwerte von Ara h 1.031 im Microarray bei Präinkubation mit steigender Konzentration von Peptid. Präinkubation mit Ses i 3.031 führt zu keiner Inhibition.

4.2.3.3 Inhibition bei Patienten mit unterschiedlicher klinischer Reaktivität

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede in der Inhibition bei Seren von Patienten unterschiedlicher klinischer Reaktivität feststellen lassen. Es wurden Poolseren von walnussallergischen und von walnusstoleranten Erdnussallergikern untersucht. Die Hypothese war, dass sich bei walnussallergischen Patienten auf Grund von Kreuzreaktivität Erdnusspeptidbindungen stärker durch Walnusspeptide inhibieren lassen. In Abbildung 80- Abbildung 84 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

Inhibition von Ara h 3.004

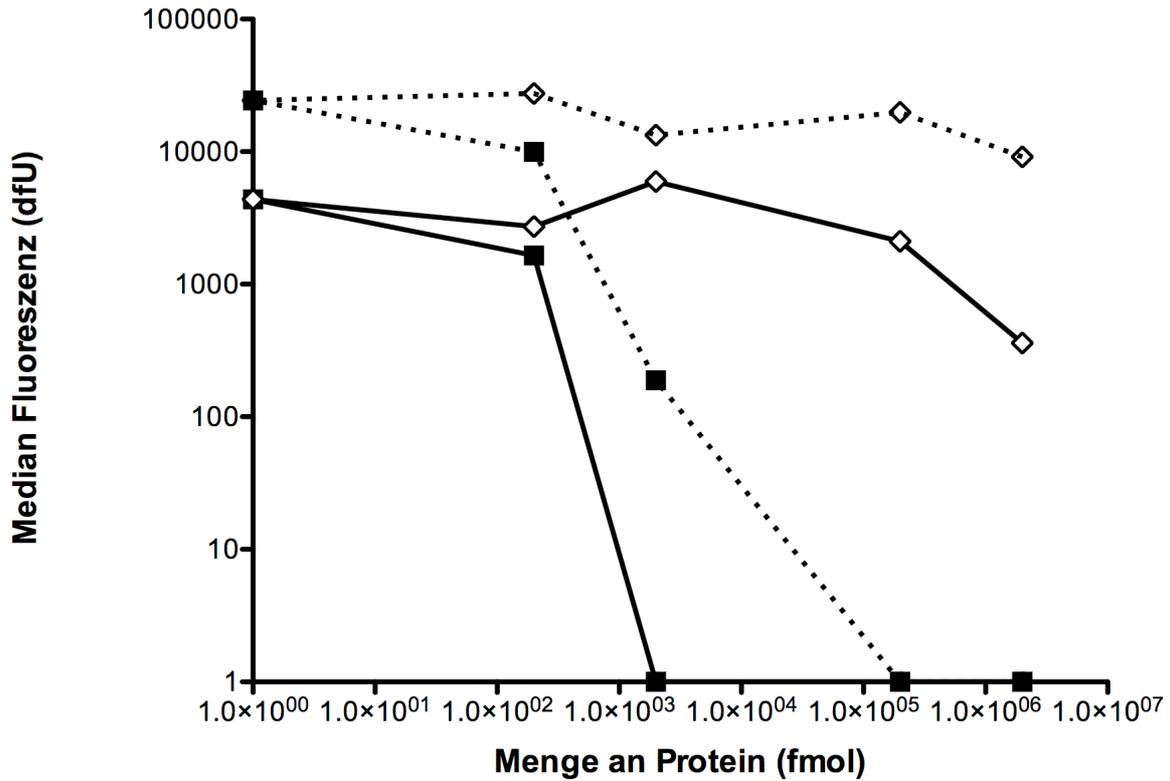


- Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 3.004
- ◇ Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 4.004
- Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 3.004
- ◇ Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 4.004

Ara h 3.004 IFSGFTPEFLEQAFQ
 Jug r 4.004 VFSGFDADFLADAFN
 Homologie 73,3%
 Identische Aminosäuren 53,3%

Abbildung 80: Poolserum 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) und Poolserum 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) wurden jeweils mit Ara h 3.004 und Jug r 4.004 präinkubiert. Sowohl Ara h 3.004 als auch Jug r 4.004 führten zur Inhibition der Bindung an Ara h 3.004.

Inhibition von Ara h 3.008

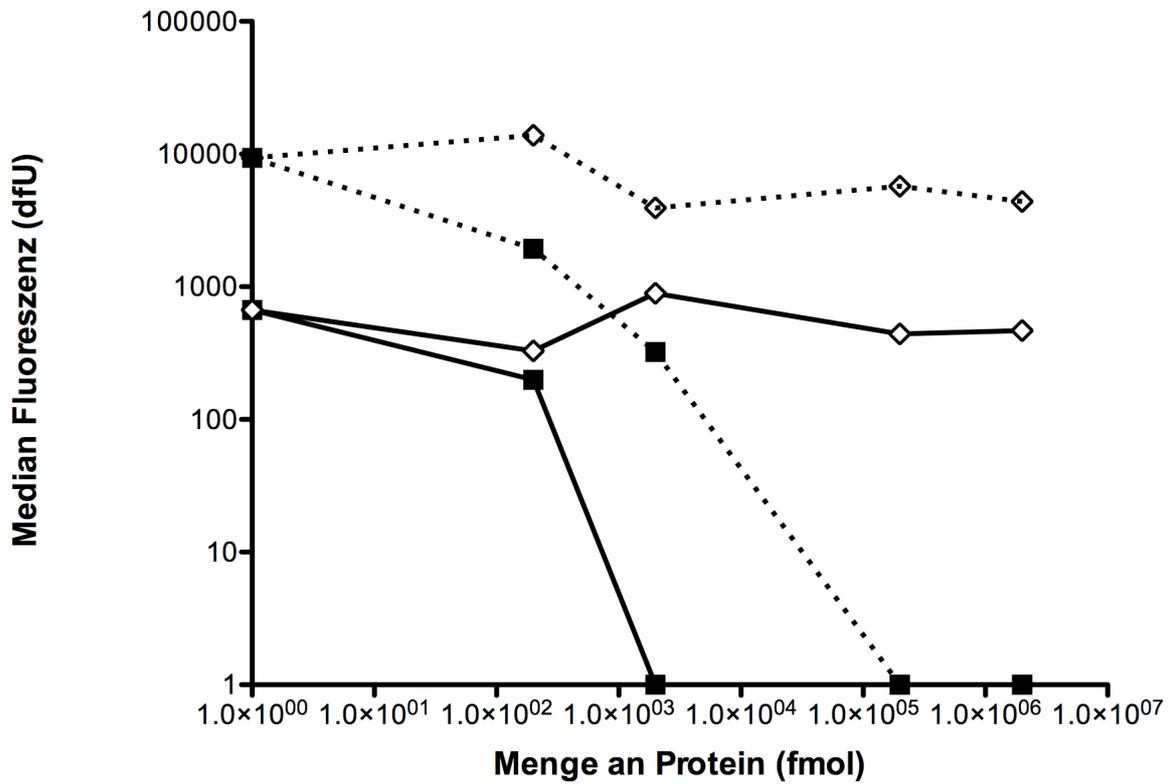


- Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 3.008
- ◇ Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 4.008
- Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 3.008
- ◇ Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 4.008

Ara h 3.008 EEYDEDEYDEEDR
 Jug r 4.008 RKERERERESESEERR
 Homologie 40%
 Identische Aminosäuren 33,3%

Abbildung 81: In Poolserum 1 können hohe Jug r 4.008 Konzentrationen zu einer geringen Hemmung von Ara h 3.008 Bindung führen, allerdings nicht einer eindeutigen Inhibitionskinetik folgend.

Inhibition von Ara h 1.024

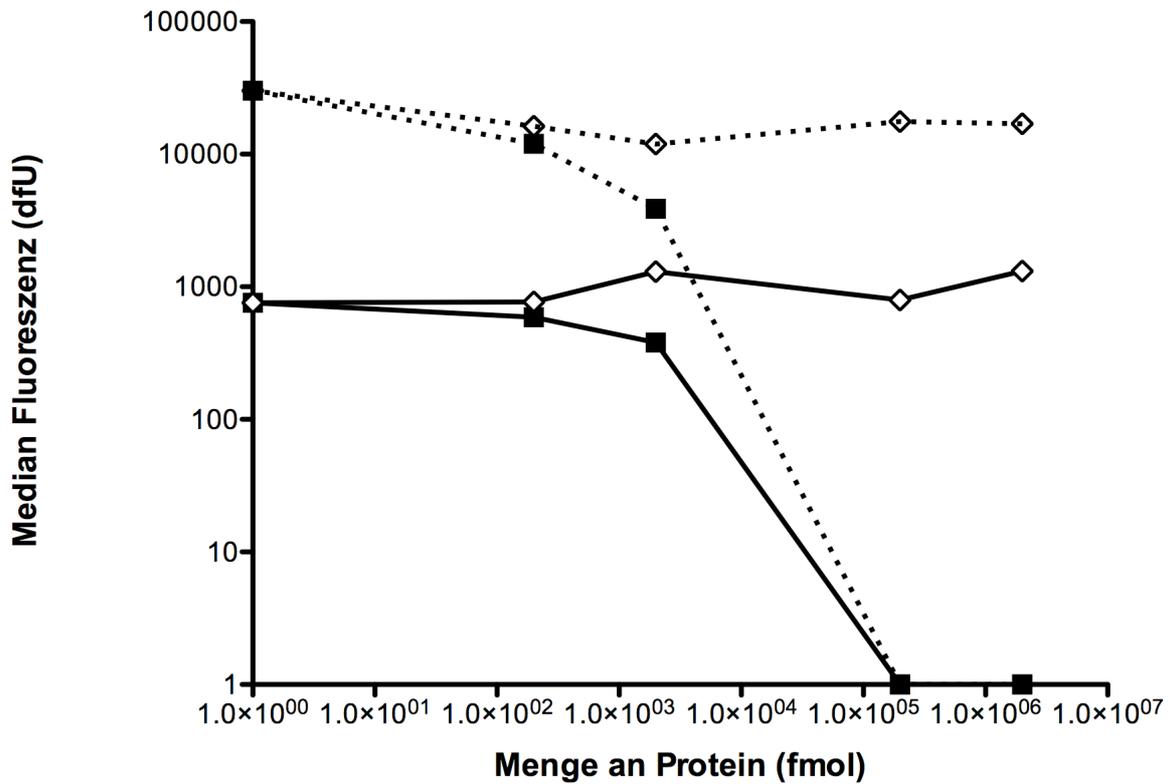


- Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 1.024
- ◇ Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 2.024
- Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 1.024
- ◇ Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 2.024

Ara h 1.024 DLSNNFGKLFVEVKPD
 Jug r 2.024 SYSNQFGQFFEACPE
 Homologie 60%
 Identische Aminosäuren 40.7%

Abbildung 82: Präinkubation mit Jug r 2.024 führt in beiden Poolseren zu keiner Inhibition.

