

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifizierung von Nahrungsmittelallergikern
(Sellerie und Haselnuss)
und Etablierung neuer Biomarker

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elvira Ruppel

aus Semipalatinsk

Datum der Promotion: 25.06.2017

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abstrakt	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 Nahrungsmittelallergie	1
1.1.1 Prävalenz der Nahrungsmittelallergie	1
1.1.2 Klassifizierung von Nahrungsmittelallergenen	1
1.2. Molekulare Grundlagen der Kreuzreaktivität	2
1.2.1 Allgemeine Grundlagen	2
1.2.2 Strukturelle Eigenschaften von Kreuzallergenen	6
1.3 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie	7
1.3.1 Haselnussallergie	7
1.3.2 Sellerieallergie	7
1.3.3 Diagnostisches Vorgehen bei pollenassoziiierter Nahrungsmittelallergie	8
1.4 SPOT-Synthese und ihre Möglichkeiten in der Allergiediagnostik	9
2 Zielsetzung	12
3 Material und Methoden	14
3.1 Identifizierung von Nahrungsmittelallergikern	14
3.1.1 Rekrutierung der Probanden	14
3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	15
3.1.3 Hauttest	15
3.1.4 Bestimmung des Gesamt- und spezifischen Serum-Immunglobulins E	16
3.1.5 Doppelblinde placebokontrollierte orale Nahrungsmittelprovokation	16
3.1.6 Symptomenscore	17
3.2 Herstellung von Sellerieextrakten	19
3.3 Herstellung von Peptidbibliotheken mittels SPOT-Synthese	20
3.3.1 Durchführung der SPOT-Synthese	20
3.3.2 Herstellung und Funktionalisierung von Membranen	24
3.4 Analyse der SPOT-synthetisierten Peptide	27
3.4.1 Abspaltung der Peptide	27
3.4.2 Massenspektrometrie	28
3.4.3 HPLC	28
3.5 Optimierung des Inkubationsprotokolls	29
3.6 Messung der Signalintensitäten	31

3.7 Statistische Auswertung.....	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Identifizierung von Haselnuss und Sellerieallergikern.....	32
4.1.1 Häufigkeit von Pollensensibilisierungen bei Sellerie- und Haselnussallergikern.....	32
4.1.2 Spezifisches IgE auf Sellerie und Haselnuss.....	36
4.1.3 DBPCFC und Symptomenscore.....	37
4.2 Charakterisierung von Sortenart und Anbaubedingungen von Knollensellerie.....	43
4.2.1 Hauttest – Ergebnisse mit verschiedenen Selleriesorten.....	43
4.2.2 Hauttest – Ergebnisse bei verschiedenen Anbaubedingungen von Sellerie.....	44
4.2.3 DBPCFC mit ausgewählten Selleriesorten.....	46
4.2.4 SPT mit Extrakten der Selleriesorten Anita und Prinz.....	49
4.3 SPOT-Synthese und Optimierung des Protokolls.....	50
4.3.1 Membrantyp.....	50
4.3.2 Einfluss der Membranbeladung (Peptiddichte).....	52
4.3.3 Qualität der hergestellten Peptide.....	53
4.3.4 Einfluss der Peptidlänge (Sequenzfenster).....	56
4.3.5 Einfluss der verwendeten Antikörper und des Detektions- und Visualisierungssystems.....	57
4.3.6 Einfluss der Blockierungsreagenzien.....	60
4.3.7 Einfluss der Inkubationsparameter.....	61
4.4 Inkubationsanalysen.....	62
5 Diskussion	79
5.1 Sensibilisierungsprofile bei Sellerie- und Haselnussallergikern.....	79
5.2 Korrelation des Prick-Testes und des spezifischen IgE mit der klinischen Symptomatik.....	80
5.3 Einfluss von Geschlecht und dem atopischen Profil auf die klinische Symptomatik bei Sellerie- und Haselnussallergikern.....	81
5.4 Bedeutung verschiedener Sorten und Anbaubedingungen bei Sellerieallergie.....	82
5.4.1 Einfluss der Sortenart und Anbaubedingungen im SPT.....	83
5.4.2 Klinische Reaktionen auf die Sorten Anita und Prinz.....	84
5.5 Optimierung des SPOT-Synthese-Protokolls.....	86
5.6 Immunologische Charakterisierung putativer Epitope.....	92
6 Zusammenfassung	104
7 Literaturverzeichnis	107
8 Eidesstattliche Versicherung	118
9 Lebenslauf	119
10 Publikationsliste	120
11 Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Asthma
AD	Atopische Dermatitis
Api g	<i>Apium graveolens</i> (Sellerie)
AR	Allergische Rhinitis
AS	Aminosäure(n)
AZ	Allgemeinzustand
BAT	Basophilenaktivierungstest
β-Ala	(βA) β-Alanin
BLU	Boehringer Light Units
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl-
BSA	Bovines Serumalbumin/Rinderalbumin
CCD	cross-reactive carbohydrate determinants, kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten
CD	Cluster of Differentiation
CD203c	Ektonukleotidpyrophosphatase/-phosphodiesterase (E-NPP), ein Oberflächenmarker der basophilen Granulozyten, der bei Stimulation hochreguliert wird
Cor a	<i>Corylus avellana</i> (Haselnuss)
CRD	component-resolved diagnostic
C-Terminus	Carboxyterminus (eines Proteins/Peptids)
DBPCFC	double-blind, placebo-controlled food challenge
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin
ESI-TOF	Electrospray Ionisation-Time of flight
FEV ¹	Einsekundenkapazität, forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-
h	hora (e) ≈ Stunde (n)
HN	Haselnuss

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	International Unit
kU	kilo Unit
Max	Maximum
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minimum
min	Minute
MSc	Medikamentenscore
µg	Mikrogramm
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht durchgeführt
NMI	N-Methylimidazol
NMP	N-Methylpyrrolidon
n. s.	nicht signifikant
N-Terminus	Aminoterminus (eines Proteins/Peptids)
OSc	objektiver Symptomenscore
OrBu	β- <i>tert.</i> -Butyl
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
Pfp	Pentafluorphenyl-
red.	reduziert
RP-HPLC	Reversed phase-high performance liquid chromatography
RR	Blutdruck (Riva-Rocci) in mmHg
RT	Raumtemperatur
SE	Sellerie
SI	Signalintensität
sIgE	spezifisches Immunglobulin E
SPT	Skin Prick test
SSc	subjektiver Symptomenscore
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)

<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl-
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisopropylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Triphenylmethyl-
üN	über Nacht
v/v	volume per volume
vs	versus
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstabencode bezeichnet.

Abstrakt

Nahrungsmittelallergien infolge immunologischer Kreuzreaktionen zu Inhalationsallergenen können zum Teil schwere allergische Reaktionen auslösen. Haselnuss und Sellerie sind in industriell hergestellten Nahrungsmitteln weit verbreitet und können bei Birkenpollensensibilisierten infolge der Kreuzreaktivität allergische Reaktionen auslösen. Die Reaktivität bei Hauttestungen oder das Ausmaß des spezifischen IgE korrelieren nur begrenzt mit der Schwere der klinischen Symptomatik. Zudem können positive Reaktionen gegenüber kreuzreaktiven Antikörpern ohne klinische Relevanz vorhanden sein und falsch interpretiert werden. Die therapeutischen Optionen der Nahrungsmittelallergie sind auf die symptomatische Behandlung begrenzt, sodass bis heute als Therapiestandard die Karenz gilt.

Die Identifizierung von Nahrungsmittel-Sorten mit reduziertem Allergenanteil könnte dazu beitragen, die Gefahr schwerer Reaktionen für betroffene Allergiker zu reduzieren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei Aspekten der Nahrungsmittelallergie: Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Sortenart und Anbaubedingungen von Knollensellerie auf die allergische Reaktion untersucht. Im zweiten Teil wurden die Seren von Haselnuss- und Sellerieallergikern sowie gesunden Probanden dazu verwendet, ein optimiertes SPOT-Synthese- und Inkubationsprotokoll zu erarbeiten, um IgE-bindende Epitope der Hauptallergene Cor a 1 und Api g 1 näher zu untersuchen und darüber hinaus IgE-bindende Peptide für die zukünftige Entwicklung eines kostengünstigen peptidbasierten diagnostischen Testsystems zu identifizieren. Sellerieallergiker wurden zunächst mittels Prick-zu-Prick-Test mit zehn verschiedenen Selleriesorten sowie zwei Sorten mit Trockenstress-Anbau untersucht. Die Sorte Anita löste die schwächste und die Sorten Rex und Prinz die stärksten Hautreaktionen aus. Unter Trockenstress angebaute Sorten zeigten keine signifikanten Unterschiede zu Sorten mit herkömmlichen Anbau. Auch in der doppel-blinden Placebo-kontrollierten Nahrungsmittelprovokation führte die Sorte Anita zu schwächeren Reaktionen. Die Unterschiede im Gesamtscore von Anita gegenüber Prinz waren hoch signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass die Sortenart unter Knollenselleriearten den Schweregrad der klinischen Reaktion beeinflusst.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein peptidbasierter sIgE-Assay entwickelt, der eine Detektion von IgE-Antikörpern an membrangebundene Peptide ermöglicht. IgE-bindende Peptide und Epitope der Api g 1 und Cor a 1 Sequenz wurden exemplarisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise für das Vorliegen mehrerer konformatorischer Epitope der Proteine Api g 1 und Cor a 1. Darüber hinaus wurden lineare Peptide identifiziert, die bei gegebener IgE-Reaktivität mit der klinischen Symptomatik korrelierten und darüber hinaus für Api g 1 und Cor a 1 spezifisch waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit Peptiden spezifische IgE-

Reaktivitäten nachzuweisen. Für die Entwicklung eines peptidbasierten diagnostischen Tests sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Spezifität und Sensitivität eines solchen Verfahrens zu bestimmen und es sollten weitere Allergene der Haselnuss und von Sellerie berücksichtigt werden.

Schlagworte: Nahrungsmittelallergie, IgE, Sellerie, Haselnuss, Sortenart, SPOT-Synthese, N-CAPE-Membran, Peptide, Epitope

Abstract

Food allergies resulting from immunological cross-reactivity with inhalant allergens may cause severe allergic reactions. Hazelnut and celery are widely distributed in industrially produced foods and can induce allergic reactions in birch-pollen sensitized individuals. The outcome of skin tests and allergen-specific IgE determinations are of limited value to predict the severity of clinical reactions. Moreover cross-reactive IgE antibodies without clinical relevance can lead to a false interpretation of skin and sIgE test results. The therapeutic options of food allergy are limited and avoidance of the allergen is still the mainstay of therapy. Identification of food cultivars with reduced allergen components may help to reduce the risk of severe allergic reactions.

The present thesis is focusing on two aspects of food allergy: In the first part, the influence of different celery cultivars and growing conditions on the allergic reaction was investigated. In the second part, sera from celery and hazelnut allergic patients and healthy controls were used to establish an optimized SPOT-synthesis and incubation protocol. This protocol was used for the investigation of IgE-binding epitopes of the major allergens Api g 1 and Cor a 1 and the identification of linear binding peptides.

First ten different celery cultivars and two cultivars of drought-cultivation were examined by prick-to-prick test in celery allergic patients. The cultivar Anita led to the weakest and the cultivars Prinz and Rex to the strongest skin reactions. There were no significant differences among cultivars with standard and drought-cultivation. Accordingly the cultivar Anita elicited mild clinical reactions in the double-blind placebo-controlled food challenge. The differences of the clinical scores between Anita and Prinz were highly significant. Thus the data from this study suggest that celery cultivars bear a different potential to elicit clinical reactions in celery allergic patients.

In the second part, a peptide-based sIgE assay, which enables detection of IgE antibodies to membrane-bound peptides, was developed. IgE binding peptides and epitopes of Api g 1 and Cor a 1 were investigated. The results provide strong indications for the presence of conformational epitopes within the proteins Api g 1 and Cor a 1. Moreover, Api g 1 and Cor a 1 specific peptides which display a correlation to clinical symptoms have been identified. For the development of a peptide-based diagnostic test further investigations are necessary. These should consider other allergens of celery and hazelnut and the sensitivity and specificity of the assay in a large number of patients.

Keywords: Food allergy, IgE, celery, hazelnut, cultivar, SPOT-synthesis, N-CAPE-membrane, peptide, epitope

1 Einleitung

1.1 Nahrungsmittelallergie

1.1.1 Prävalenz der Nahrungsmittelallergie

Die Lebenszeitprävalenz der selbst berichteten Nahrungsmittelallergie (NMA) in Europa schwankt von 0,1 bis zu 35 % [1, 2]. Nahrungsmittelallergien werden von Patienten häufig als Ursache verschiedener klinischer Symptome vermutet. Ein systematischer Review zu Prävalenzstudien der letzten Jahre in Europa hat ergeben, dass die Prävalenz vom Patient selbst berichteter NMA etwa sechsfach höher ist als die tatsächliche durch Exposition bestätigte NMA [3, 4]. Die häufigsten Nahrungsmittelallergene in Europa sind Kuhmilch (0,6 % durch einen Nahrungsmittel-Provokationstest bestätigte Prävalenz), Hühnerei (0,2 %), Weizen (0,1 %), Soja (0,3 %), Erdnuss (0,2 %), Baumnüsse (0,5 %), Fisch (0,1 %) und Schalentiere (0,1 %) [1]. Durch den stetigen Anstieg von Pollensensibilisierungen hat sich auch die Prävalenz der kreuzreaktiven Nahrungsmittelallergien erhöht [3, 5].

1.1.2 Klassifizierung von Nahrungsmittelallergenen

Die Nahrungsmittelallergene werden je nach Sensibilisierungsweg und ihrer physikochemischen Eigenschaften differenziert. Zu den Klasse-1-Nahrungsmittelallergenen zählen die hitze- und säurestabilen Allergene von Kuhmilch, Hühnerei, Erdnuss und Fisch, die vor allem im Kindesalter systemische Reaktionen oder eine Aggravierung eines atopischen Ekzems verursachen. Hier erfolgt die Sensibilisierung hauptsächlich über den Magen-Darm-Trakt. Klasse-2-Nahrungsmittelallergene sind zum großen Teil (wenige Ausnahmen) hitze- und säurelabil. Sie lösen vor allem im Erwachsenenalter Symptome aus, die meist mild sind (zum Teil können auch systemische Reaktionen auftreten) [6]. 60 % der Nahrungsmittelallergien im Erwachsenenalter werden durch eine primäre inhalative Sensibilisierung gegenüber Pollen vermittelt. Die strukturellen Ähnlichkeiten der Nahrungsmittelallergene mit bestimmten Pollenallergenen führen sekundär zu den Kreuzreaktionen [5].

1.2. Molekulare Grundlagen der Kreuzreaktivität

1.2.1 Allgemeine Grundlagen

IgE spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten. Dabei setzen die Erreger häufig Enzyme ein, um in den Wirt einzudringen. Es wird angenommen, dass Enzyme vor allem die T_H2-Reaktionen stimulieren. Diese These wird von der Tatsache gestützt, dass viele Allergene auch Enzyme sind (z. Bsp. Der p 1, Cysteinprotease der Hausstaubmilbe) [7]. Aber auch Enzyminhibitoren, Transport- und Speicherproteine, regulatorische Proteine und Stressproteine sind als Allergene beschrieben worden [8].

Innerhalb der pflanzlichen pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien spielen vier dominierende Proteinfamilien (Superfamilien) eine Rolle: 1. die

Prolamin-Superfamilie, 2. die Cupin-Superfamilie, 3. die Profilin und 4. die Bet v 1 Familie [9].