Inhibition von Ara h 1.032

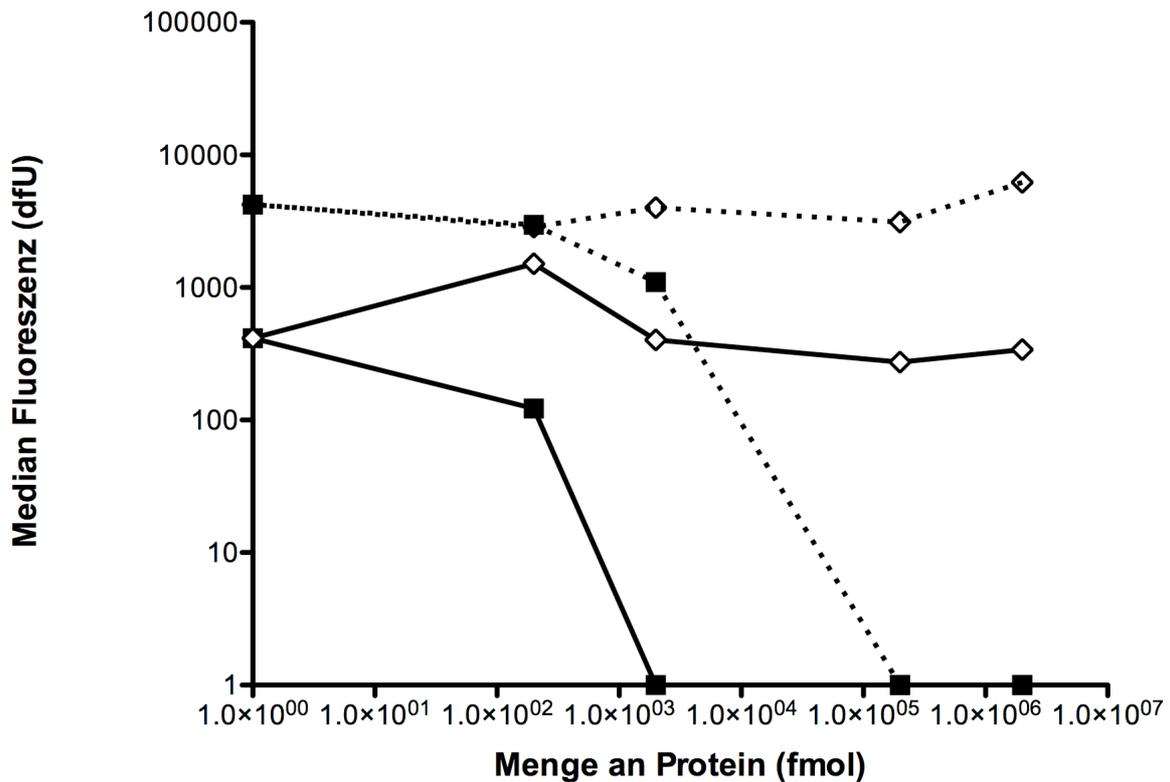


- Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 1.032
- ◇ Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 2.032
- Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 1.032
- ◇ Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 2.032

Ara h 1.032 KQAKDLAFPGSGEQV
 Jug r 2.032 REAKELSFNMPREEI
 Homologie 60%
 Identische Aminosäuren 33.3%

Abbildung 83: Präinkubation mit Jug r 2.032 führt zu keiner Inhibition der IgE-Bindung an das Erdnusspeptid.

Inhibition von Ara h 2.021



- Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 2.021
- ◇ Pool 1 (Walnuss positiv, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 1.021
- Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Ara h 2.021
- ◇ Pool 2 (Walnuss negativ, Erdnuss positiv) Inhibition mit Jug r 1.021

Ara h 2.021 QQFKRELPNLPQQCG
 Jug r 1.021 EEMVQSARDLPNECQ
 Homologie 40%
 Identische Aminosäuren 33.3%

Abbildung 84: In Pool 1 und in Pool 2 wurde keine Inhibition von Ara h 2.021 Bindung durch Präinkubation mit Jug r 1.021 beobachtet.

Bei allen untersuchten Erdnusspeptiden wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition durch Erdnusspeptide erreicht. Die Präinkubation mit Walnusspeptiden zeigte für die verschiedenen untersuchten Peptide unterschiedliche Ergebnisse. Jug r 4.004 konnte in beiden Poolseren Erdnusspeptidbindung an Ara h 3.004 konzentrationsabhängig inhibieren (Abbildung 80). Es wurde in Pool 2 eine im Vergleich zur Inhibition mit Ara h 3.004 etwa 1000fach höhere Konzentration

benötigt, um vollständige Inhibition zu erreichen. In Pool 1 (walnussallergische Patienten) wurde sowohl mit Ara h 3.004 als auch mit Jug r 4.004 in der niedrigsten Konzentration schon vollständige Inhibition erreicht.

Mit Jug r 4.008 war keine Inhibition von IgE-Bindung an Ara h 3.008 möglich (Abbildung 81). Es zeigt sich hier keine sicher dosisabhängige Inhibitionskinetik. Präinkubation mit Jug r 2.024 führt zu keiner Inhibition an Ara h 1.024 (Abbildung 82). Bei Präinkubation mit Jug r 2.032 und Jug r 2.021 ist ebenfalls keine Inhibition zu zeigen (Abbildung 83, Abbildung 84).

Bei den hier untersuchten Peptiden zeigte Jug r 4.004 die stärkste Inhibition von Erdnusspeptid. Dies ist im Vergleich der Sequenzen auch die mit der größten Homologie im Vergleich zur Erdnusssequenz.

Es ist in diesen Versuchen keine stärkere Inhibition durch Walnusspeptide im walnussallergischen Pool zu erkennen.

5 Diskussion

5.1 Fragebögen

Mit den Fragebögen, die an Patienten der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité gesandt wurden, sollte untersucht werden, wie häufig erdnussallergische Patienten Co-Allergien gegen Baumnüsse und Samen aufweisen. Reaktionen auf Baumnüsse oder Samen wurden von 30% der von uns befragten erdnussallergischen Patienten berichtet. Das ist ähnlich häufig wie in anderen Studien. Die Koexistenz von Erdnuss und Baumnussallergie wird in der Literatur in 20-50% der Fälle beschrieben [4, 16, 27, 32, 98].

In unserem Patientenkollektiv war allerdings Haselnuss die häufigste Baumnussallergie bei erdnussallergischen Patienten. Das ist ein Unterschied zu Patienten aus den USA, bei denen Walnüsse für die meisten Reaktionen unter den Baumnüssen verantwortlich waren [27]. Bei Ewan hingegen ist Paranuss, gefolgt von Mandel, Haselnuss, Walnuss und Cashew das häufigste auslösende Allergen bei Patienten in Großbritannien [4]. Man könnte argumentieren, das häufige Vorkommen von allergischen Reaktionen auf Haselnuss bei unseren Patienten könne in einem Teil der Fälle damit zusammenhängen, dass Kreuzreaktionen mit Birkenpollen eine Rolle spielen. Eine Birkenpollensensibilisierung wird in der Literatur bei einem Teil der haselnussallergischen Patienten beschrieben [99]. Allerdings berichten unsere Patienten im Gegensatz zu den birkenpollensensibilisierten Patienten über systemische Reaktionen auf Haselnüsse. Es ist also in vielen Fällen unwahrscheinlich, dass diese Reaktionen auf Kreuzreaktivität mit Birkenpollenallergenen zurück zu führen sind.

Sesamallergien kommen bei unseren Patienten selten vor. Sesamallergien werden besonders in Regionen beschrieben, in denen auf Grund lokaler Essgewohnheiten viel Sesam verzehrt wird. So sind sie beispielsweise in Israel häufig, wahrscheinlich wegen der frühen Einführung von Sesampaste (Tahin) in die Nahrung [17]. Es gibt trotzdem in der Literatur Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Sesam- und Erdnussallergie. So waren in einer Studie von 531 sesamallergischen Patienten 448 auf Erdnuss sensibilisiert [100]. In einer anderen Untersuchung hatten 84% der Patienten mit anamnestischer Sesamallergie auch Erdnuss- oder Baumnussallergien [101].

Interessant ist daneben, dass viele Patienten angaben, auf alle Nüsse zu verzichten, wenn sie einmal auf eine Nuss reagiert haben. Ein häufig genannter Grund war die Angst vor Reaktionen. Allein dieser Punkt zeigt, wie wichtig eine sichere Diagnose für diese Patienten ist. Vielen erdnussallergischen Patienten wurde auch vom behandelnden Arzt geraten, auf alle Baumnüsse zu verzichten. Dies erklärt zum einen, warum so viele erdnussallergische Patienten nie gegenüber Baumnüssen exponiert waren. Daneben ist es natürlich auch möglich, dass ein Teil dieser Patienten auch auf Baumnüsse reagieren würde. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass der Anteil der co-allergischen Patienten unter den Erdnussallergikern höher liegt als unsere Untersuchung zeigt.

Ein Problem bei der Auswertung der Fragebögen ist der mit etwa 38,5% recht geringe „Recall“. Es ist möglich, dass Patienten, die ihre Reaktionen subjektiv als besonders schwer empfinden dadurch überrepräsentiert sind. Ein weiterer limitierender Faktor der Fragebögen sind Ungenauigkeiten in der Anamnese der Patienten. Allerdings lässt die detaillierte Fragestellung eine gute Einschätzung der beschriebenen Reaktionen zu. Außerdem wurde bei allen Patienten in der Vergangenheit spezifisches IgE gegen Erdnuss oder Baumnüsse bestimmt. Alle von uns befragten Patienten waren auf mindestens eine Nuss sensibilisiert, so dass die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass es sich in den Berichten um echte allergische Reaktionen handelt.

Die Beobachtung, dass Erdnuss- und Baumnussallergien gemeinsam auftreten sagt allein noch nichts darüber aus, ob es sich um Kreuzreaktivität handelt, oder ob eine generell erhöhte Prädisposition für Nahrungsmittelallergien bei den Patienten vorliegt. Dies müssen Studien zur Kreuzreaktivität untersuchen. Die Fragebögen zeigen aber die klinische Bedeutung von Co-Allergien gegen Erdnuss und Baumnüsse. Wichtig ist dabei, dass viele Patienten von schweren Reaktionen berichten. In vielen Fällen wurde Atemnot als ein Symptom angegeben. Es ist bekannt, dass Patienten mit anaphylaktischen Reaktionen auf Nahrungsmittel mit fatalem Ausgang am häufigsten an respiratorischen Symptomen verstarben [2]. Unter unseren erdnussallergischen Patienten ist ein großer Teil auch auf andere Nahrungsmittel wie Kuhmilch und Hühnerei sensibilisiert oder war oder ist gegenüber anderen Nahrungsmitteln allergisch. Dies könnte auch darauf hindeuten, dass das häufige gemeinsame Auftreten von Erdnuss- und Baumnussallergien auf eine generell erhöhte Anfälligkeit dieser Patienten für Nahrungsmittelallergien im

Gegensatz zu Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Nüssen zurück zu führen ist. Diese Frage ist bisher ungeklärt [49].

Die Beobachtung, dass viele erdnussensensibilisierte Patienten in unserer Studie klinisch tolerant sind, ist gut vereinbar mit Studien zur Beziehung zwischen spezifischem IgE und dem Risiko einer positiven Nahrungsmittelprovokation [39]. Bei Sampson et al. wird für Erdnuss ein spezifisches IgE von 15kU/l als sicher diagnostischer Wert angegeben. Bei unseren Patienten hatten alle Patienten ab 17,5kU/l, die erdnussexponiert waren, allergische Reaktionen. Bei Werten bis 17,5kU/l ist keine sichere Vorhersage zu klinischer Reaktion möglich. Dies ist damit also gut vereinbar mit dem diagnostischen Wert von 15kU/l bei Sampson et al.. Daneben besteht offensichtlich kein Zusammenhang zwischen der Schwere der klinischen Reaktion und der Höhe des spezifischen IgE.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass trotz der anamnestisch schweren Reaktionen auf Erdnüsse mit einem hohen Anteil an Patienten mit Atemschwierigkeiten und zwei Patienten mit Bewusstseinsverlust nur in einem Fall mit Adrenalin behandelt wurde. Dies war einer der Patienten mit besonders schwerer Reaktion, der auch bewusstlos war. Dies deutet auf Unterversorgung oder mangelnde Schulung der Patienten hin. Zu bedenken ist allerdings, dass 67% der Patienten bei erster Exposition gegenüber Erdnuss reagierten. Dies erklärt die geringe Vorbereitung der Patienten auf das allergische Ereignis.

Auswahl der Patienten für die Microarrays

Wir wählten für die Microarraystudien Patienten, die wir mit den Fragebögen in Deutschland identifiziert hatten. Daneben untersuchten wir Patienten, die parallel mit dem gleichen Fragebogen in den USA rekrutiert worden waren. Die Auswahl der Patienten mit Hilfe dieser Fragebögen ist mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Ideal wäre es gewesen, die Patienten für die Studie mit einer doppel-blinden Placebo-kontrollierten Nahrungsmittelprovokation zu identifizieren [39, 40, 44]. Es ist aber trotzdem sinnvoll, unsere Patienten auf Grund der klinischen Anamnese zu rekrutieren, da nur Patienten mit glaubhaft systemischen Reaktionen ausgewählt wurden. Die Patienten, die tolerant gegenüber einer bestimmten Nuss waren, hatten diese schon bewusst verzehrt. Neben der ausführlichen klinischen Anamnese hatten die meisten unserer Patienten hohes spezifisches IgE gegen Erdnuss. Der Median für das spezifische IgE gegen Erdnuss lag in allen Gruppen über 15kU/l. Der positiv

prädiktive Wert eines spezifischen IgE gegen Erdnuss von 15kU/l oder mehr liegt in unterschiedlichen Studien bei 92-95% [36, 40]. Aus diesen Gründen ist eine richtige Diagnose in unserem Patientenkollektiv für die Microarrays wahrscheinlich.

5.2 Microarrays:

5.2.1 Microarrays: Methode

Im Laufe der Experimente für diese Arbeit konnte die Peptidmicroarraymethode etabliert und weiter verbessert werden. Alle Schritte des Immunolabelings wurden systematisch überprüft und an die besonderen Anforderungen dieser Methode angepasst.

Wahl der Peptide

Als ein Problem bei den Peptidmicroarrays stellte sich die Stabilität der Peptide dar. Vor den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden Versuchsreihen mit Peptiden eines anderen Herstellers durchgeführt. Die hier verwendeten Peptide PepStar Peptide der Firma JPT werden tiefgefroren in Pufferlösung geliefert und aufbewahrt.

Die vorher benutzten Peptide von Mimotopes waren gefriergetrocknet und mussten in organischem Lösungsmittel gelöst werden. Geringe Bindungen und schlechte Reproduzierbarkeit sowie geringe Spezifität führten zu einer intensiven Fehlersuche. In Massenspektromien stellte sich schließlich heraus, dass die Mimotopes Peptide im Gegensatz zu den JPT-Peptiden instabil waren. Dies zeigt die Notwendigkeit, die Peptide regelmässig zu kontrollieren, um die Qualität der Experimente zu sichern (Abbildung 85).

In den vorangehenden Versuchen wurden 11S Globuline der Erdnuss (Ara h 3), Walnuss (Jug r 4), Haselnuss (Cor a 9), Paranuss (Ber e 2) und Sesam (Ses i 6) untersucht. Bei diesen Versuchen ließen sich keine der bekannten IgE Bindungsstellen der Erdnuss nachweisen. Es gab keine reproduzierbar positiven Peptide. Daneben gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Negativkontrollen.

Diese Probleme konnten mit dem Wechsel auf JPT Peptide behoben werden.

Ara2_10

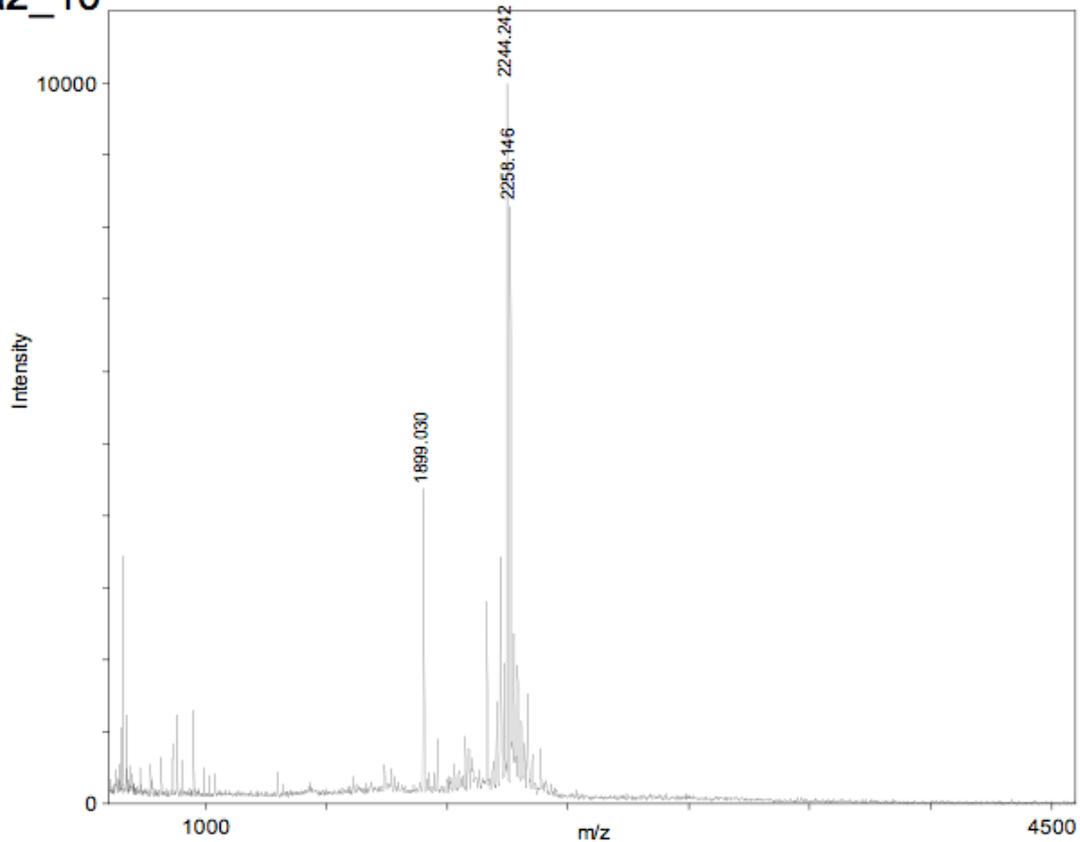


Abbildung 85: Massenspektromie eines Ara h 2 Peptides von JPT. Regelmäßige Kontrollen sind notwendig, die Qualität des verwendeten Materials zu überwachen. Das JPT Peptid zeigt einen der erwarteten Masse entsprechenden Peak.

Qualitative versus quantitative Ergebnisse

Zur Klärung der Frage, ob die Höhe der Fluoreszenzwerte Aussagen über die Konzentration von peptidspezifischem IgE machen kann, liefert das Experiment, bei dem ein Poolserum schrittweise verdünnt wird, wichtige Hinweise. Durch Verdünnung kommt es hier zu einer schrittweisen Reduktion und schließlich zu einem Verlust der Bindung. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass mit der Microarraymethode zumindest semiquantitative Daten zu erheben sind.

Aussagen über qualitative Ergebnisse lassen sich auch aus den Inhibitionsversuchen ableiten. Dabei konnte für alle getesteten Erdnusspeptide ein konzentrationsabhängiger Abfall der IgE-Bindung nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeit wurde daneben mit einem Poolserum überwacht, das bei jedem Versuch auf einem Array getestet wurde und verglichen wurde (Daten nicht gezeigt).

In unserer Auswertung der Versuche, bei denen die unterschiedlichen Patientengruppen verglichen wurden, wurde nur qualitativ bewertet, ob ein Patient an einem Peptid positiv war oder nicht. Es wurden nicht die einzelnen Fluoreszenzwerte miteinander verglichen.

Wie bei Shreffler et al. bestimmten wir in unserer Auswertung unter anderem das Verhältnis der Fluoreszenzwerte für IgE und IgG4 [97]. Die Berechnung des IgE/IgG4 Quotienten sollte allerdings nicht dazu verleiten, direkte Schlüsse aus diesem Wert zu ziehen. Beim Fehlen einer Standardkurve als Referenz, ist keine Aussage über die Bedeutung der Höhe der Werte möglich. Es ist bekannt, dass sich Immunolabelling mit unterschiedlichen Fluorochromen derart unterscheiden kann, dass es zu Verzerrung der Intensitätswerte kommt [102].

Es ist aber anzustreben, auch quantitative Aussagen über Antikörperbindungen mit den Peptidmicroarrays zu machen. Ein quantitativer Ansatz wäre, eine fluoreszenzmarkierte IgE-Standardkurve mit auf die Slides zu drucken, wie dies auch bei der Untersuchung von ganzen Proteinen als Allergene versucht wurde [103].

Nachteil bei dem Vorgehen ist allerdings, dass zum einen im Vergleich zu den Peptiden ganz anderes Material mit auf die Slides gedruckt werden muss. Da sich nicht bestimmen lässt, wie viel Antikörper tatsächlich beim Drucken auf den Slides bleibt, ist kein Vergleich mit anderen Methoden möglich.

Besser wäre es auch, wenn man den eigentlichen Vorgang des Labellings besser beurteilen könnte. Ähnlich wie bei DNA-Microarrays gibt es die Möglichkeit, quantitative Ergebnisse zu erzielen. So können schon fluoreszenzmarkierte Antikörper gedruckt werden und mit einem anderen Cytochrom markiertem Protein inkubiert werden. Über das Verhältnis der Fluoreszenzwerte für Antikörper und Protein, können quantitative Aussagen über das Labelling gemacht werden [104].

Diese Methode eignet sich nicht für unseren Versuchsaufbau, da sonst alle möglichen peptidspezifischen Antikörper auf die Slides gedruckt werden müssten. Es wäre allerdings möglich, ein solches Verfahren in Zukunft zur Überwachung des Labellings zu benutzen. Daneben werden Methoden zur Quantifizierung beschrieben, bei über kompetitive Hemmung von fluoreszenzmarkierter und nicht markierter Probe die Bindung überwacht werden kann [104]. Ein Ansatz bei den Peptidmicroarrays das Labelling qualitativ und quantitativ zu überwachen, wäre es, ein Peptid mit auf die Slides zu drucken, gegen das es einen spezifischen Antikörper gibt, der auch nicht mit dem Nachweis der tatsächlichen Epitope interferiert. Das

wäre zum Beispiel mit einem primären Antikörper einer anderen Klasse, wie zum Beispiel einem IgG möglich. Es wurden erste Versuche mit einem solchen System mit DNP, einem kurzen Peptid, das mit auf die Slides gedruckt wird, unternommen.

Sensitivität

Ein Problem bei den Microarrays ist die im Vergleich zu anderen Methoden geringere Sensitivität. Der Verdacht, dass intensives Waschen für einen Verlust von IgE-Bindung verantwortlich ist, konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte ein Protokoll für die Microarrayversuche erstellt werden, mit dem reproduzierbare und spezifische Bindungen nachgewiesen werden konnten.

Es muss allerdings in Zukunft versucht werden, die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Daneben ist es wichtig, den Microarray durch geeignete Standardisierungsverfahren zu einer quantitativen Methode zu machen.

5.2.2 Unterscheidung der Patientengruppen

Unsere Hypothese war, dass sich erdnussallergische Patienten mit unterschiedlichen klinischen Eigenschaften anhand ihrer Peptidbindung unterscheiden lassen.

Erdnussallergische Patienten mit allergischen Reaktionen gegen Baumnüsse/Sesam sollten andere lineare Epitope erkennen als solche, die diese tolerieren. Dabei war die Vorstellung, dass diese Patienten eher an Peptiden binden, die eine ausreichend hohe Sequenzhomologie haben, so dass IgE-Antikörper kreuzreagieren können. Durch die Identifikation dieser diskriminierenden Epitope sollte die Grundlage für einen diagnostischen Test geschaffen werden, der eine Unterscheidung der Patientengruppen möglich macht.

In den vorliegenden Versuchen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden. Weder die Clusteranalyse, die bestimmte Bindungsmuster in den einzelnen Patientengruppen aufdecken sollte, noch die Analyse der Häufigkeit der Bindungen an den einzelnen Peptiden konnte Unterschiede zwischen baumnussallergischen und baumnusstoleranten Erdnussallergikern nachweisen. Allein deskriptiv ließen sich Kandidatenpeptide identifizieren, die auf Unterschiede zwischen den Patientengruppen hinweisen könnten.

Mögliche Erklärungen

Für diese Ergebnisse sind unterschiedliche Erklärungen denkbar. Zum einen ist es möglich, dass es wirklich keine Unterschiede zwischen den untersuchten erdnussallergischen Patienten in Bezug auf die Bindung an den untersuchten linearen Epitopen gibt. Zum anderen könnte es allerdings auch sein, dass es doch Unterschiede in der Peptidbindung gibt, diese sich aber wegen zu geringer Sensitivität der Methode nicht nachweisen lassen. Die beschriebenen Kandidatenpeptide wären als Hinweis auf Unterschiede im Erkennen von linearen Peptiden zu verstehen, die weiter untersucht werden müssen.

IgE-Epitoperkennung im Vergleich zu Vorversuchen

Zur Beurteilung der Ergebnisse unserer Versuche ist es wichtig zu analysieren, welche Epitope im Vergleich zu vorangehenden Studien erkannt werden. Dabei sind methodische Unterschiede in verschiedenen Studien zu beachten. Die von uns beobachtete IgE-Bindung an lineare Erdnusspeptide ist gut vereinbar mit Ergebnissen anderer Peptidmicroarraystudien. So werden in unserer Studie alle Regionen von Ara h 2 erkannt, die in einer vorangehenden Microarraystudie von Shreffler et al. beschrieben wurden [97]. Auch die in unseren Versuchen auffallende Heterogenität der IgE-Bindung an linearen Epitopen der Erdnuss im Vergleich verschiedener Patienten wurde in anderen Microarraystudien beobachtet. So untersuchten Shreffler et al. Seren von 77 erdnussallergischen Patienten auf IgE-Bindung an linearen Epitopen von Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 [60]. Kein einziges der untersuchten Peptide wurde von mehr als 35% der Patienten erkannt. Neben den Besonderheiten der Microarraymethode wird bei Shreffler et al. die vergleichsweise große Patientengruppe für die Heterogenität der Bindungen verantwortlich gemacht [60]. In unserer Studie werden im Vergleich dazu einzelne Peptide häufiger erkannt. So wird beispielsweise Ara h 2.003 von etwa 50-60% der Patienten erkannt. Ara h 2.010 wird sogar von >80% der erdnuss- und haselnussallergischen Patienten positiv. Der Vergleich mit vorangehenden Studien deutet auch darauf hin, dass es sich hier um spezifische IgE-Bindungen handelt: Diese Epitope wurden auch im Immunoblot als immunodominante Epitope von Ara h 2 beschrieben [46]. Allerdings werden die meisten Peptide bei uns im Vergleich zu Immunoblotstudien seltener erkannt. Wir untersuchten Regionen, in denen sich nach den Ergebnissen aus anderen Studien lineare Epitope der Erdnuss befanden [46, 48, 59]. Einige der

untersuchten Peptide werden in diesen Studien von allen untersuchten Patienten erkannt. Hierbei wurden allerdings nur kleine Patientengruppen untersucht. Insgesamt sind die Ergebnisse unserer Versuche gut mit Vorversuchen vereinbar. Die Tatsache, dass bei uns einzelne Peptide im Vergleich zu vorangehenden Microarraystudien häufiger erkannt werden, kann ein Hinweis auf verbesserte Sensitivität der Methode sein [60, 97].