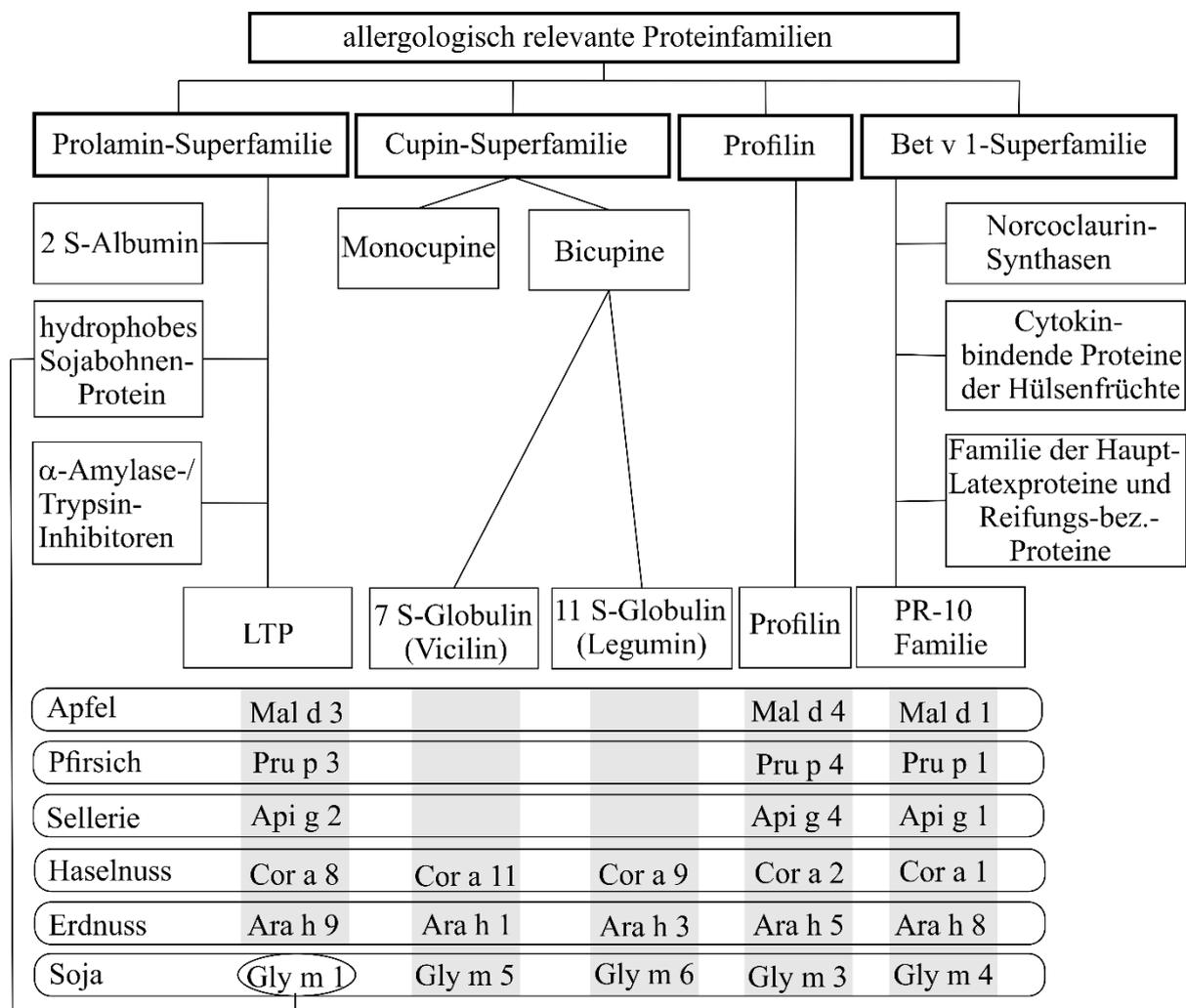


Abbildung 1: Allergologisch wichtige Proteinfamilien

Exemplarisch sind die Einzelallergene aus Apfel, Pfirsich, Sellerie, Haselnuss, Erdnuss und Soja entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den Proteinfamilien dargestellt. LTP – Lipid-Transfer-Proteine.

Allergene aus der Prolamin-Superfamilie sind hauptsächlich Speicherproteine der Samen und werden eingeteilt in 2S Albumin Speicherproteine, nichtspezifische Lipid-Transfer-Proteine (nsLTP), α -Amylase/Trypsin Inhibitoren und das hydrophobe Sojabohnen-Protein. Obwohl sich verschiedene Vertreter der Prolaminfamilie in der Aminosäuresequenz stark unterscheiden, besitzen sie alle sehr ähnliche α -helikale Strukturen [9].

Innerhalb der Cupin-Superfamilie werden die Allergene nach der Anzahl und Konformation der Cupine unterteilt. Monocupine sind hauptsächlich Enzyme (Dioxygenasen, Isomerasen) und konnten bereits in Archaeen („Urbakterien“) nachgewiesen werden. Bicupine werden in 7S-Globuline (Viciline) und 11S-Globuline (Legumine) unterteilt. Sie sind extrem thermostabil und hauptsächlich als Speicherproteine in Samen und Sporen zu finden (Samen/Saat, Hülsenfrüchte, Baumnüsse) [9].

Profiline sind als Panallergene in allen Eukaryoten vertreten und als kleine Aktin-bindende Proteine wesentlich am Zytoskelett beteiligt [10]. Allergene Profiline sind bisher nur in Pflanzen nachgewiesen worden [9] und als Kreuzallergene besonders zwischen pflanzlichen Nahrungsmitteln, Pollen und Latex relevant. Obwohl sich die Sequenzen teilweise deutlich unterscheiden, ist die dreidimensionale Struktur stark konserviert. Dadurch können IgE-Sensibilisierungen gegenüber kreuzreaktiven Profilin-Epitopen zu NMA gegenüber verschiedensten pflanzlichen Nahrungsmitteln führen [11].

Zur Bet v 1-Superfamilie gehören vier Familien: die PR-10 Familie, die Familie der Haupt-Latexproteine und reifungsbezogene Proteine (ripening-related proteins), Norcoclaurin-Synthasen und die Cytokinin-bindenden Proteine der Hülsenfrüchte.

Das Hauptallergen der Birke (Bet v 1, *Betula verrucosa*) zählt zur PR-10-Familie (pathogenesis-related proteins 10). Die Gene für die stressinduzierten Proteine der PR-10-Familie werden von vielen Pflanzen exprimiert. Die Produktion dieser Proteine kann in Pflanzen durch Infektionen mit verschiedenen Erregern, Verletzungen, Salzstress und pflanzliche Hormone gesteigert werden [9].

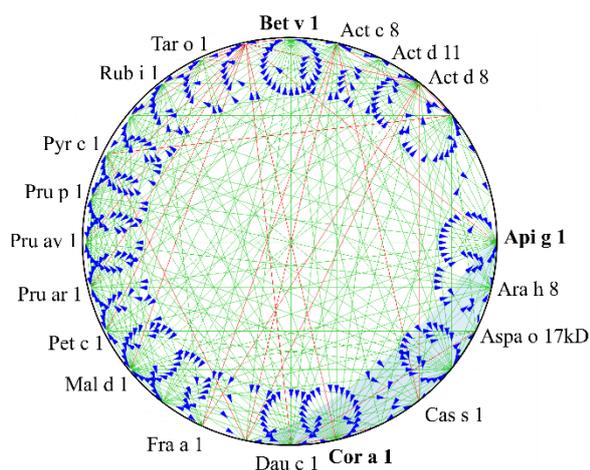
Wichtige Vertreter der Bet v 1-Familie sind Nüsse, Kern- und Steinobst sowie Soja, die eine hohe Sequenzähnlichkeit (40 – 70 %) mit dem Hauptallergen der Birke (Bet v 1) aufweisen. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Vertreter der Bet v 1-Familie aufgelistet. Abbildung 2 zeigt die Sequenzhomologien und Kreuzreaktivitäten der Bet v 1-Familie.

Tabelle 1: Wichtige birkenpollenassoziierte Nahrungsmittelallergene und ihre Sequenzidentität zu Bet v 1

Nahrungsmittel		Hauptallergen	Zugangsnummer	Sequenzidentität mit Bet v 1*
Haselnuss	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 1	Q08407	73%
Kastanie	<i>Castanea sativa</i>	Cas s 1	Q93YH9	68%
Aprikose	<i>Prunus armeniaca</i>	Pru ar 1	O50001	60%
Kirsche	<i>Prunus avium</i>	Pru av 1	Q24248	59%
Pfirsich	<i>Prunus persica</i>	Pru p 1	Q2I6V8	59%
Birne	<i>Pyrus communis</i>	Pyr c 1	Q65200	56%
Apfel	<i>Malus domestica</i>	Mal d 1	P43211	55%
			Q3T923	54%
Kiwi (gelb)	<i>Actinidia chinensis</i>	Act c 8	D1YSM4	49%
Kiwi (gelb)	<i>Actinidia chinensis</i>	Act d 8	D1YSM5	49%
Himbeere	<i>Rubus idaeus</i>	Rub i 1	Q0Z8U9	48%
Erdnuss	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 8	Q6VT83	46%
Sojabohne	<i>Glycine max</i>	Gly m 4	C6T1G1	46%
Mungobohne	<i>Vigna radiata</i>	Vig r 1	Q2VU97	43%
Wurzel-Petersilie	<i>Petroselinum crispum</i>	Pet c 1	P19417/P19418	41%
Sellerie	<i>Apium graveolens</i>	Api g 1	P49372	40%
Möhre	<i>Daucus carota</i>	Dau c 1	O04298	37%
Löwenzahn	<i>Taraxacum officinale</i>	Tar o 1	O49065	36%
Spargel	<i>Asparagus officinalis</i>	Aspa o 17kD	Q05736	33%
Erdbeere	<i>Fragaria ananassa</i>	Fra a 1	Q5ULZ4	32%
Kiwi (grün)	<i>Actinidia deliciosa</i>	Act d 11	P85524	17%

* Das Hauptallergen der Birke Bet v 1.0101 mit der Zugangsnummer P15494. Die Sequenzen, Zugangsnummern sowie die Berechnung der Sequenzidentität wurden über die Internetplattform www.allergome.org ermittelt.

Sequenzhomologie



Kreuzreaktivität

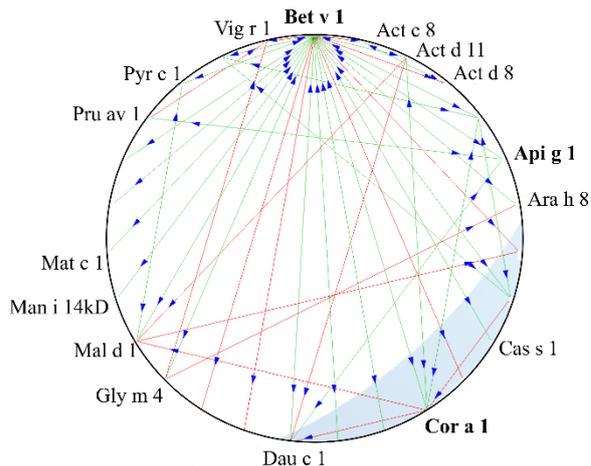


Abbildung 2: Sequenzhomologien ausgewählter Nahrungsmittelallergene zu Bet v 1 und beschriebene klinisch relevante Kreuzreaktivitäten

Modifizierte Allergome-O-Ringe (Datenset generiert über www.allergome.org am 30.06.2015) mit ausgewählten Vertretern der Bet v 1-Superfamilie. Dargestellt sind die immunologischen Beziehungen zum Hauptallergen der Birke Bet v 1.0101. Pfeilspitzen verdeutlichen die in der Literatur beschriebenen Beziehungen zwischen zwei Allergenen. Grüne Linien stellen Beziehungen in beide Richtungen dar. Bei roten Linien ist die Beziehung bisher nur in eine Richtung beschrieben worden. Fehlende Linien verdeutlichen entweder fehlende Beziehung oder fehlende Daten (Studien) zum Zeitpunkt der Datenabfrage über www.allergome.org.

Viele Pflanzen enthalten Glykoproteine, die N- oder O-Glykosylierungen aufweisen und als pflanzliche Allergene fungieren können [12]. Die α -1,3-gebundene Fucose und β -1,2-gebundene Xylose an N-Glycanen sind bei Pflanzen und Invertebraten weit verbreitet und zählen zu den klassischen kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CCD). Diese kommen vor allem auf Pollen, pflanzlichen Nahrungsmitteln, Gliedertieren, Mollusken und Helminthen vor.

Sensibilisierungswege auf klassische CCD sind durch Inhalation glycoproteinreicher Gräser- und Ambrosiapollen sowie durch Hymenopterenstiche beschrieben [13]. Anti-CCD-IgE-Antikörper können bei bis zu 29 % der Pollenallergiker gefunden werden [12], sind aber selten klinisch relevant [14, 15]. Ein neu beschriebenes CCD, das Galaktose- α -1,3-Galactose (α -Gal), kommt in allen Säugetieren (außer Primaten) und auch auf Immunglobulinen vor und spielt bei Allergien auf Säugetierfleisch und Therapieantikörper (Bsp. Cetuximab) eine wichtige Rolle [13].

Die Sensibilisierungsmuster gegenüber Obst und Gemüse sind regional unterschiedlich. In Mittel- und Nordeuropa sind Sensibilisierungen gegenüber der Birke (*Betula verrucosa*) führend und resultieren in einem hohen Anteil von kreuzreaktiven Nahrungsmittelallergien gegen

Allergene aus der Bet v 1-Familie. Hingegen sind im Mittelmeerraum die häufigsten pollenassoziierten NMA als primäre Allergien durch Lipid-Transfer-Proteine vermittelt [16].

1.2.2 Strukturelle Eigenschaften von Kreuzallergenen

Die Bindung von Pollenallergen-spezifischen IgE-Antikörpern an homologe Epitope auf pflanzlichen Nahrungsmitteln führt zur Aktivierung der Effektorzellen (Mastzellen, Basophile) und zur Auslösung der allergischen Reaktion. Dabei können die Epitope von Allergenen entweder kurze lineare Peptidsequenzen (lineare oder kontinuierliche Epitope) sein oder aufgrund ihrer Faltung entstehen (3-D-Faltung, diskontinuierliche oder konformatorische Epitope; Abbildung 3).

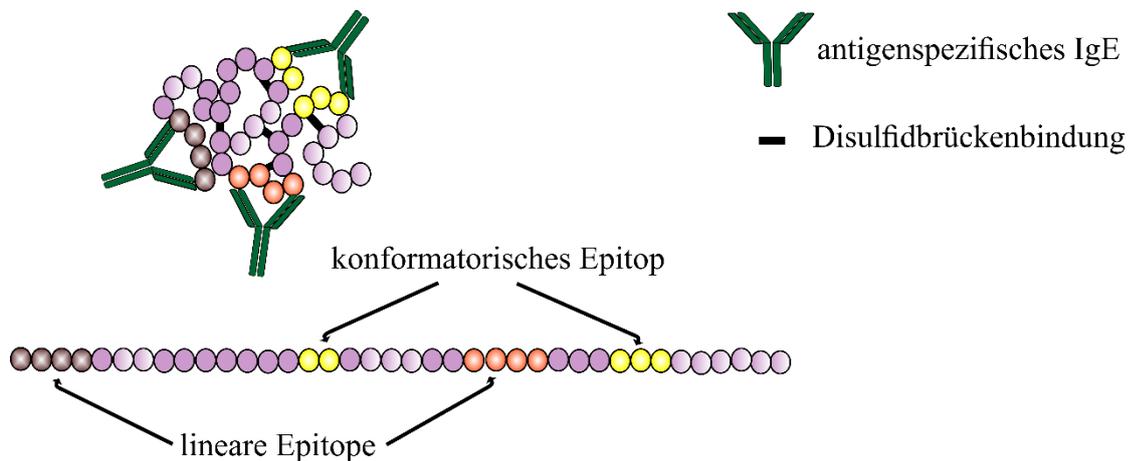


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Epitopen

Peptidkette mit einem konformatorischen und zwei linearen Epitopen. Die Stabilisierung der 3D-Struktur durch Disulfidbrückenbindungen ist durch schwarze Balken dargestellt.

Lineare Epitope sind säure- und thermostabil und häufig in Klasse-I-Nahrungsmittelallergenen zu finden (Bsp. Milch [17]). Konformatorische Epitope sind hauptsächlich in frischem Obst und Gemüse als pollenassoziierte kreuzreaktive Epitope (Klasse-II-Nahrungsmittelallergene) vorhanden. Sie verlieren beim Erhitzen durch die Änderung der dreidimensionalen Struktur an Allergenität [18-20].

In vielen Studien konnte inzwischen gezeigt werden, dass nicht die exakte Sequenzübereinstimmung, sondern vielmehr die Konformation der Epitope für die pollenassoziierten NMA ausschlaggebend ist [21-24]. Viele dieser Epitope sind in Allergenfamilien hoch konserviert [25] und haben biologische Funktionen, die für die Pflanzen entscheidend sind (metabolische, Schutz- und Speicherfunktionen).