Vergleich zu den anderen Studien, die Unterschiede in Peptidbindungen nachweisen

Wenn sich auch in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Erdnussallergikern mit und solchen ohne Co-Allergien auf Baumnüsse und Sesam finden, gibt es doch Hinweise auf den Nutzen von Peptidmicroarrays in der Vorhersage klinischer Reaktivität bei Nahrungsmittelallergien. So gibt es Unterschiede im Erkennen von linearen Epitopen zwischen Patienten mit transienten und persistierenden Allergien [62, 63]. In diesen Studien erkannten Patienten mit persistierender Kuhmilchallergie bestimmte lineare Epitope von Kuhmilchallergenen, die von Patienten mit transientser Allergie nicht erkannt wurden. Allerdings gibt es neben der unterschiedlichen Fragestellung auch im Aufbau der Experimente Unterschiede zu unseren Versuchen. Zum einen sind die untersuchten Patientengruppen mit 9 vs. 8 untersuchten Patienten bei Chatchatee et al. [63] kleiner als in unserer Studie. Allerdings konnten die Ergebnisse mit einer größeren Patientenzahl reproduziert werden [105]. Zum anderen unterscheiden sich die untersuchten Patientengruppen in der Kuhmilchstudie im spezifischen IgE gegen Kuhmilch. Alle Patienten mit persistierender Kuhmilchallergie hatten spezifische IgE-Werte von 60-100kU/l, in der Vergleichsgruppe lagen die Werte alle unter 30kU/l. Allein dies könnte eine unterschiedliche Häufigkeit von Bindungen begründen. Unabhängig vom spezifischen IgE finden sich dagegen in einer anderen Studie Unterschiede in der Peptiderkennung zwischen erdnussensibilisierten Patienten mit und ohne klinische Reaktion [61]. Hier sind die diagnostischen Peptide von Ara h 2 in 60-73% der erdnussallergischen Patienten positiv, aber nur in 6% der Patienten ohne klinische Reaktionen. Daneben sind zwei Ara h 1 Epitope in 20-40% der erdnussallergischen Patienten positiv, und werden von keinem der Toleranten erkannt. Bei diesen Versuchen wurde die SPOTS Membrane Methode benutzt. Unsere Patienten hatten im Gegensatz dazu alle Reaktionen gegen Erdnüsse. Die

Patienten waren sich folglich klinisch in Bezug auf ihre Erdnussallergie sehr ähnlich. Gleichzeitig wurden in unseren Versuchen vor allem Regionen untersucht, in denen sich die linearen Epitope der Erdnussallergene befanden. Da auch wenig Bindung an den Baumnuss- und Sesampeptiden festzustellen ist, kann es sein, dass die Epitope von Baumnüssen und Sesam an anderen Stellen der Proteine liegen. Das könnte den fehlenden Unterschied zwischen den Patientengruppen erklären, die sich nur in ihrer Baumnussallergie unterscheiden.

In einer anderen Studie wird eine Korrelation zwischen Epitopdiversität und IgE-Funktion beschrieben, da Patienten mit besonders schweren Reaktionen auf Erdnüsse mehr unterschiedliche lineare Epitope erkannten [60]. Auch auf einen solchen Unterschied finden wir in unserer Studie keinen Hinweis. So gab es keine Unterschiede in der Anzahl der erkannten Peptide pro Patient in den verschiedenen Gruppen.

IgE-Bindung bei Baumnuss-/Sesampeptiden

Auffallend in unseren Versuchen ist, dass zum einen viele IgE-Bindungen in Regionen liegen, die vergleichsweise gering konserviert sind. Zudem zeigen die untersuchten Baumnuss- und Sesampeptide nur wenige Bindungen. Die Tatsache, dass sich aber im Immunolabelling auch in häufig bindenden Regionen der Erdnussallergene mit hoher Sequenzhomologie zu einer Baumnuss keine IgE-Bindung bei der jeweiligen Baumnuss nachweisen lässt, kann die Hypothese, dass die Sequenzhomologie für das klinisch zu beobachtende gemeinsame Auftreten von Erdnuss und Baumnussallergie verantwortlich ist, nicht unterstützen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass kreuzreagierende Antikörper dazu führen, dass auch die korrespondierenden Baumnusssequenzen Bindungen zeigen. Der geringe Nachweis von IgE-Bindung an den Baumnuss- und Sesamsequenzen kann zum einen in geringer Sensitivität der Methode begründet sein. Auf der anderen Seite deuten aber auch die Inhibitionsexperimente auf die wahrscheinlich geringe Bedeutung von kreuzreagierenden IgE-Antikörpern hin (s. unten). Da die Bindung an den Erdnusspeptiden den mit anderen Methoden identifizierten Epitopen entspricht, ist die geringe Bindung an den Walnuss-, Sesam- und Haselnusspeptiden glaubhaft. Es wurden auch nicht die gesamten Sequenzen der Allergene untersucht, sondern nur die Regionen, in denen sich schon vorher identifizierte lineare Epitope vornehmlich

der Erdnuss befinden. Es ist also gut möglich, dass sich die linearen Epitope der anderen untersuchten Allergene an anderen Stellen der Proteine befinden.

Beurteilung der Auswertung

Die große Heterogenität der Bindungsmuster von verschiedenen Patienten erklärt, warum eine Unterscheidung der Patientengruppen mit der Cluster Analyse nicht möglich ist. Dazu wäre es nötig gewesen, dass Vertreter der einzelnen Gruppen mit hoher Korrelation zusammenclustern und geringe Korrelation zu den Clustern der anderen Gruppen haben. Das ist allein deshalb nicht zu erwarten, weil die einzelnen Peptide in vielen Fällen nur bei etwa 30% der Patienten einer Gruppe positiv sind. In der Cluster Analyse war es auch nicht möglich, Peptide zu identifizieren, die ein ähnliches Bindungsmuster zeigen und damit Hinweise auf Kreuzreaktivität liefern. Dies ist aber auch zu erwarten, da die zu den Erdnusssequenzen homologen Baumnuss- und Sesamsequenzen nur sehr selten positiv sind.

Es wurde deshalb versucht, Peptide zu identifizieren, die auf Grund unterschiedlich häufiger Bindung in den unterschiedlichen Gruppen als diskriminierende Peptide in Frage kommen. Dies ist ein Vorgehen, das auch in anderen Studien lineare Epitope aufdecken soll, die Patientengruppen unterscheiden [61-63]. Der Chitest mit Bonferroni Korrektur zeigt bei uns keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen. Dies ist allerdings auch eine sehr konservative Methode. In vergleichbaren Studien wurden die Unterschiede an einzelnen Peptiden nur deskriptiv dargestellt [61, 63]. Dies wäre auch in unserer Studie berechtigt, da die Microarray-Methode gerade den Vorteil hat, dass man große Anzahlen von verschiedenen Proben auf unterschiedliches Bindungsverhalten screenen kann. Dabei ist in unserem Fall auch ein Problem, dass es nicht möglich ist, vorherzusagen, wo man beispielsweise Kreuzreaktivität erwartet. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Austausch einzelner Aminosäuren zu Verlust von Bindung führt [46-48]. Andererseits ist nicht allein aus der Position oder Art der ausgetauschten Aminosäure darauf zu schließen, welche Aminosäuren konserviert sein müssen, um IgE-Bindung zu erhalten. Dies wird erschwert, wenn wie unserem Beispiel im Vergleich der Sequenzen nicht mehr nur eine sondern mehrere Aminosäuren unterschiedlich sind. Dies macht es unmöglich, sichere Kandidaten für kreuzreagierende Peptide vorherzusagen. Deshalb müssen alle Peptide ohne Vorauswahl getestet werden.

Um durch die konservative Methode der Auswertung keine potentiell diagnostisch verwertbaren Peptide zu verlieren, wurden zusätzlich Kandidatenpeptide aufgestellt, die eine Unterscheidung der Patientengruppen doch möglich machen könnten. Dies waren Peptide, die in den Gruppen um mindestens 15% unterschiedlich häufig vorkamen.

Kandidatenpeptide

Für die Haselnusspeptide ergibt sich eine besondere Situation. Hier finden sich die größten Unterschiede bei linearen Epitopen von Ara h 2. Dies könnte ein Hinweis auf ein Haselnussallergen mit einer in dieser Region sehr ähnlichen Sequenz zu Ara h 2 sein. Ein 2S Albumin der Haselnuss konnte bisher nicht identifiziert werden. Da die haselnussallergischen Patienten die überlappenden Ara h 2 Sequenzen 008, 009 und 010 viel häufiger erkennen als die haselnusstoleranten Patienten, könnte es sich hier um kreuzreagierende Antikörper handeln, die eigentlich gegen die homologe Sequenz eines 2S Albumins der Haselnuss gerichtet sind. Auf Grund dieser Vermutung kann versucht werden, auf Basis der Sequenz von Ara h 2 an dieser Stelle einen Primer für die Identifikation des 2S Albumins der Haselnuss aus der Proteinbibliothek zu entwickeln.

Bei den Sesampatienten finden sich Unterschiede in den Sesampeptiden Ses i 2.004 und 019. Besonders bei Ses i 2.019, das bei 26,3% der sesamallergischen Patienten und nur 3,8% der sesamtoleranten Patienten erkannt wird, wird hier mit großer Wahrscheinlichkeit ein lineares Epitop von Ses i 2 identifiziert. Diese Sesampeptide liegen allerdings auch nicht in Bereichen großer Homologie im Vergleich zu Ara h 2. Es ist also unwahrscheinlich, dass kreuzreagierende Antikörper für die Bindungen an diese Sequenzen verantwortlich sind, auch wenn im Falle von Ses i 2.004 das korrespondierende Erdnusspeptid bei vielen Patienten positiv ist. An dieser Stelle besteht keine Sequenzhomologie mit identischen Aminosäuren.

5.2.3 Microarrays: Inhibitionsversuche

Eine Allergie auf mindestens eine andere Baumnuss ist eine häufige klinische Beobachtung bei erdnussallergischen Patienten [4]. Verschiedene immunologische Studien zeigen IgE-Kreuzreaktivität zwischen Allergenen von Erdnuss und Baumnüssen im Inhibitions-ELISA [89, 98].

Mit der direkten Inkubation von Erdnuss- und Baumnusssequenzen, die im vorangehenden Teil diskutiert wird, ist jedoch keine Aussage über kreuzreagierende Antikörper zu machen. Auch wenn korrespondierende Sequenzen von Erdnuss und Baumnüssen gebunden werden, ist das kein Beweis für das Vorliegen von kreuzreagierenden Antikörpern. Deshalb wurde versucht, in Inhibitionsexperimenten Hinweise auf kreuzreagierende peptidspezifische IgE-Antikörper zu finden. Die Inhibition von IgE-Bindungen am Erdnusspeptid durch das korrespondierende Walnusspeptid war an einer Stelle möglich (Abbildung 80). Damit konnten erstmals peptidspezifische kreuzreagierende IgE-Antikörper nachgewiesen werden. Die Inhibition war daneben konzentrationsabhängig.

Spezifität der Erdnussbindung und Inhibition mit Walnuss-/ Sesampeptiden

Um die Spezifität der Inhibition durch Sesam- und Walnusspeptide beurteilen zu können, wurden zunächst Inhibitionsversuche von Erdnusspeptiden mit Erdnusspeptiden durchgeführt. Diese Peptide konnten sehr spezifisch die IgE-Bindung an dem jeweiligen Epitop eliminieren. Es ist also von hoher Spezifität der Peptidbindung auszugehen. Daneben wurden Inhibitionsversuche mit zu den untersuchten Erdnusspeptiden in der Sequenz korrespondierenden Walnuss- und Sesampeptiden durchgeführt. Hier konnte Inhibition von korrespondierenden Ara h 3 Peptiden durch Jug r 4.004 gezeigt werden (Abbildung 80). Vor dem Hintergrund, dass zum einen die Walnuss- und Sesampeptide die Bindung genau an den erwarteten korrespondierenden Sequenzen der Erdnuss aufhoben und zum anderen auch die Spezifität der Erdnussbindung durch direkte Inhibition durch Erdnusspeptide gezeigt werden konnte, ist von Kreuzreaktivität auszugehen. Die gezeigte Inhibition ist damit kein zufälliges Phänomen, sondern beruht auf der hohen Homologie der Sequenzen. Dies wird auch durch die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition bestätigt. Durch Jug r 4.008 (Abbildung 81), Jug r 4.024 (Abbildung 76) sowie durch Ses i 6.008 (Abbildung 77) konnte zwar auch ein geringer Abfall der IgE-Bindungen an die korrespondierenden Ara h 3 Peptide erreicht werden. Hier ließ sich allerdings keine sichere und reproduzierbare Inhibitionskinetik erkennen. Wenn überhaupt zeigt sich hier, dass erdnusspeptidspezifische Antikörper mit sehr geringer Affinität auch an die betreffenden Walnuss- und Sesamsequenzen binden können. Es war auch bei hoher Konzentration der betreffenden Walnuss- und Sesamsequenz keine

vollständige Inhibition der IgE-Bindung an die Erdnusssequenz möglich. Die klinische Bedeutung dieser wenn überhaupt dann geringen Kreuzreaktivität ist zweifelhaft.

Vorhersage von Kreuzreaktivität

Gleichzeitig ist es nicht möglich, allein auf Basis des Anteils an ähnlichen Aminosäuren von zwei Peptiden vorherzusagen, ob sich für zwei Sequenzen kreuzreagierende Antikörper finden. So können auch Sequenzen mit hoher Aminosäurehomologie wie z.B. Ses i 3.031 keine Inhibition an Ara h 1.031 hervorrufen (46% identische Aminosäuren, 73% Homologie) (Abbildung 79). Dies ist auf Grund vorheriger Experimente auch zu erwarten. So konnte gezeigt werden, dass Austausch einzelner Aminosäuren in linearen Epitopen der Erdnuss durch Alanin die IgE-Bindung an den Epitopen aufheben konnte [48, 59]. Dabei konnte weder die Art der ausgetauschten Aminosäure noch deren Position innerhalb des linearen Epitops vorhersagen, ob eine Mutation zu Alanin die IgE-Bindung beeinträchtigen würde oder nicht. Allerdings ist kein direkter Vergleich mit unseren Experimenten möglich. Im Vergleich unserer Erdnuss- und Baumnusspeptide waren immer mehrere Aminosäuren unterschiedlich. Bei Jug r 4.004 sind genau die Aminosäuren konserviert, die im linearen Epitop von Ara h 3 für die Bindung wichtig erschienen [48]. Das gilt nicht für Jug r 4.008, was die geringere Fähigkeit zur Inhibition erklären könnte (Abbildung 81). Es werden hier viel höhere Konzentrationen des Walnusspeptids benötigt, um einen geringen Abfall der Erdnusspeptidbindung hervorzurufen. Da für die IgE-Bindung möglicherweise kritische Aminosäuren nicht konserviert sind, ist die Affinität hier geringer. Die Frage, welche Eigenschaften Peptide haben müssen, damit IgE-Antikörper kreuzreagieren können, kann in unseren Versuchen nicht geklärt werden. Eine FAO/WHO Expertenkommission geht davon aus, dass ein Protein als potenziell kreuzreaktiv angesehen werden muss, wenn es eine Identität von mindestens 6 folgenden AS hat oder mehr als 35% Sequenzähnlichkeit über ein Fenster von 80 Aminosäuren verglichen mit bekannten Allergenen [106]. Natürlich besteht bei unseren Versuchen die Einschränkung, dass nicht alle Epitope der Erdnusspeptide auf mögliche kreuzreagierende Antikörper untersucht wurden. Allerdings wurden schon besonders homologe Regionen ausgewählt. Außerdem ist in diesem Zusammenhang auch wichtig, dass sich in den Experimenten, in denen die unterschiedlichen Patientengruppen untersucht werden (Erdnuss pos,

Baumnuss/Sesam tolerant vs. allergisch), nur wenige Hinweise auf kreuzreagierende Antikörper finden. Natürlich kann im einfachen Immunolabelling keine Kreuzreaktion gezeigt werden, da eine Unterscheidung zwischen Kreuzreaktion und Sensibilisierung gegen beide korrespondierende Sequenzen nicht möglich ist. Dies ist nur durch Inhibition möglich. Allerdings wäre unter der Annahme, dass kreuzreagierende Antikörper für ähnliche Sequenzen vorkommen, zu erwarten gewesen, dass mehr Sesam/Baumnusspeptide positiv sind. Der fehlende Nachweis von Bindungen an den Baumnusspeptiden ist gut vereinbar mit den vergleichsweise hohen Konzentrationen, die für die Inhibition mit Baumnusspeptiden benötigt werden. Es ist allerdings von Nachteil, dass nicht die gesamten Sequenzen der Allergene untersucht wurden, sondern nur Regionen, in denen sich vorbeschriebene Epitope befanden. Auf Grundlage der vorliegenden Experimente ist anzunehmen, dass sich die linearen IgE-Bindungsstellen der untersuchten Baumnüsse und Sesam in anderen Regionen befinden als die der Erdnuss. Das häufige gemeinsame Auftreten von Erdnuss- und Baumnusssequenzen scheint damit in den meisten Fällen nicht auf die Ähnlichkeit der Sequenzen der Samenspeicherproteine im Bereich der IgE-Bindungsstellen der Erdnuss zurück zu führen zu sein.

Es kann also sein, dass Regionen für die Kreuzreaktivität wichtig sind, die in unseren Versuchen nicht untersucht wurden. Dies muss geprüft werden. An den untersuchten linearen Epitopen von Ara h 1 und 2 ruft die Ähnlichkeit der Sequenzen von Erdnuss und Walnuss/Sesam keine Kreuzreaktivität hervor. Es kann also auch sein, dass besonders die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen lineare Epitope von Ara h 3 für das klinisch zu beobachtende gemeinsame Auftreten von Erdnuss und Walnussallergie verantwortlich sind.

Die Frage, welche Rolle Konformationsepitope bei der Entstehung von Kreuzreaktivität haben, ist mit den vorliegenden Versuchen nicht zu beantworten. Konformationsepitope als Ursache könnten aber auch eine Erklärung für das klinische gemeinsame Auftreten von Erdnuss- und Baumnussallergien sein. Es wird zwar auf Grund von Verdauung durch Verdauungsenzyme von einer besonderen Bedeutung von linearen Epitopen ausgegangen. Die Struktur von Ara h 1 kann aber die IgE-Epitope vor Degradation schützen [107]. Daneben befinden sich alle drei immunodominanten Epitope von Ara h 2 auf einem 10kDa proteinaseresistenten Fragment des Proteins [74]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ara h 2 als

Trypsininhibitor wirkt und seine einige Verdauung hemmen kann. Rösten verstärkt diese Funktion [108]. Die mögliche Rolle von Konformationsepitopen könnte erklären, warum die IgE-Antikörper nicht stärker kreuzreagieren.

Kohlenhydratreste könnten ebenfalls zu der IgE-Kreuzreaktivität beitragen. Allerdings ist die klinische Bedeutung der gegen Kohlenhydratreste gerichteten Antikörper zweifelhaft [109]. 29 von 32 Graspollen-sensibilisierten Patienten hatten in einer Studie IgE-Antikörper gegen Kohlenhydratseitenketten von Erdnussproteinen, aber nur einer von vier Patienten mit einer positiven Anamnese und Diagnose von Erdnussallergie zeigte eine solche Reaktion.

Außerdem ist möglich, dass nicht die untersuchten 2S Albumine, 7S Globuline und 11S Globuline sondern andere Allergene für die aus dem klinischen Bild zu vermutende Kreuzreaktivität zwischen Erdnüssen und Baumnüssen verantwortlich sind.

Bei den von uns untersuchten Patienten haben die walnussallergischen Erdnussallergiker signifikant höhere Werte für spezifisches IgE gegen Walnuss als die walnusstoleranten Erdnussallergiker. Im Vergleich der haselnusstoleranten und der haselnussallergischen Erdnussallergiker und der sesamallergischen/ sesamtoleranten Erdnussallergiker fanden sich allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des spezifischen IgE gegen Haselnuss bzw. Sesam. Dies ist gut vereinbar mit Ergebnissen einer Studie über 1000 nussallergische Patienten, die auf mindestens eine der folgenden Nüsse allergisch waren: Erdnuss, Haselnuss, Mandel und Walnuss [37]. In dieser Gruppe waren 46% der Patienten, die eine bestimmte Nuss tolerierten, gegenüber der betreffenden Nuss sensibilisiert. Dies ist bei unseren Patienten ähnlich. Die Werte für das spezifische IgE gegen Haselnuss und Sesam unterscheiden sich bei den Patienten deshalb nicht, weil viele haselnusstolerante Patienten haselnussensibilisiert sind (Median für das spezifische IgE gegen Haselnuss 1,94kU/l) und viele sesamtolerante Patienten sesamsensibilisiert (Median des spezifischen IgE gegen Sesam 2,02kU/l). Offenbar sagt aber diese Sensibilisierung nichts über die klinische Reaktivität aus. Über den Grund für diese Sensibilisierung kann man nur spekulieren. Vielleicht handelt es sich es sich um eigentlich erdnusspezifische IgE-Antikörper, die mit Haselnuss- und Sesamproteinen im ImmunoCAP kreuzreagieren, aber keine klinische Bedeutung haben.

Vergleich mit anderen Studien zu kreuzreagierenden IgE-Antikörpern bei Nussallergien

Es gibt keine anderen Studien zu kreuzreagierenden Antikörpern, die gegen lineare Peptide gerichtet sind. Allerdings gibt es verschiedene Studien, die Kreuzreaktivität von IgE-Antikörpern gegen Extrakte aus Erdnüssen und Baumnüssen untersuchen. Diese kommen zum Teil zu unterschiedlichen Ergebnissen.

De Leon et al. konnten durch Vorinkubation von Seren mit Allergenextrakten Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Nüssen nachweisen [89]. Inhibition mit Mandel-, Paranuss- und Haselnussextrakten konnte zu verminderter IgE-Bindung an Erdnussextrakt führen. Dies wurde als Zeichen von Kreuzreaktivität gewertet. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Studie von Goetz et al., in der sich im Inhibitions-ELISA mit gepoolten Seren von erdnuss- und baumnussallergischen Patienten keine Inhibition von Erdnuss IgE-Bindung durch Baumnussextrakte findet [110]. Bei den Baumnüssen werden dort zwei Gruppen mit Kreuzreaktivität im ELISA identifiziert: zum einen Walnuss, Pekannuss und Haselnuss und zum anderen Haselnuss, Cashew, Paranuss, Pistazie und Mandel. Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Baumnüssen konnte auch von verschiedenen anderen Autoren gezeigt werden. So ließen Inhibitionsimmunoblots mit Albuminfraktionen von Walnuss und Haselnuss als Inhibitoren eine signifikante Kreuzreaktivität zwischen dieser Fraktion und Mandel Conglutin-gamma, geringere Kreuzreaktivität auch für Mandel 2S Albumin erkennen [111]. Partielle Kreuzreaktivität konnte für Macadamia und Haselnuss gezeigt werden [112]. Haselnuss hat daneben auch verschiedene kreuzreagierende Proteine mit Sesam und Mohn neben Allergenen, die mit der pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie verbunden sind [79, 80, 113].

Es konnte bei erdnussallergischen Patienten gezeigt werden, dass durch Präinkubation mit Paranuss und Mandel die Bindung an rekombinantem Ara h 2 gehemmt werden konnte [114]. Aufgereinigtes spezifisches IgE gegen Ara h 2 zeigte daneben Bindung gegen Proteinfractionen von Paranuss und Mandel.