Die genetische Modifikation pflanzlicher Nahrungsmittel kann Einfluss auf die Allergenität nehmen. Zum einen besitzen unterschiedliche Sorten häufig auch ein unterschiedliches allergenes Potential [26-29], zum anderen kann eine Herunterregulation von Genen, die für allergene Proteine kodieren, genutzt oder die DNA-Sequenz dahingehend mutiert werden, dass die IgE-Bindung abgeschwächt wird [30, 31].

1.3 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie

1.3.1 Haselnussallergie

In Europa ist die Haselnussallergie weit verbreitet. In der von 2005 bis 2010 durchgeführten EuroPrevall Multicenterstudie war Haselnuss (HN) die mit Abstand häufigste NMA (32 % aller Allergiker) [32]. Die Haselnussallergie (HNA) kann primär oder sekundär durch Kreuzreaktivität ausgelöst werden. Bisher sind verschiedene Allergene der Haselnuss (*Corylus avellana*) beschrieben worden: Cor a 1 (Hauptallergen, PR10, Bet v 1 Familie), Cor a 2 (Profilin), Cor a 8 (nsLTP), Cor a 9 (11S-Globulin, Legumin), Cor a 10 (Hitzeschockprotein), Cor a 11 (7S-Globulin, Vicilin), Cor a 12 (Oleosin), Cor a 13 (Oleosin), Cor a 14 (2S-Albumin) [33]. Bei birkenpollen-sensibilisierten Allergikern ist die allergische Reaktion auf die Haselnuss größtenteils durch die Kreuzreaktion von Cor a 1 und Bet v 1 vermittelt [34, 35]. Die Symptome reichen von milden mucokutanen Reaktionen, wie der Kontakturtikaria der Mundschleimhaut, über gastrointestinale Symptome bis zu schweren anaphylaktischen Reaktionen [32, 36, 37]. Die Haselnuss wird in der Nahrungsmittelindustrie in zahlreichen Produkten verarbeitet. Während der Verarbeitung verschiedener Produkte können Verunreinigungen von primär haselnussfreien Produkten (Schokolade) mit Haselnüssen auftreten. Die minimale Dosis zur Auslösung einer klinischen Reaktion lag in der EuroPrevall-Studie bei bereits 0,009 mg HN-Protein für subjektive und 8,5 mg für objektive Symptome [38]. Gemäß der aktuellen Gesetzgebung werden Haselnüsse ab 0,1 mg HN-Protein auf der Verpackung gekennzeichnet [39]. Durch den Verarbeitungsprozess (Rösten) wird das Cor a 1 zumeist zerstört, jedoch nicht das hitzestabile Lipid-Transfer-Protein Cor a 8, welches hauptsächlich für schwere Reaktionen in den mediterranen Ländern beschrieben wurde [32, 34].

1.3.2 Sellerieallergie

Die Sellerieallergie ist eine der häufigsten pollenassoziierten NMA in Europa. Abhängig von den bestehenden Ernährungsgewohnheiten schwankt ihre Prävalenz in den Ländern. In der Schweiz

waren etwa 40 % [40] und in Deutschland 70 % [19] der Patienten mit pollenassoziierter Nahrungsmittelallergie gegenüber Sellerie sensibilisiert.

Zu den bisher beschriebenen Allergenen des Sellerie zählen: Api g 1 (Hauptallergen, PR10, Bet v 1 Familie), Api g 2 (nsLTP), Api g 3 (Chlorophyll Ab-bindendes Protein), Api g 4 (Profilin), Api g 5 (Flavoprotein, FAD-enthaltende Oxidase) und Api g 6 (LTP) [33]. Pollenallergiker mit einer klinisch relevanten Sellerieallergie sind meist auf Birken- und/oder Beifußpollen sensibilisiert [40]. Es konnte 1995 gezeigt werden, dass Patienten mit einer Birkenpollenallergie in der Regel über das Api g 1 und Patienten mit einer Beifußpollenallergie bevorzugt über Profilin sensibilisiert sind [41]. Insbesondere Bet v 1 und Api g 1 besitzen gemeinsame nicht nur konformatorische kreuzreaktive IgE-bindende Epitope, sondern auch lineare kreuzreaktive T-Zell-Epitope, die für allergische Reaktionen sowohl gegenüber rohen als auch verarbeiteten Sellerie verantwortlich sind [42]. Sellerie kann milde Lokalreaktionen wie die Kontakturtikaria der Mundschleimhaut auslösen, führt aber potentiell zu schwereren allergischen Reaktionen [43] und wurde sogar als eines der häufigsten auslösenden Nahrungsmittel bei nahrungsmittelinduzierter Anaphylaxie beschrieben [44, 45]. Sellerie findet sich in frischer Form in Salaten, gekocht in verschiedenen Speisen oder als getrocknetes Gewürz in vielen industriellen Produkten. Bereits ab einer Dosis von 0,002 mg Sellerieprotein können subjektive Symptome und ab einer Dosis von 1,6 mg objektive Symptome ausgelöst werden [38]. Es konnte gezeigt werden, dass Sellerie auch in gekochter Form (über 76 min bei 100°C) und als Gewürz (etwa 4,5-fach höherer Proteingehalt als roher Sellerie) Reaktionen auslösen kann. Dabei war das Api g 1 am thermolabilsten im Gegensatz zu Api g 4 und CCD [46].

1.3.3 Diagnostisches Vorgehen bei pollenassoziierter Nahrungsmittelallergie

Entsprechend der Leitlinie zu den kreuzreaktiven Nahrungsmitteln [5] sind die Anamnese sowie Ernährungs- und Symptomprotokolle bei Verdacht auf eine Nahrungsmittelallergie wesentlich. Hiermit können Informationen zu dem in Frage kommenden Nahrungsmittel, vorbestehende Sensibilisierungen auf Inhalationsallergene und mögliche aggravierende Faktoren (Pollenflug, körperliche Anstrengung, Medikamente, Alkohol etc.) gewonnen werden. Der Verdacht einer NMA wird durch Ermittlung des Sensibilisierungsprofils weiter untersucht. Dazu dienen in der klinischen Routinediagnostik der Haut-Prick-Test und die Bestimmung allergenspezifischer IgE-Antikörper.

Bei Verdacht auf eine pollenassoziierte NMA sollte der Haut-Prick-Test als Prick-zu-Prick-Test mit frischen Nahrungsmitteln durchgeführt werden [47]. Kommerziell erhältliche Extrakte

enthalten häufig nicht alle Allergenkomponenten (instabile Allergene unterrepräsentiert) [5]. Der Prick-zu-Prick-Test weist eine höhere Sensitivität zum Nachweis einer Sensibilisierung auf, kann jedoch aufgrund der Verwendung frischer Nahrungsmittel nicht standardisiert werden, sodass die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist. Systemische allergische Reaktionen während einer Prick-Testung sind selten, jedoch sind in 0,02 % der Prick-Testungen anaphylaktische Reaktionen, insbesondere bei Testung frischer pollenassoziierter Nahrungsmittel, beschrieben worden [48].

Die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper kann gegenüber dem Gesamtextrakt oder einzelnen Komponenten erfolgen. Für Sellerie ist zurzeit nur ein rekombinantes Allergen das rApi g 1.01 verfügbar, während für Haselnuss verschiedene rekombinante Allergene (rCor a 1, rCor a 8, rCor a 9 und rCor a 14) als Einzelallergene zur IgE-Bestimmung zur Verfügung stehen (ImmunoCAP® Allergens 2014, Thermo Fischer). Die Bestimmung der einzelnen Komponenten ist insbesondere bei systemischen Reaktionen und unklarer Anamnese von Vorteil, so kann zum Beispiel eine Sensibilisierung auf Cor a 8, Cor a 9 und Cor a 14 für eine schwere systemische Reaktionen verantwortlich sein [32, 34, 49].

Bei eindeutiger Anamnese und nachgewiesener Sensibilisierung mittels Haut-Prick-Test oder spezifischem IgE im Serum kann auf den oralen Provokationstest verzichtet werden. Jedoch sollte bei unklarer Anamnese, unter Einbeziehung eines Ernährungs- und Symptomprotokolls, nach Durchführung von Haut-Prick-Tests und/oder Bestimmung des spezifischen IgE die orale Provokationstestung zur Abgrenzung einer Allergie von einer klinisch nicht relevanten Sensibilisierung durchgeführt werden [5]. Als Goldstandard gilt heute die doppelblinde placebokontrolliert durchgeführte orale Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC) [50]. Dabei wird das verdächtige Nahrungsmittel unter stationären Bedingungen in steigenden Konzentrationen zunächst mukosal und anschließend systemisch provoziert. Eine solche DBPCFC ist sehr zeit- und kostenintensiv und birgt für den Patienten das Risiko einer schweren systemischen Reaktion.

1.4 SPOT-Synthese und ihre Möglichkeiten in der Allergiediagnostik

Die SPOT-Synthese stellt eine einfache Methode dar, parallel eine Vielzahl von Peptiden an definierten Positionen einer Grundmembran zu synthetisieren [51, 52]. Als Basis dient meist eine

Membran aus Cellulose. Die freien Hydroxylgruppen der Cellulose werden in einem ersten Schritt aminofunktionalisiert und dienen als Anker für die nachfolgende Peptidsynthese. Anschließend erfolgt der schrittweise Aufbau der Peptide vom C- zum N-Terminus nach der Fmoc-Strategie [53, 54] (Abbildung 4). Die am Anfang manuell durchgeführte Methode war zunächst sehr zeitaufwendig und konnte in den letzten Jahren von einer halbautomatischen zu einer vollautomatischen Synthese mit Einsatz eines Pipettierroboters weiterentwickelt werden [52].

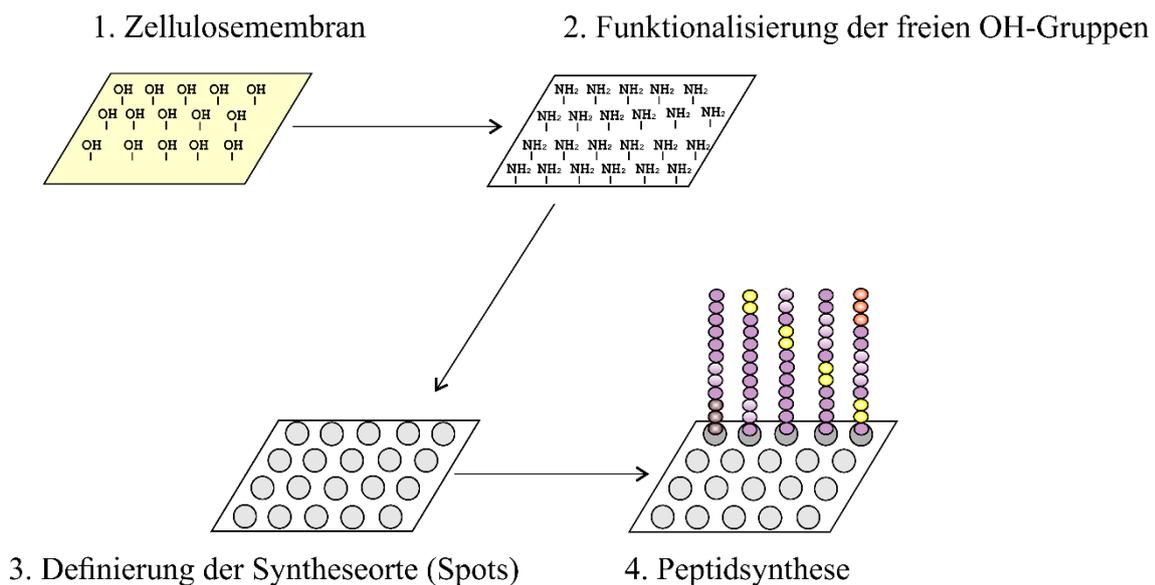


Abbildung 4: Exemplarischer Ablauf der SPOT-Synthese

Solche definierten Anordnungen kurzer Peptide werden als Peptid-Scan dazu genutzt, lineare Epitope innerhalb einer Sequenz zu identifizieren. Dafür wird die gesamte Sequenz eines Proteins (Allergens) in kurzen überlappenden Peptiden auf einer Membran synthetisiert (Abbildung 5) und kann dann für immunologische Bindungsstudien mit Serum von Probanden oder definierten Antikörpern, Proteinen oder Peptiden verwendet werden [55, 56].

Die Identifizierung von spezifischen IgE-bindenden Epitopen innerhalb eines Allergens ist wesentlich für das immunologische Verständnis allergischer Reaktionen und kann dazu beitragen, die allergologische Diagnostik zu verbessern.

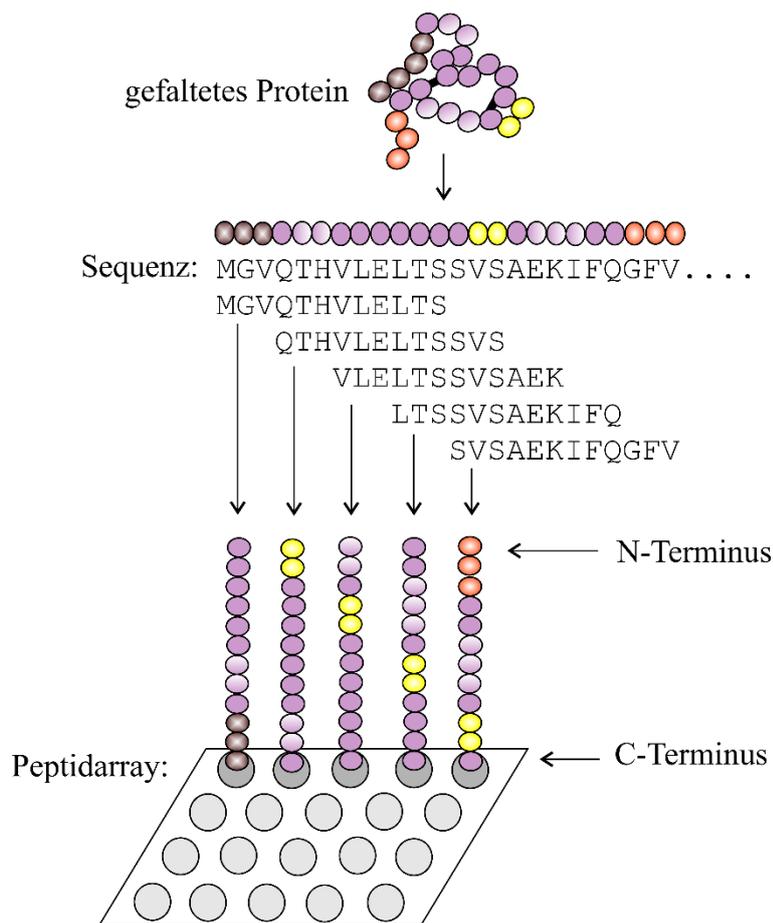


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Peptidarrays

In Studien wurden für die Klasse-1-Allergene von Erdnuss, Soja, Weizen, Milch, Ei und Garnele kurze IgE-bindende Epitope identifiziert und versucht eine Assoziation zur Schwere der allergischen Reaktion herzustellen [57]. Die Epitope dieser Allergene sind häufig linear und stabil gegenüber einer Prozessierung. Anders sieht es bei Klasse-2-Nahrungsmittelallergenen aus. Hier sind die Allergene häufig konformatorisch und die Epitope liegen in hoch konservierten Bereichen, die in ihrer Sequenz und dreidimensionalen Struktur starke Ähnlichkeiten innerhalb der Pollen- und Nahrungsmittelallergene zeigen. Dadurch ist es erschwert einzelne bindende Bereiche zu identifizieren und Aussagen über eine relevante Allergie oder eine Sensibilisierung zu treffen.