In unserer Studie fanden sich kreuzreagierende Antikörper bei Peptiden der 11S Globuline. In vorangehenden Studien wurden zur Untersuchung von Kreuzreaktivität zwischen Jug r 4 und Proteinen anderer Baumnüsse Seren mit einer Serie von Extrakten präinkubiert [51]. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit Anamnese von Baumnussallergien die IgE-Bindung an Jug r 4 durch Präinkubation mit

Baumnussextrakten (Cashew, Haselnuss) inhibiert werden konnte. Ein großes Maß an Kreuzreaktivität zwischen den Proteinen der Legumingruppe wird auf Grund dieser Ergebnisse angenommen. Ebenso konnte in einem von drei Seren Präinkubation mit Erdnuss eine IgE-Bindung an Jug r 4 verhindern [51]. Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit der gezeigten Kreuzreaktivität auf Peptidebene bei den 11S Globulinen.

Im Gegensatz zu den getesteten Ara h 3 Peptiden konnte bei den von uns untersuchten Ara h 1 und Ara h 2 Peptiden keine oder nur sehr geringe Inhibition durch die korrespondierenden Sesam- und Walnusspeptide erreicht werden. Von den untersuchten Peptiden zeigte nur Ara h 3.004 bei hoher Konzentration von Jug r 4.004 einen Abfall der Bindung (Abbildung 80).

Die geringe oder fehlende Kreuzreaktivität zwischen Peptiden von Ara h 1 und Jug r 2 ist gut vereinbar mit Versuchen, die Kreuzreaktivität der ganzen Proteine untersuchen. Ara h 1 und Jug r 2 sind beide Viciline, aber sie zeigen keine signifikante IgE-Kreuzreaktivität in Inhibitionsexperimenten [77]. Allerdings wurde bei Präinkubation von Seren von zwei walnussallergischen Patienten mit rohem Erdnussextrakt die IgE-Bindung an rohem Walnussextrakt stark vermindert, was für Kreuzreaktivität spricht. Für dieses Phänomen könnten nach unseren Versuchen also auch kreuzreaktive Antikörper gegen 11S Globulinsequenzen verantwortlich sein.

In unseren Inhibitionsexperimenten wurde nur ein Epitop von Ara h 2 untersucht (Abbildung 84). Das Ergebnis der fehlenden Kreuzreaktivität an dieser Stelle ist aber vereinbar mit Computermodellen zur räumlichen Struktur der 2S Albumine [115]. Darin zeigt sich in der räumlichen Anordnung der linearen IgE-bindenden Epitope im dreidimensionalen Modell keine strukturelle Homologie mit den entsprechenden Regionen von Jug r 1, Ber e 2 (Paranuss) und Car i 1 (Pekannuss). Das molekulare Mapping der 10 linearen B-Zellepitope auf der Polypeptidkette von Ara h 2 zeigt eine gute Exposition auf der molekularen Oberfläche des dreidimensionalen Modells. Dies trifft vor allem auf die zwei Hauptepitope zu, die einem herausgestreckten N-terminalen und prolinreichen Extraloop von Ara h 2 entsprechen. Dieser Loop besitzt eine dreidimensionale Konformation, die sich von den korrespondierenden kürzeren Extraloops der anderen Nussallergene unterscheidet (Jug r 1, Car i 1). Obwohl die anderen Epitope in den verschiedenen 2S Albuminen besser konserviert sind,

unterscheiden sie sich ebenfalls durch ihre dreidimensionale Konformation voneinander. Die meisten dieser Epitope scheinen spezifisch für Ara h 2 zu sein und sind deshalb ungeeignet, IgE-Kreuzreaktivität mit anderen Nussallergenen zu begünstigen. Das für Jug r 1 beschriebene Epitop QGLRGEEMEEMV unterscheidet sich sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der Konformation von der korrespondierenden Region von Ara h 2. Allerdings ist dieses Epitop (Jug r 1) gut konserviert im Pekannussallergen Car i 1, dem Cashewallergen Ana o 3 und dem Paranussallergen Ber e 1. Dies könnte für die IgE-Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Baumüssen verantwortlich sein. Obwohl die Gesamtstruktur der 2S Albumine also bei den einzelnen Vertretern gut konserviert ist, teilen sie im Computermodell keine gemeinsamen oberflächenexponierten B-Zellepitope.

Lineare IgE-bindende Epitope von Ara h 3 und von Jug r 4, Cor a 9 und Ana o 2 (Cashew) wurden ebenfalls in einem dreidimensionalen Proteinmodell untersucht. Die dabei gefundene strukturelle Homologie könnte für kreuzreagierende IgE-Antikörper verantwortlich sein [116]. Dies steht im Gegensatz zum fehlenden Nachweis von IgE-Bindung an Walnuss- und Haselnusspeptiden in unserer Studie. Auf der anderen Seite fand sich in den Inhibitionsexperimenten bei den 11S Globulinen für einige Peptide eine mögliche Inhibition, wenn diese auch nicht eindeutig einer klaren Inhibitionskinetik folgte. Allerdings berücksichtigt die Analyse des Proteinmodells auch die räumliche Anordnung der Epitope und damit die Konformation.

In einer weiteren Untersuchung wurde die räumliche Konformation von Epitopen der Viciline analysiert. Es fand sich im Modell, dass als Epitope der Erdnuss identifizierte Sequenzen und homologe Regionen von verschiedenen Baumüssen eine ähnliche dreidimensionale Konformation aufweisen [117]. Dies wird als Ursache einer Kreuzreaktivität interpretiert. Allerdings gilt auch hier, dass zum einen die Konformation dieser Regionen untersucht wurde, die eine größere Rolle spielen könnte als von uns angenommen. Zum anderen handelt es sich hier um ein Modell, das nicht auf seine funktionelle Relevanz getestet wird.

Insgesamt ist auch in unseren Versuchen Kreuzreaktivität auch nicht auszuschließen. Zwei Proteine sind kreuzreaktiv, wenn mindestens ein Antikörper an beide Proteine bindet. Da es unmöglich ist, alle möglichen Antikörper zu testen, ist es unmöglich zu

beweisen, dass zwei Proteine nicht kreuzreagieren. In den meisten Fällen muss allerdings die Affinität der Interaktion wahrscheinlich eine gewisse Schwelle übersteigen, um klinisch bedeutsam zu werden [118].

Klinische Bedeutung der kreuzreagierenden Antikörper

Im Gegensatz zu den Versuchen, die Unterschiede zwischen den Patientengruppen zeigen sollen, finden sich in den Inhibitionsversuchen Hinweise auf kreuzreagierende Antikörper auch an Stellen, bei denen im direkten Immunolabeling keine Baumnusspeptidbindung nachzuweisen war. Dies ist ein Hinweis auf die weit größere Sensitivität dieser Methode. Allerdings stellt sich die Frage, ob diese Antikörper auch funktionell von Bedeutung sind.

In anderen Studien konnte die funktionelle Bedeutung von kreuzreagierenden Antikörpern gezeigt werden [119]. Erdnuss-spezifisches IgE, das mit Baumussallergenen kreuzreagiert kann demnach Effektorzellen aktivieren. Dazu wurden basophile Zellen mit erdnusspezifischem IgE sensibilisiert und mit verschiedenen Baumüssen stimuliert. In unseren Versuchen ist keine Aussage darüber möglich, ob die gezeigten kreuzreagierenden Antikörper tatsächlich bei der Auslösung einer allergischen Reaktion eine Rolle spielen. Zur Klärung dieser Frage könnte ebenfalls die Reaktion von basophilen Zellen untersucht werden. In einem ähnlichen Versuch wurde von Shreffler et al. die funktionelle Bedeutung von linearen Epitopen gezeigt [60]. Allerdings ist zu bedenken, dass es sich auch bei diesen Versuchen um *in-vitro* Verfahren handelt, die keine sicheren Vorhersagen über das Verhalten *in-vivo* zulassen.

In den Inhibitionsversuchen mit steigender Menge Peptid zur Inhibition zeigte sich, dass weit höhere Mengen Walnuss- und Sesampeptid benötigt wurden, um im Vergleich zur korrespondierenden Erdnusssequenz den gleichen Hemmeffekt hervorzurufen. Dies lässt auf eine geringere Affinität der IgE-Antikörper gegenüber den Baumnusssequenzen schließen. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit Mutationsanalysen von Ara h 3 [120]. Darin zeigte sich, dass höhere Mengen an modifiziertem Ara h 3 benötigt wurden, um mit Wildtyp-Ara h 3 um erdnusspezifisches IgE zu konkurrieren (um 50% Inhibition zu erreichen wurden 20-30 fach höhere Konzentrationen von modifiziertem Ara h 3 gebraucht als vom Wildtyp). Immunoblotanalysen mit Serum IgE von Ara h 3-allergischen Patienten

zeigten, dass die IgE-Bindung des modifizierten Ara h 3 um 35-85% im Verhältnis zum Wildtyp abnahm. T-Zellproliferation und Aktivierung war noch möglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass relativ kleine Änderungen in der Primärstruktur des Allergens die IgE-Bindung signifikant stören können.

Es ist anhand unserer Versuche möglich, vergleichende Aussagen über die Affinität von IgE-Antikörpern, die gegen Peptide gerichtet sind, zu machen. Dies ist ein Ansatzpunkt, die Affinität von peptidspezifischen Antikörpern auch quantitativ zu beschreiben. Dazu können die Inhibitionskurven miteinander verglichen werden (Abbildung 77- Abbildung 84).

Man kann so über den Vergleich der konzentrationsabhängigen Inhibitionskurven die Bindung einzelner IgE-Klone an Erdnuss- und korrespondierende Baumnusspeptide untersuchen. Daneben ist auch ein Vergleich der IgE-Bindungsaffinität von klinisch unterschiedlichen Patienten möglich. Dies wurde in unseren Experimenten mit den verschiedenen Poolseren (erdnussallergisch, walnussallergisch vs. erdnussallergisch, walnusstolerant) versucht. Unterschiede in der Affinität von IgE-Antikörpern bei der Bindung an linearen Epitopen könnten wie in diesen Versuchen auch zu diagnostischen Zwecken untersucht werden. Es wäre sinnvoll, in weiteren Versuchen die Affinität der IgE-Antikörper in verschiedenen Patientengruppen genauer zu analysieren.

Die Inhibition mit serieller Verdünnung liefert viel genauere Aussagen über die Bindung als der bloße Vergleich der Fluoreszenzwerte im direkten Labelling. Es sind daneben auch Methoden beschrieben worden, eine relative Affinität einer IgE-Bindung innerhalb eines Assays zu bestimmen [121]. So wird bei Poetz et al. vorgeschlagen, neben der Antigenprobe Antikörper mit Spezifität gegen das Fab-Fragment des die Antigenprobe nachweisenden Antikörpers auf die Microarrayslides zu drucken. Beide Bindungen können dann mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Die Signalintensitäten an den beiden Spots können zur Berechnung der relativen Affinität der Antikörperbindung an der Antigenprobe verwendet werden. Dies ist allerdings ein Vorgehen, das methodisch für uns nicht in Frage kommt, da wir sehr viele Peptide gleichzeitig screenen wollen.

Die klinische Bedeutung der mit den Inhibitionsversuchen gezeigten Kreuzreaktivität ist aus den Versuchen nicht abzuleiten. In der höchsten Konzentration von inhibierendem Peptid bestand ein berechnetes Verhältnis von IgE-Antikörper zu

inhibierendem Peptid von etwa 1:10000, in der niedrigsten von etwa 1:1. Wie viel Protein nötig ist, um klinisch bedeutsam zu sein, ist nur in funktionellen Tests möglich. Auf diese Weise wurde auch die Relevanz der Erdnussallergene Ara h 1, 2 und 3 untersucht [69, 122]. Die Schwellenwerte für klinische Reaktion auf Erdnuss liegen zum Teil im Bereich einiger Milligramm [29, 30]. Es könnte also sein, dass auch um mehrere Zehnerpotenzen höhere benötigte Dosen für eine Baumnuss noch eine klinische Rolle spielen, da dies noch in einem realistischen Bereich für aufgenommene Mengen beim Verzehr der Nahrungsmittel liegt.

Allerdings zeigt der Vergleich der Inhibition in den zwei Poolseren mit unterschiedlicher klinischer Reaktivität gegen Walnuss, dass für keins der untersuchten Peptide nur Kreuzreaktivität im walnussallergischen Poolserum bestand. Wenn aber walnussallergische und walnusstolerante gleichermaßen Antikörper haben, die mit linearen Peptiden der Walnuss kreuzreagieren, deutet dies darauf hin, dass diese Antikörper keine funktionelle Bedeutung haben. Zusammen mit der Beobachtung, dass im einfachen Immunlabeling wenig IgE-Bindung an den Baumnussequenzen vorkommt, ist es unwahrscheinlich, dass die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen für die klinisch zu beobachtenden Co-Allergien verantwortlich sind.

Basische Untereinheit von Ara h 3

Das allergene Potential der basischen Untereinheit von Ara h 3 wurde erst kürzlich entdeckt, ohne dass hier bisher lineare Epitope beschrieben sind [73]. Ara h 3.024 mit der Sequenz VIDNLPEEVVANSYG ist ein vorher nicht beschriebenes lineares Epitop auf der basischen Untereinheit von Ara h 3. Seine Spezifität und mögliche Bedeutung für klinische Kreuzreaktivität zwischen Erdnuss und Walnuss konnte durch Inhibition mit der korrespondierenden Walnussequenz gezeigt werden. Diese Jug r 4 Sequenz besitzt im Vergleich zum Ara h 3 Peptid 46,7% identische Aminosäuren, also eine hohe Homologie. Die fett markierten Aminosäuren auf dem Epitop von Ara h 3.024 sind identisch mit denen an der jeweiligen Position des korrespondierenden Walnusspeptids. Abbildung 78 zeigt die Inhibition der IgE-Bindung an Ara h 3.024 durch Präinkubation mit Jug r 4.024. Es kann durch Jug r 4.024 keine vollständige Inhibition der IgE-Bindung an Ara h 3.024 erreicht werden, wenn die auch bei hohen Konzentrationen von Jug r 4.024 die Fluoreszenz am Ara h 3 Peptid abnimmt. Die Affinität ist aber wesentlich geringer.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Erdnussallergie ist eine häufige, potentiell lebensbedrohliche Erkrankung. Erdnussallergische Patienten reagieren häufig auch auf Baumnüsse und Samen wie die Walnuss, Haselnuss und Sesam. Die Allergene von Erdnuss und diesen Baumnüssen und Samen haben eine hohe Aminosäurehomologie. Es ist jedoch unbekannt, ob diese Ähnlichkeit auch für die Co-Reaktivität verantwortlich ist. Wir haben daher die Häufigkeit der Walnuss-, Haselnuss- und Sesamallergie bei Erdnussallergikern und die Bindung von spezifischen IgE-Antikörpern an Sequenzepitopen von Erdnuss und Walnuss, Haselnuss und Sesam bei erdnussallergischen Patienten mit oder ohne Walnuss-/Haselnuss-/Sesamallergie untersucht.

Methoden: Die Häufigkeit von Baumnuss- und Sesamallergien bei erdnussallergischen Patienten wurde mit Hilfe eines Fragebogens untersucht. Anschließend wurde die IgE-Bindung an den bekannten Sequenzepitopen der Erdnuss und der homologen Regionen der Walnuss bei 40 erdnussallergischen Patienten per Microarray gemessen. 19 dieser Patienten hatten eine klinisch relevante Walnussallergie, und 21 waren walnusstolerant. Mit der gleichen Vorgehensweise wurden haselnusstolerante und haselnussallergische sowie sesamtolerante und sesamallergische Erdnussallergiker untersucht. Zur Frage nach kreuzreagierenden peptidspezifischen Antikörpern wurden Inhibitionsversuche durchgeführt.

Ergebnisse:

Von 287 Fragebögen wurden 110 beantwortet (38,5%), und die klinischen Angaben zu Nussallergien von Kindern (<1-19Jahre) ausgewertet. 46 Patienten hatten Reaktionen auf Erdnuss. Bei 18 der 46 erdnussallergischen Patienten (39,1%) wurden Atemschwierigkeiten und zum Teil pfeifende Atmung als Symptome der Reaktion angegeben.

Von den erdnussallergischen Patienten berichteten 14 (30,4%) auch von Reaktionen auf mindestens eine Baumnuss/ Samen. 8,7% (4 Patienten) berichteten von Reaktionen auf mehr als eine Baumnuss. 4/46 Patienten (9%) hatten neben Reaktionen auf Erdnüsse auch Reaktionen auf Walnüsse gehabt, 10/46 (22%) Reaktionen auf Haselnüsse und 2/43 (4%) Reaktionen auf Sesam. 16 der 46 Eltern der erdnussallergischen Kinder (34,8%) gaben an, ihr Kind habe entweder aus Angst

vor einer Reaktion oder, weil es ihnen geraten worden sei, Haselnüsse, Walnüsse oder Sesam vermieden und somit noch nie probiert.

Im Peptidmicroarray ließen sich keine Unterschiede beim Erkennen von Sequenzepitopen zwischen walnuss-/haselnuss-/sesamallergischen und walnuss-/haselnuss-/sesamtoleranten Patienten finden. In den zu den Sequenzepitopen der Erdnuss homologen Regionen von Walnuss/Haselnuss/Sesam fand sich nur wenig IgE-Bindung. Die Inhibitionsversuche zeigten, dass Präinkubation der Seren mit linearen Peptiden von Walnuss und Sesam zu wesentlich geringerer Abnahme der IgE-Bindung an korrespondierenden Erdnusspeptiden führte als Inhibition mit den entsprechenden Erdnusspeptiden.

Schlussfolgerung:

Erdnussallergiker reagieren häufig auch gegen Baumnüsse und Sesam. Die vorliegenden Ergebnisse geben aber keinen Hinweis darauf, dass die Co-Allergie gegen Erdnuss und Walnuss/Haselnuss/Sesam durch kreuzreagierende Antikörper gegen homologe Sequenzepitope von Erdnuss und Baumnüssen/Sesam hervorgerufen werden.

7 Literaturangaben

1. Sampson, H.A., *Update on food allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(5): p. 805-19; quiz 820.
2. Bock, S.A., A. Munoz-Furlong, and H.A. Sampson, *Fatalities due to anaphylactic reactions to foods*. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(1): p. 191-3.
3. Wood, R.A., *The natural history of food allergy*. Pediatrics, 2003. 111(6 Pt 3): p. 1631-7.
4. Ewan, P.W., *Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations*. BMJ, 1996. 312(7038): p. 1074-8.
5. Johansson, S.G., T. Bieber, R. Dahl, et al., *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(5): p. 832-6.
6. Johansson, S.G., J.O. Hourihane, J. Bousquet, et al., *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force*. Allergy, 2001. 56(9): p. 813-24.
7. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Peanut and tree nut allergy*. Curr Opin Pediatr, 2000. 12(6): p. 567-73.
8. Sampson, H.A., *9. Food allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(2 Suppl): p. S540-7.
9. Roehr, C.C., G. Edenharter, S. Reimann, et al., *Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents*. Clin Exp Allergy, 2004. 34(10): p. 1534-41.
10. Hourihane, J.O., *Prevalence and severity of food allergy--need for control*. Allergy, 1998. 53(46 Suppl): p. 84-8.
11. Young, E., M.D. Stoneham, A. Petruckevitch, J. Barton, and R. Rona, *A population study of food intolerance*. Lancet, 1994. 343(8906): p. 1127-30.
12. Jansen, J.J., A.F. Kardinaal, G. Huijbers, et al., *Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population*. J Allergy Clin Immunol, 1994. 93(2): p. 446-56.
13. Zuberbier, T., G. Edenharter, M. Worm, et al., *Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study*. Allergy, 2004. 59(3): p. 338-45.
14. Tariq, S.M., M. Stevens, S. Matthews, et al., *Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years*. BMJ, 1996. 313(7056): p. 514-7.
15. Grundy, J., S. Matthews, B. Bateman, T. Dean, and S.H. Arshad, *Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts*. J Allergy Clin Immunol, 2002. 110(5): p. 784-9.

16. Sicherer, S.H., A. Munoz-Furlong, and H.A. Sampson, *Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(6): p. 1203-7.
17. Dalal, I., I. Binson, R. Reifen, et al., *Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel*. Allergy, 2002. 57(4): p. 362-5.
18. Du Toit, G., Y. Katz, P. Sasieni, et al., *Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2008. 122(5): p. 984-91.
19. Ortolani, C., B.K. Ballmer-Weber, K.S. Hansen, et al., *Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(3): p. 577-81.
20. Flinterman, A.E., J.H. Akkerdaas, A.C. Knulst, R. van Ree, and S.G. Pasmans, *Hazelnut allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. 8(3): p. 261-5.
21. Schocker, F., D. Luttkopf, U. Muller, et al., *IgE binding to unique hazelnut allergens: identification of non pollen-related and heat-stable hazelnut allergens eliciting severe allergic reactions*. Eur J Nutr, 2000. 39(4): p. 172-80.
22. Eggesbo, M., R. Halvorsen, K. Tambs, and G. Botten, *Prevalence of parentally perceived adverse reactions to food in young children*. Pediatr Allergy Immunol, 1999. 10(2): p. 122-32.
23. Cohen, A., M. Goldberg, B. Levy, M. Leshno, and Y. Katz, *Sesame food allergy and sensitization in children: the natural history and long-term follow-up*. Pediatr Allergy Immunol, 2007. 18(3): p. 217-23.
24. Fleischer, D.M., M.K. Conover-Walker, L. Christie, A.W. Burks, and R.A. Wood, *The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(1): p. 183-9.
25. Busse, P.J., A.H. Nowak-Wegrzyn, S.A. Noone, H.A. Sampson, and S.H. Sicherer, *Recurrent peanut allergy*. N Engl J Med, 2002. 347(19): p. 1535-6.
26. Fleischer, D.M., M.K. Conover-Walker, L. Christie, A.W. Burks, and R.A. Wood, *Peanut allergy: recurrence and its management*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 114(5): p. 1195-201.
27. Sicherer, S.H., A.W. Burks, and H.A. Sampson, *Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children*. Pediatrics, 1998. 102(1): p. e6.
28. Sicherer, S.H., *Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood*. Pediatrics, 2003. 111(6 Pt 3): p. 1609-16.
29. Moneret-Vautrin, D.A. and G. Kanny, *Update on threshold doses of food allergens: implications for patients and the food industry*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. 4(3): p. 215-9.

30. Morisset, M., D.A. Moneret-Vautrin, G. Kanny, et al., *Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(8): p. 1046-51.
31. Wensing, M., A.H. Penninks, S.L. Hefle, et al., *The range of minimum provoking doses in hazelnut-allergic patients as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges*. Clin Exp Allergy, 2002. 32(12): p. 1757-62.
32. Hourihane, J.O., T.P. Dean, and J.O. Warner, *Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges*. BMJ, 1996. 313(7056): p. 518-21.
33. Avery, N.J., R.M. King, S. Knight, and J.O. Hourihane, *Assessment of quality of life in children with peanut allergy*. Pediatr Allergy Immunol, 2003. 14(5): p. 378-82.
34. Primeau, M.N., R. Kagan, L. Joseph, et al., *The psychological burden of peanut allergy as perceived by adults with peanut allergy and the parents of peanut-allergic children*. Clin Exp Allergy, 2000. 30(8): p. 1135-43.
35. Eigenmann, P.A., J.C. Caubet, and S.A. Zamora, *Continuing food-avoidance diets after negative food challenges*. Pediatr Allergy Immunol, 2006. 17(8): p. 601-5.
36. Roberts, G. and G. Lack, *Diagnosing peanut allergy with skin prick and specific IgE testing*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115(6): p. 1291-6.
37. Clark, A.T. and P.W. Ewan, *Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(8): p. 1041-5.
38. Sampson, H.A., *Improving in-vitro tests for the diagnosis of food hypersensitivity*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2002. 2(3): p. 257-61.
39. Sampson, H.A. and D.G. Ho, *Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents*. J Allergy Clin Immunol, 1997. 100(4): p. 444-51.
40. Sampson, H.A., *Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(5): p. 891-6.
41. Akkerdaas, J.H., M. Wensing, A.C. Knulst, et al., *How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents?* Int Arch Allergy Immunol, 2003. 132(2): p. 132-40.
42. Hefle, S.L., R.M. Helm, A.W. Burks, and R.K. Bush, *Comparison of commercial peanut skin test extracts*. J Allergy Clin Immunol, 1995. 95(4): p. 837-42.
43. Mehl, A., C. Rolinck-Werninghaus, U. Staden, et al., *The atopy patch test in the diagnostic workup of suspected food-related symptoms in children*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118(4): p. 923-9.
44. Sampson, H.A., *Food allergy. Part 2: diagnosis and management*. J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(6): p. 981-9.