2 Zielsetzung

Nahrungsmittelallergien infolge immunologischer Kreuzreaktionen zu Inhalationsallergenen [5] können zum Teil schwere allergische Reaktionen auslösen und haben aufgrund der stetigen Zunahme von Pollenallergien eine steigende Tendenz [3, 5]. Haselnuss und Sellerie lösen sehr häufig bei Birkenpollen- und Beifußpollenallergikern schwere Reaktionen aus und sind in industriell hergestellten Nahrungsmitteln weit verbreitet [32, 40]. Die therapeutischen Optionen erweisen sich nach wie vor als unbefriedigend [5], sodass die Patienten das entsprechende Allergen konsequent meiden müssen. Dabei kann die minimale Dosis zur Auslösung einer allergischen Reaktion unter der Grenze zur Deklarationspflicht liegen [38]. Die Auswahl der Sorten für den industriellen Einsatz von Knollensellerie erfolgt nach wirtschaftlichen Gesichtspunkten (ertragreiche Sorte, rasches Wachstum, gute Innenqualität, Widerstandsfähigkeit gegen Septoria (Schlauchpilze) und gute Lagerfähigkeit). Bereits bei anderen pollenassoziierten Nahrungsmittelallergenen, wie z. Bsp. Apfel [29, 58] und Tomate [27, 59], konnte ein deutlicher Einfluss der Sortenart auf die Allergenität nachgewiesen werden. Aufgrund der Relevanz und weiten Verbreitung war es Ziel im ersten Teil dieser Arbeit, Nahrungsmittelallergiker mit Sensibilisierungen auf die beiden pollenassoziierten Allergene Haselnuss und Sellerie zu identifizieren (I) sowie die Allergenität verschiedener Sorten von Knollensellerie zu untersuchen (II) und dabei den Einfluss von Trockenstress beim Anbau zu untersuchen (III).

Einen weiteren Aspekt pollenassoziiertter Nahrungsmittelallergien stellt das diagnostische Vorgehen dar. Bei eindeutiger Anamnese und dazu passendem Nachweis einer Sensibilisierung durch den Prick-Test oder dem Nachweis spezifischer IgE-Antikörper können diätetische Empfehlungen ausgesprochen werden [5]. Bei schweren Reaktionen, nicht eindeutiger Anamnese oder mehreren infrage kommenden Allergenen wird es schwieriger, therapeutische Entscheidungen zu treffen. Durch kreuzreaktive Antikörper können positive Reaktionen ohne klinische Relevanz falsch interpretiert werden. Ein weiteres Problem in der Diagnostik besteht darin, dass die Schwere der allergischen Reaktion weder durch den Prick-Test noch durch serologische Tests vorhergesagt werden kann. Die DBPCFC bleibt deswegen der Goldstandard zur eindeutigen Bestätigung einer Nahrungsmittelallergie [50]. Für den Patienten stellt die DBPCFC ein gewisses Risiko dar, da erneut eine schwere oder anaphylaktische Reaktion auftreten kann.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden enorme Fortschritte in Richtung einer komponentenbasierten Diagnostik erzielt (CRD – component-resolved diagnostic) [5, 60]. Zahlreiche Major- und Minorallergene konnten identifiziert und als rekombinante Allergene für die klinische Routinediagnostik etabliert werden. Bei einzelnen Allergenen erlaubt das Sensibilisierungsprofil sogar Hinweise für das Risiko einer schweren systemischen Reaktion (nsLTP und Speicherproteine). Der Einsatz solcher rekombinanter Allergene zur allergologischen Diagnostik ist aufgrund der Herstellungsprozedur sehr kostenintensiv. Die Erforschung IgE-bindender Epitope von wichtigen Nahrungsmittelallergenen kann als Basis für die Entwicklung kostengünstiger Testverfahren zur verbesserten Diagnostik beitragen und war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Zu diesem Zweck wurde die SPOT-Synthese als günstige und valide Methode zur Herstellung großer Mengen von Peptiden der Hauptallergene von Sellerie und Haselnuss ausgewählt [51, 52]. Zunächst sollte ein optimiertes Protokoll zum gezielten Nachweis von spezifischer IgE-Bindung (IV) erarbeitet werden. Mithilfe dieses Protokolls sollten IgE-Epitope innerhalb der Hauptallergene Api g 1 und Cor a 1 ermittelt (V) und untersucht werden, ob deren Erkennung Hinweise auf die klinische Symptomatik zulässt.

3 Material und Methoden

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Nahrungsmittelallergiker mit Reaktionen gegenüber Haselnuss und/oder Sellerie identifiziert. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Genotyps (verschiedene Sorten) und unterschiedlicher Anbaubedingungen (Trockenstress) auf das allergene Potential von Knollensellerie untersucht. Für das Screening der Probanden auf Sellerieallergie wurde die Sorte Brilliant verwendet und täglich frisch aus dem lokalen Einzelhandel bezogen. Die weiteren verschiedenen SELLERIESORTEN wurden im Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren/Erfurt e. V. (IGZ), in Großbeeren angebaut. Für die Durchführung von Hauttestungen (Skin Prick Test – SPT) und DBPCFCs (double-blind, placebo-controlled food challenge) wurden die Sellerieknollen frisch geerntet und zweimal in der Woche geliefert. Folgende SELLERIESORTEN wurden untersucht: Anita, Bergers weiße Kugel, Brilliant, Goliath, Ibis, Kojak, Mars, Monarch, Prinz und Rex. Die Sorten Monarch und Prinz wurden zusätzlich zu den normalen Anbaubedingungen auch unter Trockenstress angebaut.

3.1 Identifizierung von Nahrungsmittelallergikern

3.1.1 Rekrutierung der Probanden

Für die Untersuchungen wurden Probanden im Alter von 18 bis 49 Jahren mit einer allergischen Reaktion auf Sellerie und/oder Haselnuss in der Vorgeschichte im Allergie Centrum Charité der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Zusätzlich wurden gesunde, nicht allergische Probanden rekrutiert. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission der Charité geprüft und genehmigt. Die Probanden wurden beim Erstgespräch ausführlich über die Studie, die geplanten Untersuchungen sowie über Risiken und mögliche Nebenwirkungen der Studienteilnahme aufgeklärt. Alle Probanden haben vor Beginn der Studie ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Sämtliche klinischen Untersuchungen und Blutentnahmen fanden außerhalb der Pollensaison statt, um eine zusätzliche Verstärkung der klinischen Symptomatik durch Inhalation kreuzreaktiver Pollenallergene zu vermeiden [50].

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Allergikergruppe (Sellerie- und Haselnussallergiker) wurden Probanden mit einem positiven SPT gegenüber Sellerie und/oder Haselnuss (Quaddeldurchmesser > 3 mm), positivem allergen-spezifischen IgE gegenüber Sellerie und/oder Haselnuss (sIgE > 0,35 kU/l) und einer positiven Reaktion im DBPCFC mit Sellerie und/oder Haselnuss eingeschlossen.

In die Kontrollgruppe wurden gesunde Probanden ohne allergische Reaktion in der Vorgeschichte, mit einem negativen SPT gegenüber Birke, Beifuß, Gräser, Haselnuss, Sellerie, Sojamilch, Sojaextrakt, Katze, Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*) und normalwertigen Gesamt-IgE-Werten (Gesamt-IgE bis 94 kU/l) aufgenommen.

Ausschlusskriterien waren schwere lebensbedrohliche anaphylaktische Reaktionen nach Sellerie- und/oder Haselnusskonsum in der Vorgeschichte, eine aktuell durchgeführte Hyposensibilisierung, Schwangerschaft, Stillzeit, schwerwiegende akute oder chronische Erkrankungen und die Einnahme bestimmter Medikamente (Antihistaminika, Omalizumab, Immunsuppressiva, topische, inhalative und systemische Glukokortikosteroide, topische Calcineurin-Inhibitoren, inhalative Betamimetika und Anticholinergika, Betablocker, ACE-Hemmer, Theophyllin, Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, Cromoglicinsäure, Nedocromil, NSAR, Cyclosporin A und Antidepressiva) [61, 62].

3.1.3 Hauttest

Die Pricktests wurden an den Innenseiten der Unterarme mit einer standardisierten 1-mm-Lanzette (ALK-Abelló, Hørsholm, Dänemark) durchgeführt. Histamindihydrochlorid (10 mg/ml, ALK Scherax, Wedel) wurde als Positivkontrolle und Natriumchlorid (0,9 % NaCl, pH 7,4, ALK Scherax, Wedel) als Negativkontrolle eingesetzt. Roher Knollensellerie, frische unbehandelte Haselnüsse und Sojamilch wurden mithilfe der Prick-zu-Prick-Technik getestet [63]. Für die Testung von Birken-, Beifuß-, Gräserpollen, Soja, Katze und Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*) wurden kommerziell erhältliche Pricktestlösungen verwendet (ALK Scherax, Wedel). Zur Testung der Sellerieextrakte wurden Proteinextrakte (Herstellung siehe 3.2) der Sorten Anita und Prinz mit einer Proteinkonzentration von 0,1 – 1 – 10 – 100 µg/ml eingesetzt. Nach 15 min wurde die Reaktion abgelesen. Der Quaddeldurchmesser wurde nach der Formel $(D+d)/2$ ermittelt, wobei

D den maximalen Quaddeldurchmesser und d den darauf senkrechten Durchmesser beschreiben. Bei einem Quaddeldurchmesser ≥ 3 mm wurde die Reaktion als positiv gewertet [62, 64].

3.1.4 Bestimmung des Gesamt- und spezifischen Serum-Immunglobulins E

Die Blutentnahme erfolgte mit BD CPT™-Röhrchen mithilfe des BD Vacutainer®-Systems (BD, Heidelberg). Nach vollständiger Gerinnung des Blutes in den BD CPT™-Röhrchen (30 min bei RT) erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 3000 U/min. Dabei wurden das Serum, die mononukleären Zellen (PBMCs) und die restlichen Blutzellen durch das integrierte Dichtentrennungssystem aus FICOLL® und Gel in den BD CPT™-Röhrchen getrennt. Ein Teil des Serums wurde direkt für die Bestimmung des IgE verwendet. Das restliche Serum wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung des Gesamt-IgE und des spezifischen IgE für Sellerie und Haselnuss erfolgte mithilfe des Phadia CAP-FEiA (Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay)-Systems™ (Phadia Diagnostics, Uppsala, Schweden). Die IgE-Konzentrationen der einzelnen Seren wurden quantitativ in kU/l angegeben, wobei 1 IU 2,4 ng IgE entsprechen. Spezifisches IgE wurde in CAP-Klassen von 0 bis 6 angegeben (Klasse 0: < 0.35 kU/l; Klasse 1: $0.35 - 0.70$ kU/l; Klasse 2: $0.70 - 3.50$ kU/l; Klasse 3: $3.50 - 17.50$ kU/l; Klasse 4: $17.50 - 50.00$ kU/l; Klasse 5: $50.00 - 100.00$ kU/l; Klasse 6: 1100 kU/l). Spezifisches IgE über 0.35 kU/l wurde als positiv gewertet.

3.1.5 Doppelblinde placebokontrollierte orale Nahrungsmittelprovokation

Die doppelblinde placebokontrolliert durchgeführte orale Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC) stellt den „Goldstandard“ der Nahrungsmittelallergiediagnostik dar und wurde entsprechend der aktuellen Leitlinien durchgeführt [50, 65]. Die verwendeten Provokationsbreie wurden vor jeder Provokation frisch [46] zubereitet und waren identisch in Bezug auf Geschmack, Aussehen, Geruch, Viskosität, Textur, Struktur und Volumen. Die Zusammensetzung der Provokationsbreie ist in Tabelle 2 dargestellt.

Für die Verum-Provokation mit Sellerie wurde eine kumulative Dosis von 50 g frischem, fein gemahlenem Knollensellerie in vier Teilschritten zu 5,0 – 10,0 – 15,0 – 20,0 g verabreicht. Bei der Verum-Provokation mit Haselnuss wurde die kumulative Dosis von 10,0 g fein gemahlenen Haselnüssen ebenfalls in vier Teilschritten zu 1,25 – 2,5 – 2,5 – 3,75 g verabreicht. Zwischen den Titrationsstufen lag ein Zeitintervall von 15 min. Vor der Verabreichung der nächsthöheren Provokationsdosis wurden die Haut und die Mundschleimhaut inspiziert und Vitalparameter wie

Blutdruck und Herzfrequenz gemessen. Zur Überwachung der Lungenfunktion wurde zu Beginn und jeweils vor und nach jeder DBPCFC eine Spirometrie durchgeführt und die forcierte Einsekundenkapazität (FEV1) beurteilt [66]. Patienten mit einem Asthma und einer FEV1 unter 80 % des errechneten Sollwertes oder des im Vorfeld ermittelten Bestwertes wurden aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit falsch positiver Reaktionen [67] von der DBPCFC ausgeschlossen. Hautveränderungen bei Probanden mit atopischer Dermatitis wurden mithilfe des SCORAD-Index jeweils vor und 24 Stunden nach jeder Provokation beurteilt [68, 69].

Tabelle 2: Zusammensetzung der Provokationsbreie für die DBPCFC

Provokationsbreie für DBPCFC mit Haselnuss			
Verum*		Placebo*	
100 g	Wasser (abgekocht)	100 g	Wasser (abgekocht)
15 g	Kakao ¹	15 g	Kakao ¹
15 g	Zucker ²	15 g	Zucker ²
5 g	Haferflocken ³	5 g	Haferflocken ³
15 g	Nestlé Sinlac Spezial Brei ⁴	15 g	Nestlé Sinlac Spezial Brei ⁴
40 ml	Pfefferminzsirup ⁵	40 ml	Pfefferminzsirup ⁵
10 g	sehr fein gemahlene frische Haselnüsse	10 g	sehr fein gemahlene Haferflocken ³
Provokationsbreie für DBPCFC mit Sellerie			
Verum[#]		Placebo[†]	
108,75 ml	Wasser (abgekocht)	148,75 ml	Wasser (abgekocht)
50 g	Fein gemahlener frischer Knollensellerie		
20 ml	Pfefferminzsirup ⁵	20 ml	Pfefferminzsirup ⁵
15 g	Kakao ¹	15 g	Kakao ¹
15 g	Zucker ²	15 g	Zucker ²
20 g	Reisflocken ³	25 g	Reisflocken ³
20 g	Nestlé Sinlac Spezial Brei ⁴	40 g	Nestlé Sinlac Spezial Brei ⁴
1,25 g	Aroma: Orange ⁶	1,25 g	Aroma: Orange ⁶

¹ Krüger GmbH, Bergisch Gladbach; ² Südzucker AG, Zeitz; ³ Demeter, Baukhof, Rosche; ⁴ Nestlé Nutrition GmbH, Frankfurt am Main; ⁵ Monin®, Birmensdorf, Schweiz; ⁶ SHS Gesellschaft für klinische Ernährung mbH, Heilbronn; *ergibt 200 g Provokationsbrei mit einer Konzentration von 0,05 g Haselnuss pro 1 g Brei. Der gesamte Brei wird in vier Portionen zu 25 g – 50 g – 50 g – 75 g aufgeteilt und im Intervall von 15 min verabreicht. [#]ergibt 250 g Provokationsbrei mit einer Konzentration von 0,2 g Sellerie pro 1 g Brei. Der gesamte Brei wird in vier Portionen zu 25 g – 50 g – 75 g – 100 g aufgeteilt und im Intervall von 15 min verabreicht. [†]ergibt 265 g Brei, davon werden 250 g aufgeteilt in vier Portionen zu 25 g – 50 g – 75 g – 100 g und 15 g werden verworfen.

3.1.6 Symptomenscore

Für die Beurteilung der Schwere der allergischen Reaktion während der DBPCFC wurde ein Symptomenscore eingesetzt [59]. Der Score wurde nach den betroffenen Organsystemen wie folgt unterteilt: Symptome an der Haut und Schleimhaut, gastrointestinale, kardiovaskuläre und pulmonale Symptome. In die Beurteilung wurden subjektive und objektive Symptome

einbezogen. Im Falle einer medikamentösen Intervention erfolgte die Punktevergabe abhängig vom verabreichten Medikament. Die einzelnen Punktzahlen für den Symptomenscore sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Symptomenscore

Objektive Symptome		Subjektive Symptome	
Symptome an der Haut			
generalisiertes Erythem	2 Punkte	Juckreiz der Haut lokal oder generalisiert	1 Punkt
Urtikaria	2 Punkte		
Angioödem	4 Punkte		
SCORAD-Anstieg um 10 Punkte	2 Punkte		
SCORAD-Anstieg um 15 Punkte	3 Punkte		
SCORAD-Anstieg um 20 Punkte	4 Punkte		
Symptome an der Schleimhaut			
Erythem, Papeln, Vesikel	2 Punkte	Juckreiz, Brennen, Kribbeln, Taubheit, pelziges Gefühl (auch in den Ohren)	1 Punkt
Konjunktivitis (2 Punkte)			
Rhinitis, Niesen, nasale Sprache (2 Punkte)			
Gastrointestinale Symptome			
Durchfall	2 Punkte	Übelkeit, Brechreiz, Unwohlsein im Magen (flaues Gefühl)	1 Punkt
Erbrechen	2 Punkte		
Stuhl-/Harninkontinenz	4 Punkte	Magen- oder Bauchschmerzen	1 Punkt
		Sodbrennen, Aufstoßen, Blähbauch	1 Punkt
Kardiovaskuläre Symptome			
Änderung des Blutdrucks um > 20 mm Hg, Änderung der Herzfrequenz um > 20 Schläge/min, Tachykardie (> 100 Schläge/min)	2 Punkte	Kopfschmerzen	1 Punkt
		Schwindel, Flush	1 Punkt
Blässe, Kaltschweißigkeit, Kreislaufzentralisierung (kalte Extremitäten)	3 Punkte	Müdigkeit, Abgeschlagenheit (leicht reduzierter Allgemeinzustand); Gefühl eines Blutdruckanstiegs bzw. -abfalls	1 Punkt
Vigilanzminderung (reduzierter bis stark reduzierter Allgemeinzustand)	3 Punkte		
Orthostatische Dysregulation (Kollaps)	4 Punkte		
Bewusstlosigkeit	5 Punkte		
Kreislaufstillstand	6 Punkte		
Pulmonale Symptome			
Abfall des FEV ₁ > 10 %	2 Punkte		1 Punkt

Inspiratorischer Stridor	4 Punkte	Hustenreiz, Heiserkeit, Globusgefühl, Dysphagie, Räuspern	
Expiratorisches Giemen	4 Punkte	Engegefühl in der Brust	1 Punkt
Atemstillstand	6 Punkte		
Medikamentenscore			
Inhalative Beta ₂ -Sympathomimetika (200 µg Salbutamol oder Äquivalent)			1 Punkt
H ₁ -Rezeptorenblocker ≈ Antihistaminika (10 mg Cetirizin oder Äquivalent)			2 Punkte
Glukokortikoide (10 mg Prednisolon oder Äquivalent)			3 Punkte
Adrenalin ≈ Epinephrin (Suprarenin 0,25 – 1 mg i. v. Wdh. nach Wirkung)			6 Punkte

Die Endbewertung des Symptomenscores setzt sich aus dem objektiven Symptomenscore (OSc), dem subjektiven Symptomenscore (SSc) und dem Medikamentenscore (MSc) wie folgt zusammen:

$$\text{Symptomenscore} = \text{OSc} + (\text{SSc}/2) + \text{MSc}$$

Mithilfe des Scores wurde der Schweregrad der allergischen Reaktion festgelegt und ein Summenscore gebildet (Tabelle 4). Für die Zuordnung einer klinisch relevanten Allergie war das Vorliegen von mindestens einem objektiven Symptom notwendig.

Tabelle 4: Schweregradeinteilung des Symptomenscores

Score	Schweregradeinteilung	Summenscore
0 Punkte	keine Allergie	0
> 0 bis < 2 Punkte	fragliche Relevanz	1
≥ 2 bis ≤ 4 Punkte	Schweregrad I	2
> 4 bis ≤ 7 Punkte	Schweregrad II	3
> 7 Punkte	Schweregrad III	4

3.2 Herstellung von Sellerieextrakten

Die Herstellung der Sellerieextrakte erfolgte freundlicherweise von dem Biologielaboranten Dennis Ernst aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Worm.

Zur Herstellung von Proteinextrakten der Selleriesorten Anita und Prinz wurden jeweils 30 g frischer, fein gemahlener Sellerie von jeder Sorte verwendet und zunächst im flüssigen Stickstoff zermörsert. Die Proteinlyse erfolgte mit 30 ml kaltem (4 °C) PBS (Phosphate-Buffered Saline,

Life Technologies, Eggenstein) mit 5 % Noident P40 (NP40, Roche, Mannheim) über 30 min auf Eis unter gelegentlichem Rühren. Die Proben wurden bei 4000 g, bei 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1,5-fachem Volumen eiskaltem (-20 °C) Aceton (Merck, Darmstadt) versetzt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden dann bei 4000 g bei 4 °C 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und mit eiskaltem (-20 °C) Aceton gewaschen. Der Waschschrift wurde 3-mal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 g, bei 4 °C über 20 min wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet, im Elutionspuffer resuspendiert und bei 4 °C über Nacht rotierend inkubiert. Die überschüssigen Zellbestandteile wurden bei 400 g bei 4 °C über 10 min abzentrifugiert (100 µm Cell Strainer, Yellow, Sterile, Falcon® Becton Dickinson Labware, USA). Der Überstand (= Proteinextrakt) wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3 Herstellung von Peptidbibliotheken mittels SPOT-Synthese

3.3.1 Durchführung der SPOT-Synthese

Die Herstellung von Peptidarrays mit überlappenden Peptiden des Sellerie-Hauptallergens Api g 1.0101 und der zehn Varianten des Haselnuss-Hauptallergens Cor a 1.0101 - 1.0404 erfolgte mittels halbautomatischer SPOT-Synthese [52, 70-72]. Dabei fand der schrittweise Aufbau der Peptide nach der Fmoc-Strategie mit fest definierten Synthesepositionen auf Trägermembranen statt. Eine schematische Darstellung des Syntheseablaufs ist in Abbildung 6 dargestellt.



Abbildung 6: Schematische Darstellung der SPOT-Synthese

Die Länge der Peptide, ihre Sequenzen und Positionen innerhalb der Membran (Peptidarrays) wurde mithilfe der hauseigenen Software LISA 1.83. festgelegt. Die verwendeten Sequenzen der Hauptallergene von Sellerie und Haselnuss sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Für unsere Untersuchungen wurden die Sequenzen von Api g 1.0101 und Cor a 1.0301 jeweils als 7-, 12- und 24-mere Peptide mit einem Versatz von drei Aminosäuren synthetisiert. Für die Epitopvergleiche wurden die Sequenzen von 10 Cor a 1 Varianten (Cor a 1.0101 bis 1.0404) als 12-mere Peptide mit einem Versatz von drei Aminosäuren synthetisiert. Für die Mutationsanalysen des Epitops wurden in den Sequenzen systematisch Aminosäureaustausche vorgenommen, so dass eine Peptidbibliothek entsteht, die alle denkbaren Einzelsubstitutionsvarianten der Wildtyp-Sequenz enthält.

Die Synthese erfolgte halbautomatisch mithilfe des MultiPep SPOT-Roboters (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln) unter Verwendung von handelsüblichen Aminosäure-Aktivestern (Novabiochem, Merck, Darmstadt). Dabei ist die Carboxyl-Gruppe mit einer Pentafluorphenol-Gruppe verestert und der N-Terminus mittels einer basenlabilen Fmoc-Gruppe geschützt. Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen waren die funktionellen Gruppen der Seitenketten mit den folgenden säurelabilen Seitenschutzgruppen blockiert: *tert.*-Butyl Ester (*OtBu*) für Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D), *tert.*-Butyl Ether (*tBu*) für Cystein (C),

Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y), *tert.*-Butyloxycarbonyl- (Boc) für Lysin (K) und Tryptophan (W), Triphenylmethyl- (Trt) für Asparagin (N), Glutamin (Q) und Histidin (H), 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf) für Arginin (R).

Nach erfolgter Derivatisierung der Cellulosemembran (siehe 3.3.2), wurden die Syntheseorte der Peptide (Spots) durch punktförmiges Pipettieren einer 0,3 M Fmoc- β -Ala-OPfp-Lösung festgelegt. Der Einsatz dieser Methode (β -Alanin zur Definierung der Spots) bietet den Vorteil, dass zwischen der Grundmembran und dem eigentlichen Peptid ein „Abstandhalter“ eingebaut wird, welcher später eine bessere Zugänglichkeit des Analyten (IgE-Antikörper) an die Peptide ermöglicht.

Tabelle 5: Sequenzen der Hauptallergene von Sellerie und Haselnuss

Allergen	Prot. ID	Aminosäuresequenz des Allergens
Api g 1.0101	P49372	MGVQTHVLELTSSVSAEKIFQGFVIDVDTVLPKAAPGAYKSVEIKGDGGPGTLKIITLPDGGPITMTLRIDGVNKEALTF DYSVIDGDILLGFIESIENHVVLVPTADGGSICKTTAIFHTKGDVAVPEENIKYANEQNTALFKALEAYLIAN
Cor a 1.0301	Q39454	MGVFNYEETETTSVIPPAPARLFKRFVLDSDNLI PKVAPKAIKSIEIEGNGGPGTIKKICFDEGSPFNYIKQKVEEIDQANFS YRYSVIEGDALSDKLEKINYEIKIVASPHGGSILKISKYHTIGDHELKDEQIKAGKEKASGLFKAVEGYLLAHS DAYN
Cor a 1.0101	Q08407	MGVFNYEETPSVIPAARLFKSYVLDGDKLIPKVAPQAITSVENVEGNGGPGTIKNITFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFT YSYTVIEGDVLDGDKLEKVCHELKIVAAPGGGSILKISSKFHAKGDHEINAEEMKGAKEMAEKLLRAVETYLLAHS AEYN
Cor a 1.0102	Q08407	MGVFNYEETPSVIPAARLFKSYVLDGDKLIPKVAPQAITSVENVEGNGGPGTIKNITFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFK YSYTVIEGDVLDGDKLEKVCSELKIVAAPGGGSILKISSKFHAKGDHEINAEEMKGAKEMAEKLLRAVETYLLAHS AEYN
Cor a 1.0103	Q08407	MGVFNYEAEETTSVIPAARLFKSYVLDGDKLIPKVAPQAITSVENVEGNGGPGTIKNITFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFT YSYTVIEGDVLDGDKLEKVCHELKIVAAPGGGSILKISSKFHAKGDHEINAEEMKGAKEMAEKLLRAVETYLLAHS AEYN
Cor a 1.0104	Q08407	MGVFNYEETPSVISAARLFKSYVLDGDKLIPKVAPQAITSVENVGGNGGPGTIKNITFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFK YSYTVIEGDVLDGDKLEKVCSELKIVAAPGGGSTLKISSKFHAKGDHEINAEEMKGAKEMAEKLLRAVETYLLAHS AEYN
Cor a 1.0201	Q39453	MGVFNYEETESTSVIPAARLFKAFILDGNNLIPKVAPQAVSSVENVEGNGGPGTIKKITFSEGSPFKYVKERVEEVDHTNFK YSYTVIEGGPVGDKVEKICNEIKIVAAPDGGGSILKISNKYHTKGDHEVDAEHIKGGKEKVEGLFRAVEAYLLAHS DAYN
Cor a 1.0401	Q9SWR4	MGVFCYEDEATSVIPPAPARLFKSFVLDADNLI PKVAPQHFTSAENLEGNGGPGTIKKITFAEGNEFKYMKHKVEEIDHANFK YCYSIIIEGGPLGHTLEKISYEIKMAAAPHGGGSILKITSKYHTKGNASINEEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPDAYC
Cor a 1.0402	Q9FPK4	MGVFSYEDEATSVIPPAPARLFKSFVLDADNLI PKVAPQHFTGAENLEGNGGPGTIKKITFAEGSEFKYMKHKVEEIDHANFK YCYSIIIEGGPLGHTLEKISYEIKMAAAPHGGGSILKITSKYHTKGNASISEEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPD TYC
Cor a 1.0403	Q9FPK3	MGVFCYEDEATSVIPPAPARLFKSFVLDADNLI PKVAPQHFTGAENLEGNGGPGTIKKITFAEGSEFKYMKHKVEEIDHANFK YCYSIIIEGGPLGHTLEKISYEIKMAAAPHGGGSILKITSKYHTKGNASISEEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPD TYC
Cor a 1.0404	Q9FPK2	MGVFSYEDEATSVIPPAPARLFKSFVLDADNLI PKVAPQHFTSAENLEGNGGPGTIKKITFAEGNEFKYMKHKVEEIDHANFK YCYSIIIEGGPLGHTLEKIPYEIKMAAAPHGGGSILKITSKYHTKGNASINEEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPD DAYC

Api g 1.0101 (Apium graveolens, Hauptallergen der Sellerie, Isoallergen 1). Cor a 1.0101 - 1.0104 (Corylus avellana, Hauptallergen der Haselnuss, Isoformen 5 (1.0101), 6 (1.0102), 11(1.0103) und 16 (1.0104)). Cor a 1.0201, 1.0301 und 1.0401 weitere Hauptallergene der Haselnuss mit Allergenvarianten Cor a 1.0402 - 1.0404. Prot.ID - UniProtKB/Swiss-Prot accession number.

Die verbliebenen Aminofunktionen auf der Membran wurden durch Acetylierung blockiert. Dafür wurde die Membran 2 min mit 2 % Acetanhydrid (Merck, Darmstadt) in N,N-Dimethylformamid (DMF, Fluka, Neu-Ulm) gefolgt von 30 min mit 2 % Acetanhydrid und 1 % Diisopropylethylamin (DIPA; Novabiochem, Merck, Darmstadt) in DMF inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in DMF (jeweils 5 min) erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin (Sigma-Aldrich, Steinheim) in DMF über 20 min. Nach weiteren Waschschritten mit DMF (5 x 3 min) und Ethanol (EtOH; 2 x 3 min) wurde der N-Terminus als Anker für den schrittweisen Peptidaufbau verwendet. Vor Beginn der nächsten Aminosäurekopplung wurde die freie NH₂-Gruppe mit Bromphenolblau (0,002 – 0,005 % (w/v) in Methanol; Fluka, Neu-Ulm) angefärbt [73], die Membran mit EtOH (1 x 3 min) und Ether (1 x 3 min; J.T. Baker, Niederlande) gewaschen und getrocknet. Beim Peptidaufbau wurden 0,3 M Aminosäure-Aktivester (2 Kopplungen zu jeweils 15 min Reaktionszeit) gelöst in 1-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP; Fluka, Steinheim) verwendet. Nach der Kopplung einer Aminosäure und Abspaltung der Fmoc-Aminoschutzgruppe wurde nach Durchführung oben genannter Wasch- und Färbeschritte die nächste N-terminal geschützte, aktivierte Aminosäure gekoppelt. Dieser Zyklus wurde so lange wiederholt, bis das Peptid die gewünschte Länge erreicht hatte. Nach vollständigem Aufbau der Peptide wurden zuerst die Fmoc-Schutzgruppe und anschließend die Seitenschutzgruppen abgespalten.

Zur Abspaltung der Seitenschutzgruppen [54, 56] wurde die Membran im ersten Schritt für 30 min mit 90 % Trifluoressigsäure (TFA; Merck, Darmstadt), 3 % Triisobutylsilan (TIBS; Fluka, Neu-Ulm), 2 % Wasser und 1 % Phenol in Dichlormethan (Gesamtvolumen 100 ml) inkubiert. Danach wurde die Membran mit DCM (4 x 3 min), DMF (3 x 3 min), EtOH (3 x 3 min) und Ether (2 x 3 min) gewaschen und getrocknet. Im zweiten Schritt wurde die Membran 2,5 Stunden mit 50 % TFA, 3 % TIBS, 2 % Wasser und 1 % Phenol in DCM (Gesamtvolumen 100 ml) inkubiert und anschließend mit DCM (4 x 3 min), DMF (3 x 3 min), EtOH (3 x 3 min) und Ether (2 x 3 min) gewaschen und getrocknet.

Die so hergestellten Peptide auf der Membran konnten nun für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

3.3.2 Herstellung und Funktionalisierung von Membranen

Als Grundlage für die Synthese der Peptidarrays wurden Cellulosemembranen verwendet (Whatman 50, Maidstone, England). Für unsere Versuchsreihen wurden zwei verschiedene

Membrantypen hergestellt: die Membran vom Estertyp (β -Ala-Membran) und die Membran vom Ethertyp (N-CAPE-Membran).