45. Teuber, S.S. and K. Beyer, *IgG to foods: a test not ready for prime time*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007. 7(3): p. 257-8.
46. Stanley, J.S., N. King, A.W. Burks, et al., *Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2*. *Arch Biochem Biophys*, 1997. 342(2): p. 244-53.
47. Burks, A.W., L.W. Williams, R.M. Helm, et al., *Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges*. *J Allergy Clin Immunol*, 1991. 88(2): p. 172-9.
48. Rabjohn, P., E.M. Helm, J.S. Stanley, et al., *Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3*. *J Clin Invest*, 1999. 103(4): p. 535-42.
49. Roux, K.H., S.S. Teuber, and S.K. Sathe, *Tree nut allergens*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. 131(4): p. 234-44.
50. Schocker, F., D. Luttkopf, S. Scheurer, et al., *Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(1): p. 141-7.
51. Wallowitz, M., W.R. Peterson, S. Uratsu, et al., *Jug r 4, a legumin group food allergen from walnut (*Juglans regia* Cv. Chandler)*. *J Agric Food Chem*, 2006. 54(21): p. 8369-75.
52. Beyer, K., G. Grishina, L. Bardina, A. Grishin, and H.A. Sampson, *Identification of an IIS globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(3): p. 517-23.
53. Beyer, K., G. Grishina, L. Bardina, and H.A. Sampson, *Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(6): p. 1554-6.
54. Beyer, K., L. Bardina, G. Grishina, and H.A. Sampson, *Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(1): p. 154-9.
55. Astwood, J.D., A. Silvanovich, and G.A. Bannon, *Vicilins: a case study in allergen pedigrees*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(1): p. 26-7.
56. Astwood, J.D., J.N. Leach, and R.L. Fuchs, *Stability of food allergens to digestion in vitro*. *Nat Biotechnol*, 1996. 14(10): p. 1269-73.
57. Bufe, A., *Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 107(2): p. 219-21.
58. Beyer, K., *Characterization of allergenic food proteins for improved diagnostic methods*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2003. 3(3): p. 189-97.
59. Burks, A.W., D. Shin, G. Cockrell, et al., *Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity*. *Eur J Biochem*, 1997. 245(2): p. 334-9.

60. Shreffler, W.G., K. Beyer, T.H. Chu, A.W. Burks, and H.A. Sampson, *Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(4): p. 776-82.
61. Beyer, K., L. Ellman-Grunther, K.M. Jarvinen, et al., *Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(1): p. 202-7.
62. Jarvinen, K.M., K. Beyer, L. Vila, et al., *B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2002. 110(2): p. 293-7.
63. Chatchatee, P., K.M. Jarvinen, L. Bardina, K. Beyer, and H.A. Sampson, *Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(2): p. 379-83.
64. Chatchatee, P., K.M. Jarvinen, L. Bardina, et al., *Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients*. Clin Exp Allergy, 2001. 31(8): p. 1256-62.
65. Vila, L., K. Beyer, K.M. Jarvinen, et al., *Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy*. Clin Exp Allergy, 2001. 31(10): p. 1599-606.
66. Burks, A.W., G. Cockrell, J.S. Stanley, R.M. Helm, and G.A. Bannon, *Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity*. J Clin Invest, 1995. 96(4): p. 1715-21.
67. Pons, L., C. Chery, A. Romano, et al., *The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts*. Allergy, 2002. 57 Suppl 72: p. 88-93.
68. Mittag, D., J. Akkerdaas, B.K. Ballmer-Weber, et al., *Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 114(6): p. 1410-7.
69. Palmer, G.W., D.A. Dibern, Jr., A.W. Burks, et al., *Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity*. Clin Immunol, 2005. 115(3): p. 302-12.
70. Kleber-Janke, T., R. Cramer, U. Appenzeller, M. Schlaak, and W.M. Becker, *Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. 119(4): p. 265-74.
71. Burks, A.W., L.W. Williams, C. Connaughton, et al., *Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge*. J Allergy Clin Immunol, 1992. 90(6 Pt 1): p. 962-9.
72. Flinterman, A.E., E. van Hoffen, C.F. den Hartog Jager, et al., *Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time*. Clin Exp Allergy, 2007. 37(8): p. 1221-8.

73. Restani, P., C. Ballabio, E. Corsini, et al., *Identification of the basic subunit of Ara h 3 as the major allergen in a group of children allergic to peanuts*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2005. 94(2): p. 262-6.
74. Sen, M., R. Kopper, L. Pons, et al., *Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes*. *J Immunol*, 2002. 169(2): p. 882-7.
75. Teuber, S.S., A.M. Dandekar, W.R. Peterson, and C.L. Sellers, *Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen*. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. 101(6 Pt 1): p. 807-14.
76. Robotham, J.M., S.S. Teuber, S.K. Sathe, and K.H. Roux, *Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen, Jug r 1*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 109(1): p. 143-9.
77. Teuber, S.S., K.C. Jarvis, A.M. Dandekar, W.R. Peterson, and A.A. Ansari, *Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, jug r 2, from english walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 104(6): p. 1311-20.
78. Pastorello, E.A., L. Farioli, V. Pravettoni, et al., *Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 114(4): p. 908-14.
79. Hirschwehr, R., R. Valenta, C. Ebner, et al., *Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen*. *J Allergy Clin Immunol*, 1992. 90(6 Pt 1): p. 927-36.
80. Luttkopf, D., U. Muller, P.S. Skov, et al., *Comparison of four variants of a major allergen in hazelnut (*Corylus avellana*) Cor a 1.04 with the major hazel pollen allergen Cor a 1.01*. *Mol Immunol*, 2002. 38(7): p. 515-25.
81. Lauer, I., K. Foetisch, D. Kolarich, et al., *Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity*. *Biochem J*, 2004. 383(Pt 2): p. 327-34.
82. Wolff, N., U. Cogan, A. Admon, et al., *Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor*. *Food Chem Toxicol*, 2003. 41(8): p. 1165-74.
83. Hara-Hishimura, I., Y. Takeuchi, K. Inoue, and M. Nishimura, *Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin*. *Plant J*, 1993. 4(5): p. 793-800.
84. Wolff, N., S. Yannai, N. Karin, et al., *Identification and characterization of linear B-cell epitopes of beta-globulin, a major allergen of sesame seeds*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 114(5): p. 1151-8.
85. Pastorello, E.A., E. Varin, L. Farioli, et al., *The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. 756(1-2): p. 85-93.

86. Leduc, V., D.A. Moneret-Vautrin, J.T. Tzen, et al., *Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients*. *Allergy*, 2006. 61(3): p. 349-56.
87. Aalberse, R.C., J. Akkerdaas, and R. van Ree, *Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens*. *Allergy*, 2001. 56(6): p. 478-90.
88. van Ree, R., *Clinical importance of cross-reactivity in food allergy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004. 4(3): p. 235-40.
89. de Leon, M.P., I.N. Glaspole, A.C. Drew, et al., *Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts*. *Clin Exp Allergy*, 2003. 33(9): p. 1273-80.
90. Asero, R., G. Mistrello, D. Roncarolo, and S. Amato, *Walnut-induced anaphylaxis with cross-reactivity to hazelnut and Brazil nut*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(2): p. 358-60.
91. Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis, and P.O. Brown, *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. *Science*, 1995. 270(5235): p. 467-70.
92. MacBeath, G. and S.L. Schreiber, *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination*. *Science*, 2000. 289(5485): p. 1760-3.
93. Robinson, W.H., C. DiGennaro, W. Hueber, et al., *Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses*. *Nat Med*, 2002. 8(3): p. 295-301.
94. Hiller, R., S. Laffer, C. Harwanegg, et al., *Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment*. *FASEB J*, 2002. 16(3): p. 414-6.
95. Harwanegg, C., S. Laffer, R. Hiller, et al., *Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy*. *Clin Exp Allergy*, 2003. 33(1): p. 7-13.
96. Jarvinen, K.M., P. Chatchatee, L. Bardina, K. Beyer, and H.A. Sampson, *IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001. 126(2): p. 111-8.
97. Shreffler, W.G., D.A. Lencer, L. Bardina, and H.A. Sampson, *IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 116(4): p. 893-9.
98. Sicherer, S.H., T.J. Furlong, A. Munoz-Furlong, A.W. Burks, and H.A. Sampson, *A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 108(1): p. 128-32.
99. Flinterman, A.E., M.O. Hoekstra, Y. Meijer, et al., *Clinical reactivity to hazelnut in children: association with sensitization to birch pollen or nuts?* *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(5): p. 1186-9.
100. Sporik, R. and D. Hill, *Allergy to peanut, nuts, and sesame seed in Australian children*. *BMJ*, 1996. 313(7070): p. 1477-8.

101. Derby, C.J., M.H. Gowland, and J.O. Hourihane, *Sesame allergy in Britain: a questionnaire survey of members of the Anaphylaxis Campaign*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2005. 16(2): p. 171-5.
102. Eckel-Passow, J.E., A. Hoering, T.M. Therneau, and I. Ghobrial, *Experimental design and analysis of antibody microarrays: applying methods from cDNA arrays*. *Cancer Res*, 2005. 65(8): p. 2985-9.
103. Deinhofer, K., H. Sevcik, N. Balic, et al., *Microarrayed allergens for IgE profiling*. *Methods*, 2004. 32(3): p. 249-54.
104. Barry, R. and M. Soloviev, *Quantitative protein profiling using antibody arrays*. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 3717-26.
105. Beyer, K., K.M. Jarvinen, L. Bardina, et al., *IgE-binding peptides coupled to a commercial matrix as a diagnostic instrument for persistent cow's milk allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 116(3): p. 704-5.
106. Breiteneder, H. and E.N. Mills, *Molecular properties of food allergens*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(1): p. 14-23; quiz 24.
107. Maleki, S.J., R.A. Kopper, D.S. Shin, et al., *Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation*. *J Immunol*, 2000. 164(11): p. 5844-9.
108. Maleki, S.J., O. Viquez, T. Jacks, et al., *The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(1): p. 190-5.
109. van der Veen, M.J., R. van Ree, R.C. Aalberse, et al., *Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins*. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. 100(3): p. 327-34.
110. Goetz, D.W., B.A. Whisman, and A.D. Goetz, *Cross-reactivity among edible nuts: double immunodiffusion, crossed immunoelectrophoresis, and human specific igE serologic surveys*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2005. 95(1): p. 45-52.
111. Poltronieri, P., M.S. Cappello, N. Dohmae, et al., *Identification and characterisation of the IgE-binding proteins 2S albumin and conglutin gamma in almond (Prunus dulcis) seeds*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002. 128(2): p. 97-104.
112. Sutherland, M.F., R.E. O'Hehir, D. Czarny, and C. Suphioglu, *Macadamia nut anaphylaxis: demonstration of specific IgE reactivity and partial cross-reactivity with hazelnut*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 104(4 Pt 1): p. 889-90.
113. Vocks, E., A. Borga, C. Szliska, et al., *Common allergenic structures in hazelnut, rye grain, sesame seeds, kiwi, and poppy seeds*. *Allergy*, 1993. 48(3): p. 168-72.
114. de Leon, M.P., A.C. Drew, I.N. Glaspole, et al., *IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens*. *Mol Immunol*, 2007. 44(4): p. 463-71.

115. Barre, A., J.P. Borges, R. Culerrier, and P. Rouge, *Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes*. Immunol Lett, 2005. 100(2): p. 153-8.
116. Barre, A., G. Jacquet, C. Sordet, R. Culerrier, and P. Rouge, *Homology modelling and conformational analysis of IgE-binding epitopes of Ara h 3 and other legumin allergens with a cupin fold from tree nuts*. Mol Immunol, 2007. 44(12): p. 3243-55.
117. Barre, A., C. Sordet, R. Culerrier, et al., *Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes*. Mol Immunol, 2008. 45(5): p. 1231-40.
118. Aalberse, R.C., I. Kleine Budde, S.O. Stapel, and R. van Ree, *Structural aspects of cross-reactivity and its relation to antibody affinity*. Allergy, 2001. 56 Suppl 67: p. 27-9.
119. de Leon, M.P., A.C. Drew, I.N. Glaspole, et al., *Functional analysis of cross-reactive immunoglobulin E antibodies: peanut-specific immunoglobulin E sensitizes basophils to tree nut allergens*. Clin Exp Allergy, 2005. 35(8): p. 1056-64.
120. Rabjohn, P., C.M. West, C. Connaughton, et al., *Modification of peanut allergen Ara h 3: effects on IgE binding and T cell stimulation*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. 128(1): p. 15-23.
121. Poetz, O., R. Ostendorp, B. Brocks, et al., *Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip*. Proteomics, 2005. 5(9): p. 2402-11.
122. Koppelman, S.J., M. Wensing, M. Ertmann, A.C. Knulst, and E.F. Knol, *Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen*. Clin Exp Allergy, 2004. 34(4): p. 583-90.

Erklärung

„Ich, Leonard Rosenfeld, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Baumnuss- und Sesamallergie bei Erdnussallergikern – Häufigkeit und die Bedeutung von homologen Sequenzepitopen in der klinischen Reaktivität“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

25.02.2009

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.