3.3.2.1 Herstellung von β -Alanin funktionalisierten Membranen

Gemäß des Standardprotokolls zur Herstellung von β -Ala-Membranen [56] wurde ein Blatt Cellulose (20,3 x 28,5 cm) in einer Lösung von 0,2 M Fmoc- β -Ala-OH, aktiviert mit 0,24 M Diisopropylcarbodiimid (DIC, Sigma-Aldrich, Steinheim) und 0,4 M N⁷ Methylimidazol (NMI, Sigma-Aldrich, Steinheim) in DMF (50 ml Endvolumen) über Nacht inkubiert. Dadurch wurden die Hydroxyl-Gruppen der Cellulose mit β -Alanin verestert und somit Aminofunktionen als Anker für die anschließende Peptidsynthese geschaffen. Die Membran wurde in DMF (3 x 3 min) gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppen mit 20%igem Piperidin in DMF über 20 min abgespalten. Anschließend wurde die Membran mit DMF (5 x 3 min), EtOH (3 x 3 min) und Ether (2 x 3 min) gewaschen und getrocknet.

3.3.2.2 Herstellung von N-CAPE Membranen

Gemäß des Standardprotokolls zur Herstellung einer N-CAPE-Membran [74] wurde zunächst ein Blatt Cellulose (20,3 x 28,5 cm) für 2 min in einer Lösung aus 1 ml Perchlorsäure (70 % in Wasser; Fluka, Neu-Ulm) in 50 ml Methanol (Merck, Darmstadt) gewaschen (ansäuern der Membran). Nach vollständiger Trocknung (3 Stunden bei Raumtemperatur) wurde die Membran zur Etherbildung mit OH-Gruppen der Cellulose mit einer Lösung aus 6 ml Epibromhydrin (Fluka, Neu-Ulm), 600 μ l Perchlorsäure (70 % in Wasser) und 54 ml 1,4-Dioxan (wasserfrei, Sigma-Aldrich, Steinheim), für drei Stunden behandelt. Nach den Waschschritten mit jeweils 50 ml Methanol (1 x 30 min), EtOH (2 x 3 min) und DMF (3 x 3 min) wurde die Membran über Nacht in einer 50%-Lösung aus 1,3-Diaminopropan (Merck, Darmstadt) in DMF (60 ml) inkubiert. Dabei substituiert Diaminopropan die Brom-Funktion. Es folgten weitere Waschschriffe mit jeweils 50 ml DMF (2 x 3 min), EtOH (2 x 3 min), Wasser (2 x 3 min), EtOH (2 x 3 min) und Diethylether (2 x 3 min; J. T. Baker, Niederlande). Nach vollständiger Trocknung der Membran fand durch das Quenchen mit 50 ml einer 5,4 molaren Natrium-Methanolat-Lösung (30%ig in Methanol; Fluka, Neu-Ulm) über 20 min die Beseitigung nicht substituierter Brom-Funktion statt. Nach weiteren Waschschriffen mit jeweils 50 ml Methanol (3 x 3 min), Wasser (4 x 3 min), Ethanol (3 x 3 min) und Ether (2 x 3 min) wurde die Membran vollständig getrocknet und konnte nun für die SPOT-Synthese verwendet werden. Alle Schritte der Membranfunktionalisierung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.3.2.3 Modifikation von N-CAPE-Membranen

Um N-CAPE-Membranen mit unterschiedlichen Beladungen herzustellen, wurde jeder Schritt in der Membranherstellung systematisch modifiziert, wie in Tabelle 6 angegeben.

Zur Ermittlung der Membranbeladung wurden an allen Seiten der Membran Spots definiert, durch Pipettieren von 1 µl einer 0,3 M Fmoc-β-Ala-Opfp Lösung in DMF (Doppelkopplung, jeweils 15 min Reaktionszeit), anschließend ausgestanzt (Spotgröße: 0,25 cm²) und die Fmoc-Schutzgruppe mit 1 ml 20%igem Piperidin (in DMF) je Spot abgespalten. Die Beladung wurde durch die Messung der UV-Absorption (UV Spectrophotometer, Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, Wien) der freigesetzten Fmoc-Schutzgruppe gemessen und als Beladung (Mittelwert aus 10 Messungen) von einem Spot angegeben ($c[\text{nmol/spot}] = \text{OD}_{301} / \epsilon * 1000$, $\epsilon = 7.8$).

Tabelle 6: Modifikation der einzelnen Schritte zur Funktionalisierung der N-CAPE-Membran

	Standard*	Modifikation*
<u>I. Membran ansäuern</u>		
Perchlorsäure (70 % in Wasser) [aufgefüllt mit Methanol auf ein Gesamtvolumen von 51,0 ml]	1,0 ml	(A) 0,5 ml (B) 2,0 ml
Reaktionszeit	2 min	(C) 1,0 ml [†] (D) 1,0 ml [†] (E) 5 min (F) 10 min
Trocknung	3 h	(P) 2 x 3 min Ether
<u>II. Etherbildung mit OH-Gruppen der Zellulose</u>		
Epibromhydrin	6,0 ml	(G) 3,0 ml (H) 12,0 ml
Perchlorsäure (70 % in Wasser)	600,0 µl	(I) 300,0 µl (K) 1200,0 µl
Reaktionszeit	3 h	(L) 1 h (M) 24 h
<u>III. Substitution der Brom-Funktion</u>		
1,3-Diaminopropan [aufgefüllt mit Dimethylformamid auf ein Gesamtvolumen von 60,0 ml]	30,0 ml	(N) 15,0 ml (O) 45,0 ml

* Die Mengenangaben beziehen sich auf die benötigte Stoffmenge zur Herstellung einer Standard N-CAPE-Membran in der Größe von 20.3 x 28.5 cm. † aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 51,0 ml mit Wasser (anstatt Methanol) mit einer Reaktionszeit von 2 min in (C) und 10 min in (D).

Nach Auswertung der Zwischenergebnisse wurden Modifikationen, die eine hohe Membranbeladung erzielten, miteinander kombiniert. Die höchste Beladung der Membran konnte beim Ansäuern mit 2 ml Perchlorsäure mit 50 ml Wasser (anstatt Methanol) bei einer Reaktionszeit von 10 min und beschleunigter Trocknung mit Ether erreicht werden. Anschließend wurden zur Etherbildung 3 ml Epibromhydrin, 57 ml Dioxan und 1,2 ml Perchlorsäure bei einer

Reaktionszeit von einer Stunde eingesetzt. Zur Substitution der Bromfunktion wurde 45 ml Diaminopropan in 15 ml DMF verwendet. Zu Validierungszwecken wurde die beste Kombination zur Herstellung von neun Membranen herangezogen und jeweils die Membranbeladung untersucht.

3.4 Analyse der SPOT-synthetisierten Peptide

Um die Qualität der hergestellten Peptide zu untersuchen, wurden auf jeder Membran Kontrollpeptide mitsynthetisiert. Die Peptide wurden nach der Synthese von der Membran abgespalten.

Bei β -Ala-Membranen erfolgte die Synthese nach dem Standardprotokoll [51]. Bei der Abspaltung wurde die Esterbindung zwischen der Cellulose und dem β -Alanin gepalten und die Peptide wurden als Amide (C-terminal) von der Membran gelöst. Hierzu diente die Abspaltung mit Natriumhydroxid oder Ammoniakgas.

Bei N-CAPE Membranen wurde für die Analysepeptide der säurelabile Fmoc-Rink-Amid-Linker verwendet [75].

3.4.1 Abspaltung der Peptide

3.4.1.1 Peptid-Abspaltung von β -Ala-Membranen mit Natriumhydroxid

Bei den β -Ala-Membranen erfolgte die Abspaltung zunächst mit Natriumhydroxid (NaOH (0,125 M); Merck, Darmstadt). Dafür wurden die Spots mit Kontrollpeptiden auf der Membran ausgestanzt, in Eppendorfgläser überführt und die Peptide über drei Stunden in NaOH (0,125 M) abgespalten. Anschließend wurde die Lösung mit HCl (0,3 M) neutralisiert und für drei Stunden geschüttelt. Die Peptide wurden anschließend mittels ZipTip-C18 (Millipore GmbH, Schwalbach) entsalzt und konnten für die nachfolgenden Analysen verwendet werden.

3.4.1.2 Peptid-Abspaltung von β -Ala-Membranen mit Ammoniakgas

Aufgrund der eleganteren und gleichwohl effektiven Methode wurde die Abspaltung später mit Ammoniakgas durchgeführt [54, 76]. Dafür wurden die Analysespots zunächst ausgestanzt, in den Exsikator gegeben und 10 min evakuiert. Der Exsikator wurde mit Ammoniakgas (NH_3) gefüllt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde NH_3 15 min abgesaugt, der Exsikator

geöffnet und das restliche Gas unter dem Abzug ausgedampft. Die abgespaltenen Peptide wurden mit 100 µl Acetonitril/Wasser (1:1, v:v; Merck, Darmstadt) von den Cellulose-Spots gelöst und für die weiteren Analysen verwendet.

3.4.1.3 Peptid-Abspaltung von N-CAPE Membranen mithilfe des Rink-Linkers

Um eine spätere Abspaltung der Analysepeptide von N-CAPE Membranen zu ermöglichen, wurde bei der SPOT-Synthese nach der Festlegung der Spots mit β -Alanin (Doppelkopplung, jeweils 15 min Reaktionszeit) der Fmoc-Rink-Amid-Linker (0.3 M (Iris Biotech, Markredwitz) in DMF aktiviert mit 1,1 equiv. 2-Ethoxy-1-Ethoxycarbonyl-1,2-Dihydroquinolin (EEDQ; Sigma-Aldrich, Steinheim) eingebaut (Vierfachkopplung, jeweils 15 min Reaktionszeit) und anschließend wurden die Peptide nach Standardprotokoll synthetisiert. Nach der letzten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF über 20 min und weiteren Waschschritten mit DMF (5 x 3 min), EtOH (2 x 3 min) und Ether (1 x 3 min) wurden die Analysespots ausgestanzt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Peptidabspaltung wurde durch Behandlung mit 60 % TFA, 3 % TIBS und 2 % Wasser in DCM über 2,5 Stunden durchgeführt. Die Cellulose-Spots wurden aus der Peptidlösung entfernt und die Lösung in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac, SPD 111V, H.Saur, Reutlingen) verdampft. Die Peptide wurden anschließend mit einer Lösung aus 90 % TFA, 3 % TIBS und 2 % Wasser in DCM für eine Stunde inkubiert und die Lösung erneut im Vakuumkonzentrator verdampft. Die verbliebenen TFA-Salze wurden durch azeotrope Destillation mit Wasser entfernt und die Peptide mit 100 µl Acetonitril/Wasser (1 : 1, v/v) gelöst.

3.4.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung der Peptide erfolgte mit einem ESI-TOF-Massenspektrometer (ESI MS, QTOFmicro[®], Micromass). Die berechnete Molekülmasse konnte in allen Fällen bestätigt werden und somit waren die Peptide eindeutig zu identifizieren.

3.4.3 HPLC

Die hergestellten Analysepeptide wurden mittels Reversed-Phase HPLC auf ihren Reinheitsgrad untersucht. Es wurden ein linearer Gradient von 5 % bis 60 % Acetonitril/0,05 % TFA gegen Wasser/0,05 % TFA in 30 min und eine RP-18 Säule (Vydac C 18, 250 x 4,6 mm, Hesperia, CA, USA) bei einer Flussrate von 1,2 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214 nm.

3.5 Optimierung des Inkubationsprotokolls

Die Peptidarrays wurden zunächst in EtOH (1 x 10 min) und 1fach-TBS (3 x 10 min; Tris-buffered saline; 10-fach TBS bestehend aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 50 mM TRIS, pH 8,0; vor Verwendung 1:10 mit Wasser verdünnt) gewaschen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt (BBoT: 10 x Blockpuffer Konzentrat (Sigma-Genosys, B 6429) 1 : 10 verdünnt in TBS mit 5 % (w/v) Saccharose). Anschließend wurden die Membranen mit Patientenserum (1 : 5 in BBoT) über Nacht bei 4 °C inkubiert, mit TBS (3 x 10 min) gewaschen und mit dem HRP-markierten anti-human-IgE-Antikörper (spezifisch für die ε-Kette, A 9667, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (1 : 5000 verdünnt mit BBoT). Die Signaldetektion erfolgte mit dem Uptilight HRP Chemilumineszenz-Substrat (Uptima, Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich) durch Entstehung von Lichtsignalen bei der chemischen Reaktion von Peroxidase mit H₂O₂ und Luminol. Die Signalintensitäten wurden als BLU (Boehringer Light Units) am LumiImager™ (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) mithilfe der LumiAnalyst Software gemessen.

Zur Etablierung eines optimalen Protokolls zur Durchführung der Inkubationen, wurden verschiedene Antikörper, Blockierungsreagenzien und Inkubationsparameter untersucht. Für die Blockierungsversuche wurden folgende Puffer untersucht:

- I. BBoT: Blockpuffer-Konzentrat (10x; Sigma-Genosys, B 6429) 1 : 10 verdünnt in TBS (pH 8,0) mit 5 % (w/v) Saccharose
- II. Roti®-ImmunoBlock (Blockpuffer-Konzentrat (10x) auf Polymerbasis ohne Detergenzien (Carl Roth, Karlsruhe) 1 : 10 verdünnt in TBS (pH 8,0)
- III. Milchpulver ((2,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (pH 8,0), versetzt mit 0,05 % (v/v) Tween 20 und 5 % (w/v) Saccharose
- IV. BSA-Blockpuffer (5 % (w/v) BSA (A 2153, Sigma-Aldrich, Steinheim) in TBS (pH 8,0) versetzt mit 0,05 % (v/v) Tween 20)
- V. Tween 20 Puffer (TBS (pH 8,0) versetzt mit 0,2 % (v/v) Tween 20 (zur Membranblockierung) oder versetzt mit 0,05 % (v/v) Tween 20 (zur Antikörperinkubation).

Die Blockierungsversuche wurden für zwei Stunden bei RT oder für 16 Stunden bei 4 °C durchgeführt.

Zur Untersuchung des am besten geeigneten Detektionssystems wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- I. zwei verschiedene polyklonale, direkt mit HRP-markierte anti-human IgE-Antikörper, beide spezifisch gegen die ϵ -Kette des IgE (P 0295; Dako, Glostrup, Dänemark, Verdünnung 1 : 500 und A 9667, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Verdünnung 1 : 5000)
- II. monoklonaler, unmarkierter Maus-anti-human IgE Antikörper (I 6510, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Verdünnung 1 : 5000) als Erstantikörper, der vom HRP-markierten anti-Maus IgG Antikörper (A 5906, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Verdünnung 1 : 1000) gebunden wird
- III. biotinylierter anti-human IgE Antikörper, spezifisch gegen die ϵ -Kette des IgE (BA-3040, Vector laboratories, Burlingame, USA, Verdünnung 1 : 100), der vom HRP-markierten Streptavidin (S 5512, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Verdünnung 1 : 1000) gebunden wird

Grundsätzlich wurden alle Peptidarrays (als Vorversuch) zu Beginn der Inkubationsstudien im geblockten und ungeblockten Zustand mit den Detektionsantikörpern inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Detektionsantikörper zu den Peptiden zu ermitteln. Zusätzlich wurden die Peptidarrays geblockt und ungeblockt mit freiem HRP (100 μ g/ml) und Streptavidin-markiertem HRP (Verdünnung 1 : 1000) inkubiert, um eine direkte Wechselwirkung der Peroxidase mit den Peptiden auszuschließen. Damit sollten Interpretationsschwierigkeiten bei den späteren Inkubationen mit Patientenseren vermieden werden.

Anschließend wurden die Inkubationsversuche mit den Seren von Haselnuss- und Sellerieallergikern und zum Vergleich mit Seren von gesunden Probanden durchgeführt.

Die Serum-Inkubationen wurden mit verschiedenen Serumverdünnungen (1 : 1, 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20), verschiedenen Inkubationszeiten (1 Stunde, 2 Stunden und über Nacht) sowie mit unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur, 4 °C und 37 °C) vorgenommen.

3.6 Messung der Signalintensitäten

Die Messung der Signalintensitäten (SI) wurde mithilfe der LumiAnalyst Software, Version 3.1 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) durchgeführt. Das Spot-Signal wurde als Kreis um den Mittelpunkt jedes Peptid-Spots gemessen und quantitativ als BLU wiedergegeben. Um eine gleichmäßige Messung der SI zu erzielen, wurde die lokale Hintergrund-Korrektur (Einstellung in der Software, bei der die lokale Hintergrundschwärzung jedes Spots herausgerechnet wird) verwendet. Trotz Einsatz der Hintergrundkorrektur kam es bei Inkubation mit identischen Replikaten auf verschiedenen Membranen zu Schwankungen der absoluten SI, bei gleich bleibender Erkennung der Peptide (relative SI blieb konstant). Somit war es unumgänglich, die Signale zu vereinheitlichen, um den Vergleich zwischen verschiedenen Membranen zu ermöglichen. Dafür wurden zunächst die Signale nach der folgenden Gleichung genormt [77]:

$$SI^{\text{norm}} = \frac{SI^{\text{gemessen}} - SI^{\text{min}}}{SI^{\text{max}} - SI^{\text{min}}}$$

Ein Spot-Signal (IgE-Bindung) wurde als positiv definiert, wenn die genormte SI (SI^{norm}) höher war als der Cut-off-Wert der entsprechenden Membran. Zur Berechnung des Cut-off-Wertes wurden die SIs aller Spots der Membran verwendet und in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Cut-off-Wert} = \frac{SI^{\text{Durchschnitt}} - SI^{\text{min}}}{SI^{\text{max}} - SI^{\text{min}}}$$

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Alle Signifikanztests wurden 2-seitig berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Haselnuss und Sellerieallergikern

Insgesamt wurden für diese Arbeit 66 Probanden im Alter von 18 bis 50 Jahren rekrutiert. 33 Probanden gaben anamnestisch eine Nahrungsmittelallergie gegenüber Sellerie und/oder Haselnuss an. 33 Probanden wurden als gesunde Kontrollgruppe rekrutiert. Abbildung 7 zeigt die Verteilung der Probanden bei den klinischen Testungen.

4.1.1 Häufigkeit von Pollensensibilisierungen bei Sellerie- und Haselnussallergikern

Wie in Abbildung 7 dargestellt, findet sich eine hohe Rate von Sensibilisierungen bei den gesunden Probanden. Neun von 30 rekrutierten Probanden (30 %) zeigten mindestens eine positive Reaktion im SPT gegenüber den getesteten Allergenen. Davon waren acht Probanden gegenüber Inhalationsallergenen (Birken-, Beifuß-, Gräserpollen und Derm. pteronyssinus) und ein Proband gegenüber Haselnuss sensibilisiert.

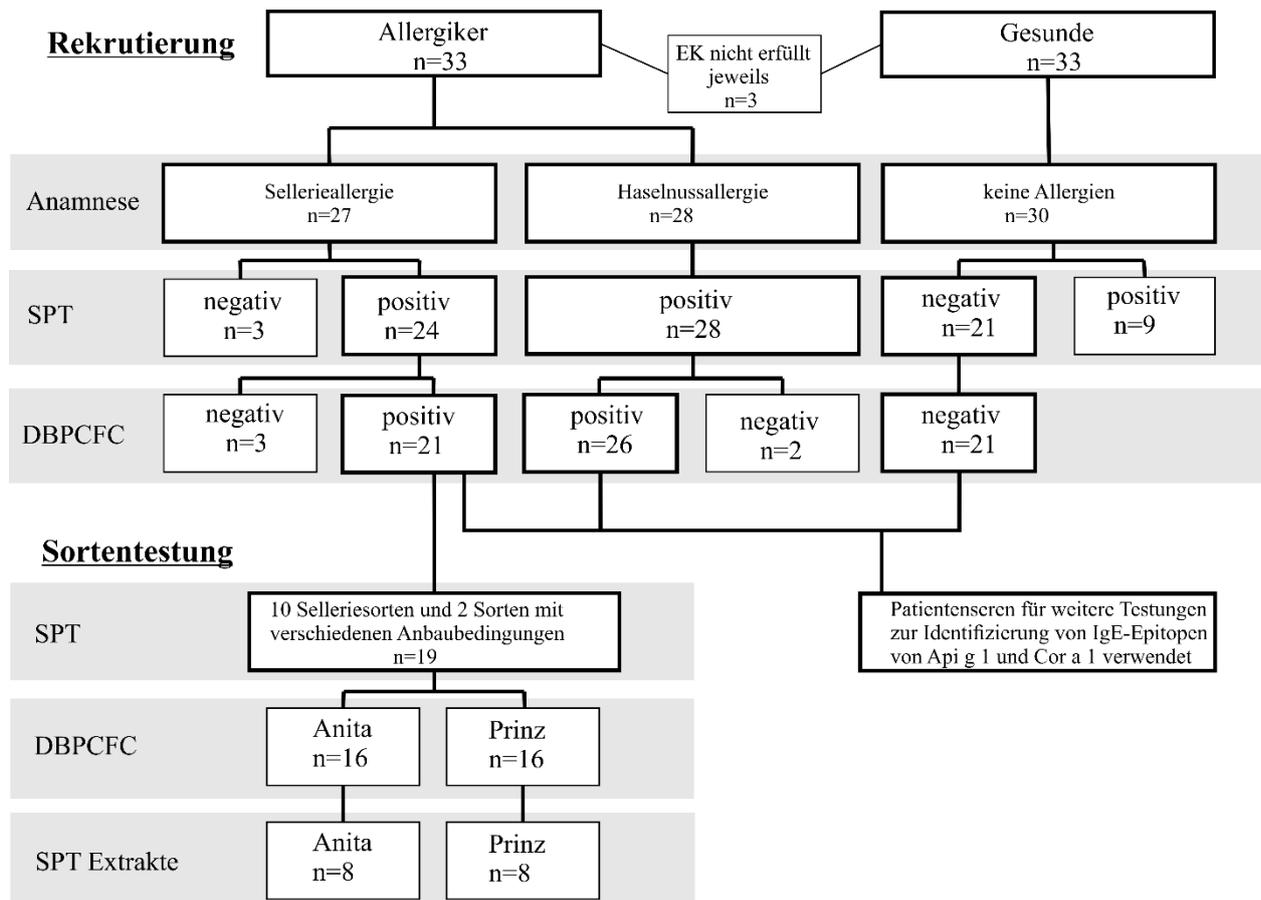


Abbildung 7: Darstellung der durchgeführten klinischen Testungen von dem untersuchten Kollektiv

EK – Einschlusskriterien. SPT – Skin Prick Test. DBPCFC – Doppelblinde placebokontrollierte Nahrungsmittelprovokation. SPT Extrakte – Skin Prick Test mit Proteinextrakten der Selleriesorten. In der Rubrik Sortentestung ist mit „Anita“ die Selleriesorte Anita und mit „Prinz“ die Selleriesorte Prinz gemeint.

Es konnten 26 Haselnuss-Allergiker (19 Frauen, 7 Männer) mittels positivem SPT, Nachweis von allergenspezifischem IgE gegenüber Haselnuss und einer positiven Reaktion im DBPCFC identifiziert werden. Die Einzelergebnisse der 28 getesteten Probanden sind in Tabelle 7 dargestellt. Die 26 allergischen Probanden waren im Median 30 Jahre alt. Elf Probanden hatten eine allergische Rhinitis, drei eine allergische Rhinitis mit allergischem Asthma und acht Probanden wiesen eine allergische Rhinitis mit allergischem Asthma und atopischer Dermatitis auf. Bei zwei von 28 Probanden konnte lediglich eine Sensibilisierung gegenüber Haselnuss (SPT und spezifisches IgE) ohne eine klinische Reaktion in der DBPCFC gefunden werden.

Tabelle 7: Charakterisierung der Haselnussallergiker

Symbol	Alter (Jahre)	Geschlecht	atopisches Profil	SPT - Birke (mm)	SPT - Beifuß (mm)	SPT - Gräser (mm)	SPT - Haselnuss (nativ) (mm)	Gesamt IgE (kU/l)	sIgE Haselnuss (kU/l)	CAP-Klasse sIgE Haselnuss	Haselnussallergie im DBPCFC
SH-17	29	w	-	0	0	0	4	73	0,44	1	ja
SH-22	26	m	-	3	2	0	3	57,3	0,49	1	ja
SH-47	30	m	AD	7	4	7	3	5000	12,8	3	ja
SH-1	24	w	R	9,5	8	7	6	81,6	10,3	3	ja
SH-2	37	w	R	10,5	0	8	5	71,6	3,14	2	ja
SH-3	44	m	R	6	2	0	4	111	12,3	3	ja
SH-5	41	w	R	15	0	12	9	n.d.	3,17	2	nein
SH-6	47	w	R	8	0	6	5	88,5	4,15	3	ja
SH-8	23	w	R	6	0	3	5	22,1	4,98	3	ja
SH-9	37	w	R	6	6	4	5	235	6,28	3	ja
SH-11	20	m	R	5	0	3	6,5	255	13,7	3	ja
SH-18	24	w	R	6	6	0	4	174	2,47	2	nein
SH-19	34	w	R	8	3	9	5	95	2,81	2	ja
SH-25	39	w	R	3	9	0	3	603	0,7	2	ja
SH-27	27	m	R	12,5	12,5	15	10	164	25,3	4	ja
SH-46	25	w	R	9,5	0	8	6	141	18,3	4	ja
SH-23	38	w	R + A	8,5	10,5	5	6	45,6	10,9	3	ja
SH-28	45	w	R + A	15	10	5,5	5,5	343	11,9	3	ja
SH-45	30	w	R + A	12	0	13	13	677	53,8	5	ja
SH-13	38	w	R + AD	11,5	6,5	7,5	3,5	22,4	2,19	2	ja
SH-4	27	w	R + A + AD	8,5	6,5	7	6	1164	92,6	5	ja
SH-7	24	w	R + A + AD	6	6	6	5	547	24,5	4	ja
SH-10	42	w	R + A + AD	10,5	0	0	6,5	1197	45,3	4	ja
SH-12	34	w	R + A + AD	12	0	11	3	305	28,3	4	ja
SH-14	26	m	R + A + AD	7	11	7	7,5	5108	41,6	4	ja
SH-15	45	w	R + A + AD	7	0	7	5,5	454	19,3	4	ja
SH-21	26	m	R + A + AD	9,5	3	13	6	260	61,8	5	ja
SH-29	18	w	R + A + AD	9	8	8,5	4	909	7,78	3	ja
Mittelwert*	32	21/7		8,10	4,15	6,17	5,46	693,47	19,83	3,19	
Median*	30	(w/m)		8,25	3,00	7,00	5,00	245,00	12,10	3,00	
[min - max]*				[0 - 15]	[0 - 12,5]	[0 - 15]	[3 - 13]	[22,1 - 5108]	[0,44 - 92,6]	[0 - 5]	

* Werte beziehen sich auf 26 Haselnussallergiker mit positiver Reaktion im DBPCFC. SPT – Skin Prick Test, A – allergisches Asthma, R – allergische Rhinitis, AD – atopische Dermatitis, sIgE – spezifisches Immunglobulin E

Weiterhin konnten 21 Sellerie-Allergiker (15 Frauen, 6 Männer) identifiziert werden. Die Einzelergebnisse der 27 dafür getesteten Probanden sind in Tabelle 8 dargestellt. Durch die Überschneidung der Gruppe Haselnussallergiker mit der Gruppe der Sellerieallergiker (Probanden mit gleichzeitiger Allergie gegen beide Nahrungsmittel) waren die Probanden im

Median ebenfalls 30 Jahre alt. Zehn von 21 Probanden hatten eine allergische Rhinitis, drei eine allergische Rhinitis mit allergischem Asthma und sieben Probanden zeigten eine allergische Rhinitis mit allergischem Asthma und atopischer Dermatitis.

Hier wurde bei vier von 27 getesteten Probanden eine Sensibilisierung ohne klinische Relevanz festgestellt. Bei zwei weiteren Probanden konnte die anamnestische Angabe der Sellerieallergie mit keinem der drei Tests (SPT, sIgE, DBPCFC) bestätigt werden.

Tabelle 8: Charakterisierung der Sellerieallergiker

Symbol	Alter (Jahre)	Geschlecht	atopisches Profil	SPT - Birke (mm)	SPT - Beifuß (mm)	SPT - Gräser (mm)	SPT - Sellerie (nativ) (mm)	Gesamt IgE (kU/l)	sIgE Sellerie (kU/l)	CAP-Klasse sIgE Sellerie	Sellerieallergie im DBPCFC
SH-17	29	w	-	0	0	0	3	73	0,32	0	nein
SH-5	41	w	R	15	0	12	3	-	0,63	1	nein
SH-6	47	w	R	8	0	6	4	88,5	0	0	nein
SH-18	24	w	R	6	6	0	0	174	0,45	1	nein
SH-19	34	w	R	8	3	9	0	95	0,11	0	nein
SH-13	38	w	R + AD	11,5	6,5	7,5	0	22,4	0,03	0	nein
SH-47	30	m	AD	7	4	7	5	5000	15,1	3	ja
SH-1	24	w	R	9,5	8	7	6	81,6	0,96	2	ja
SH-2	37	w	R	10,5	0	8	3	71,6	0,53	1	ja
SH-3	44	m	R	6	2	0	5	111	0,7	2	ja
SH-8	23	w	R	6	0	3	4,5	22,1	0,46	1	ja
SH-9	37	w	R	6	6	4	3	235	1,18	2	ja
SH-11	20	m	R	5	0	3	9,5	255	3,09	2	ja
SH-24	49	w	R	9	9	5,5	12	140	4,22	3	ja
SH-25	39	w	R	3	9	0	7	603	0,78	2	ja
SH-27	27	m	R	12,5	12,5	15	7	164	1,47	2	ja
SH-46	25	w	R	9,5	0	8	5	141	1,84	2	ja
SH-23	38	w	R + A	8,5	10,5	5	9	45,6	0,27	0	ja
SH-28	45	w	R + A	15	10	5,5	3,5	343	0,61	1	ja
SH-45	30	w	R + A	12	0	13	13,5	677	11,3	3	ja
SH-4	27	w	R + A + AD	8,5	6,5	7	5	1164	5,69	3	ja
SH-7	24	w	R + A + AD	6	6	6	5	547	3,85	3	ja
SH-10	42	w	R + A + AD	10,5	0	0	6,5	1197	4,9	3	ja
SH-12	34	w	R + A + AD	12	0	11	5	305	3,09	2	ja
SH-14	26	m	R + A + AD	7	11	7	5	5108	3,81	3	ja
SH-15	45	w	R + A + AD	7	0	7	15	454	8,39	3	ja
SH-21	26	m	R + A + AD	10	3	13	11,5	260	5,62	3	ja
Mittelwert*	33	15/6		8,57	4,64	6,43	6,95	805,95	3,71	2	
Median*	30	(w/m)		9	4	7	5	260	3	2	
[min - max]*	[20 - 49]			[3 - 15]	[0 - 12,5]	[0 - 15]	[3 - 15]	[22,1 - 5108]	[0,27 - 15,1]	[0 - 3]	

* Werte beziehen sich auf 21 Sellerieallergiker mit positiver Reaktion im DBPCFC. SPT – Skin Prick Test, A – allergisches Asthma, R – allergische Rhinitis, AD – atopische Dermatitis, sIgE – spezifisches Immunglobulin E

96 % (25/26) der Haselnussallergiker wiesen eine Sensibilisierung gegenüber Birkenpollen auf. Eine Co-Sensibilisierung mit Gräserpollen bestand in 81 % (21/26) der Fälle und mit Beifußpollen bei 54 % (14/26).

Dementsprechend, waren die Sellerieallergiker durchgehend (21/21, 100 %) auf Birkenpollen sensibilisiert, gefolgt von Gräser- (18/21, 85,71 %) und Beifußpollen (12/21, 57,14 %).

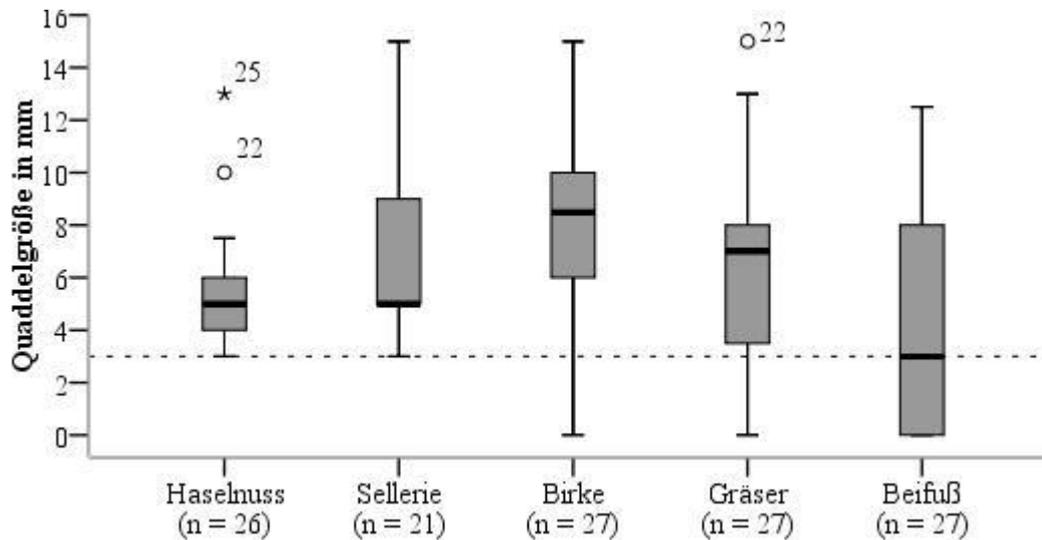


Abbildung 8: Quaddelgrößen im SPT bei Haselnuss- und Sellerieallergikern
 Dargestellt sind insgesamt 27 Probanden, davon 26 mit Haselnuss- und 21 mit Sellerieallergie.

Entsprechend der Reihenfolge der Co-Sensibilisierungen, unterscheiden sich auch die Quaddelgrößen im SPT. In der Abbildung 8 sind die Quaddelgrößen von insgesamt 27 nachgewiesenen Allergikern dargestellt. Die größten Werte fanden sich bei Birke (Median 9 mm), gefolgt von Gräsern (Median 7 mm) und Beifuß (Median 3 mm).

4.1.2 Spezifisches IgE auf Sellerie und Haselnuss

Bei allen Allergikern unserer Stichprobe ließ sich spezifisches IgE (sIgE) gegenüber Haselnuss und Sellerie im Serum nachweisen. Wie in Tabelle 9 dargestellt, lagen die Werte bei Männern sowohl für das Gesamt-IgE als auch für das spezifische IgE höher als bei Frauen. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test: Gesamt-IgE $p = 0,498$, sIgE (Haselnuss) $p = 0,279$, sIgE (Sellerie) $p = 0,424$).

Tabelle 9: Geschlechtsabhängige Verteilung des Gesamt-IgE und spezifischen IgE

	Gesamt-IgE (kU/l)		sIgE (Haselnuss) (kU/l)		sIgE (Sellerie) (kU/l)	
	beide Gruppen (n = 27)		Haselnussallergiker		Sellerieallergiker	
	Männer (n = 7)	Frauen (n = 20)	Männer (n = 7)	Frauen (n = 19)	Männer (n = 6)	Frauen (n = 15)
Mittelwert	1565,04	360,74	24,00	18,30	4,97	3,20
Median	255,00	188,00	13,70	10,30	3,45	1,84
Min	57,30	22,10	0,49	0,44	0,70	0,27
Max	5108,00	1197,00	61,80	92,60	15,10	11,30

Die Anzahl der Begleiterkrankungen aus dem atopischen Formenkreis ist mit den IgE-Werten im Serum assoziiert (Tabelle 10). Auffällig ist eine positive Korrelation des Gesamt-IgE und spezifischen IgE auf Haselnuss und Sellerie mit dem atopischen Profil der Probanden. Die niedrigsten Werte finden sich bei Probanden ohne zusätzliche Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Mit steigendem Vorhandensein atopischer Erkrankungen nehmen die Werte zu. Die höchsten Werte zeigen sich bei Probanden, wenn sie sowohl an allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis als auch allergischem Asthma leiden.

Tabelle 10: Verteilung der IgE-Werte nach dem atopischen Profil

	Mittelwert [min - max]	atopisches Profil				Kontroll- gruppe
		Ø	R	R + A	R + A + AD	
		Mittelwert				
Gesamt-IgE* (kU/l)	672,97 [22,1 - 5108,0]	65,15	167,32	355,20	1243,00	23.1
sIgE (Haselnuss) [#] (kU/l)	19,83 [0,44 - 92,6]	0,47	9,27	25,53	40,14	n.d
sIgE (Sellerie) [†] (kU/l)	3,71 [0,27 - 15,10]	-	1,52	4,06	5,05	n.d.

Ø Keine allergische Rhinitis, Asthma oder atopische Dermatitis. R allergische Rhinitis. A allergisches Asthma. AD atopische Dermatitis. *Beide Gruppen (n = 27). # nur Haselnussallergiker (n = 26). † Nur Sellerieallergiker (n = 21). Zwei Probanden konnten nicht eingeteilt werden: Ein Proband hat nur AD, Gesamt-IgE 5000 kU/l, sIgE gegen Haselnuss 12,8 kU/l, sIgE gegen Sellerie 15,01 kU/l. Ein Proband hat AD und R, Gesamt-IgE 22,4 kU/l, sIgE gegen Haselnuss 2,19 kU/l und sIgE gegen Sellerie 0,03 kU/l.

4.1.3 DBPCFC und Symptomenscore

Um die klinischen Symptome während der DBPCFC besser zu erfassen, wurde ein Symptomenscore bestehend aus subjektiven und objektiven Symptomen entwickelt, wie bereits von Dölle et al. beschrieben (siehe Methoden). Die Einzelwerte der 28 getesteten Haselnuss-Probanden sind in Tabelle 11 und die Einzelwerte der getesteten 27 Sellerie-Probanden in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Symptome und Score der Haselnussallergiker

Symbol	Geschlecht	atopisches Profil	Objektive Symptome im DBPCFC	Objektiver Symptomenscore (Osc)	Subjektive Symptome im DBPCFC	Subjektiver Symptomenscore (SSc)	Endbewertung = Osc+(SSc/2)	Summenscore	Haselnussallergie im DBPCFC
SH-17	w	-	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-22	m	-	SH, H(3)	6	JR(sh)	1	6,5	3	ja
SH-47	m	AD	-	0	JR(sh)	1	0,5	1	ja
SH-1	w	R	SH, R, N	4	JR(sh), HG	2	5	3	ja
SH-2	w	R	-	0	JR(sh)	1	0,5	1	ja
SH-3	m	R	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-5	w	R	-	0	-	0	0	0	nein
SH-6	w	R	SH	2	-	0	2	2	ja
SH-8	w	R	SH	2	JR(sh), Ü	2	3	2	ja
SH-9	w	R	SH	2	JR(sh), Ü, HG	3	3,5	2	ja
SH-11	m	R	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-18	w	R	-	0	-	0	0	0	nein
SH-19	w	R	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-25	w	R	-	0	Ü, BSm, SB	3	1,5	1	ja
SH-27	m	R	SH, GIT (1)	4	JR(sh), Ü	2	5	3	ja
SH-46	w	R	SH, GIT(1), H(3)	8	JR(sh), Ü, SB, rAZ	4	10	4	ja
SH-23	w	R + A	SH, KV(1)(2)	7	JR(sh), Sw, rAZ, HG	4	9	4	ja
SH-28	w	R + A	SH, H(3)	6	JR(sh), BSm, HG, E	4	8	4	ja
SH-45	w	R + A	SH, H(3)	6	JR(sh), HG	2	7	3	ja
SH-13	w	R + AD	SH, K, H(5)	7	JR(h), JR(sh), rAZ, E	4	9	4	ja
SH-4	w	R + A + AD	SH, KV(2)	5	JR(sh), Sw, rAZ	3	6,5	3	ja
SH-7	w	R + A + AD	SH, H(3)	6	JR(sh), rAZ	2	7	3	ja
SH-10	w	R + A + AD	SH, H (3)(4)	8	JR(h), JR(sh), Ü	3	9,5	4	ja
SH-12	w	R + A + AD	-	0	JR(sh)	1	0,5	1	ja
SH-14	m	R + A + AD	SH, R, H(3)	8	JR(sh), HG	2	9	4	ja
SH-15	w	R + A + AD	SH, GIT (1), H(3)(6)	12	JR(h), JR(sh), Ü, SB	4	14	4	ja
SH-21	m	R + A + AD	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-29	w	R + A + AD	H(1)	2	JR(h), JR(sh)	2	3	2	ja
21/7 (w/m)			Mittelwert*	4,04		2,12	5,10	2,62	
			Median*	3		2	4,25	2,5	
			[min - max]*	[0 - 12]		[0 - 4]	[0,5 - 14]	[1 - 4]	

* Werte beziehen sich auf 26 Probanden mit positiver Reaktion im DBPCFC (SH-5 und SH-18 wurden ausgeschlossen). A – allergisches Asthma, R – allergische Rhinitis, AD – atopische Dermatitis. Objektive Symptome: H – Symptome an der Haut: Erythem (1), Urtikaria (2), Angioödem (3), SCORAD-Anstieg um zehn Punkte (4), SCORAD-Anstieg um 15 Punkte (5), SCORAD-Anstieg um 20 Punkte (6). SH – Symptome an der Schleimhaut wie Erythem, Papeln, Vesikel. K – Konjunktivitis. R – Rhinitis. N – Niesen. GIT – Gastrointestinale Symptome: Durchfall (1). KV – Kardiovaskuläre Symptome: Änderung des Blutdrucks um > 20 mmHg (1), Blässe, Kaltschweißigkeit, Kreislaufzentralisierung (kalte Extremitäten)(2). Subjektive Symptome: JR(h) – Juckreiz der Haut. JR(sh) – Juckreiz, Brennen, Kribbeln, Taubheit, pelziges Gefühl an der Schleimhaut. Ü – Übelkeit, Brechreiz, flaves Gefühl. BSm – Bauchschmerzen. SB – Sodbrennen, Blähbauch. KS – Kopfschmerzen. Sw – Schwindel, Flush. rAZ – leicht reduzierter Allgemeinzustand, Abgeschlagenheit, Müdigkeit. HG – Hustenreiz, Heiserkeit, Globusgefühl. E – Engegefühl in der Brust.

Tabelle 12: Symptome und Score der Sellerieallergiker

Symbol	Geschlecht	atopisches Profil	Objektive Symptome im DBPCFC	Objektiver Symptomenscore (Osc)	Subjektive Symptome im DBPCFC	Subjektiver Symptomenscore (SSc)	Endbewertung = Osc+(SSc/2)	Summenscore	Sellerieallergie im DBPCFC
SH-17	w	-	-	0	-	0	0	0	nein
SH-5	w	R	-	0	-	0	0	0	nein
SH-6	w	R	-	0	-	0	0	0	nein
SH-18	w	R	-	0	-	0	0	0	nein
SH-19	w	R	-	0	-	0	0	0	nein
SH-13	w	R + AD	-	0	-	0	0	0	nein
SH-47	m	AD	SH,	2	JR(sh), SB, Sw	3	3,5	2	ja
SH-1	w	R	SH, H(3)	6	JR(sh), HG	2	7	3	ja
SH-2	w	R	-	0	JR(sh)	1	0,5	1	ja
SH-3	m	R	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-8	w	R	SH	2	JR(sh), Ü	2	3	2	ja
SH-9	w	R	-	0	JR(sh)	1	0,5	1	ja
SH-11	m	R	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
SH-24	w	R	SH, R, N	4	JR(sh), Ü, BSm, Sw, rAZ	5	6,5	3	ja
SH-25	w	R	SH, R, K	6	JR(sh), JR(h), SB	3	7,5	4	ja
SH-27	m	R	SH, GIT(1)	4	JR(sh), Ü	2	5	3	ja
SH-46	w	R	SH	2	JR(sh), BSm, SB, rAZ, HG	5	4,5	3	ja
SH-23	w	R + A	SH	2	JR(sh), rAZ	2	3	2	ja
SH-28	w	R + A	SH, H(3), GIT(1)	8	JR(sh), Ü, BSm, Sw, rAZ, E	6	11	4	ja
SH-45	w	R + A	SH	2	JR(sh), Ü, BSm, Sw, rAZ	5	4,5	3	ja
SH-4	w	R + A + AD	SH, H(3), GIT(1)	8	JR(sh)	1	8,5	4	ja
SH-7	w	R + A + AD	SH, H(3), R	8	JR(sh), HG	2	9	4	ja
SH-10	w	R + A + AD	SH, H(3)(4), KV(1)	11	JR(sh), Ü, BSm, Sw	4	13	4	ja
SH-12	w	R + A + AD	SH	2	-	0	2	2	ja
SH-14	m	R + A + AD	SH, H(4)	4	JR(sh)	1	4,5	3	ja
SH-15	w	R + A + AD	SH, H(3)	6	JR(sh), SB	2	7	3	ja
SH-21	m	R + A + AD	SH	2	JR(sh)	1	2,5	2	ja
21/6 (w/m)			Mittelwert*	3,95		2,38	5,14	2,71	
			Median*	2,00		2,00	4,50	3,00	
			[min - max]*	[0 - 11]		[0 - 6]	[0,5 - 13]	[1 - 4]	

* Werte beziehen sich auf 21 Probanden mit positiver Reaktion im DBPCFC (SH-5, SH-6, SH-13, SH-17, SH-18 und SH-19 wurden ausgeschlossen). A – allergisches Asthma, R – allergische Rhinitis, AD – atopische Dermatitis. Objektive Symptome: H – Symptome an der Haut: Erythem (1), Urtikaria (2), Angioödem (3), SCORAD-Anstieg um zehn Punkte (4). SH – Symptome an der Schleimhaut wie Erythem, Papeln, Vesikel. K – Konjunktivitis. R – Rhinitis. N – Niesen. GIT – Gastrointestinale Symptome: Durchfall (1). KV – Kardiovaskuläre Symptome: Änderung des Blutdrucks um > 20 mmHg (1). Subjektive Symptome: JR(h) – Juckreiz der Haut. JR(sh) – Juckreiz, Brennen, Kribbeln, Taubheit, pelziges Gefühl an der Schleimhaut. Ü – Übelkeit, Brechreiz, flaves Gefühl. BSm – Bauchschmerzen. SB – Sodbrennen, Blähbauch. Sw – Schwindel, Flush. rAZ – leicht reduzierter Allgemeinzustand, Abgeschlagenheit, Müdigkeit. HG – Hustenreiz, Heiserkeit, Globusgefühl. E – Engegefühl in der Brust.

Bei den Haselnussallergikern lagen die Werte des objektiven Symptomenscores im Median bei drei Punkten und bei den Sellerieallergikern bei zwei Punkten. Der subjektive Symptomenscore

war bei beiden Allergikergruppen mit zwei Punkten gleich. Im Gesamtscore unterschieden sich die Haselnussallergiker mit 4,25 Punkten nur wenig von den Sellerieallergikern mit 4,5 Punkten. In beiden Gruppen traten subjektive Symptome deutlich häufiger als objektive auf.

Innerhalb des Gesamtscores finden sich Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Der Mittelwert liegt bei den Männern (Haselnussallergiker (n = 7) bei 4,07 Punkten; bei den Sellerieallergikern (n = 6) bei 3,42 Punkten) niedriger als bei Frauen (Haselnussallergiker (n = 19) mit 5,47 Punkten; bei Sellerieallergikern (n = 15) bei 5,83 Punkten, dies ist aber statistisch nicht signifikant (Haselnussallergiker $p = 0,395$; Sellerieallergiker $p = 0,178$, Mann-Whitney-U-Test).

Anders sieht es aus, wenn nach der Qualität der Symptome differenziert wird. Bei den objektivierbaren Symptomen (OSc) finden sich bei den Haselnussallergikern nur geringe Unterschiede zwischen Männern und Frauen, wobei Frauen durchschnittlich höhere Werte aufweisen ($p = 0,651$). Bei den subjektiven Symptomen (SSc) jedoch haben Frauen doppelt so hohe Werte (Mittelwerte: Männer 1,28 Punkte, Frauen 2,42 Punkte) und diese Unterschiede sind hoch signifikant ($p = 0,035$).

Bei den Sellerieallergikern haben Frauen sowohl bei objektiven als auch bei den subjektiven Symptomen höhere Werte (OSc-Mittelwerte: Männer 2,66 Punkte, Frauen 4,46 Punkte, $p = 0,381$; SSc-Mittelwerte: Männer 1,5 Punkte, Frauen 2,73 Punkte, $p = 0,154$) ohne statistische Signifikanz.

Unterteilt nach Organsystemen, dominieren innerhalb der objektiven Symptome zunächst die Symptome des Oro- und Nasopharynx und der Haut, gefolgt von gastrointestinalen und pulmonalen Symptomen, entsprechend der Kontaktreihenfolge der Grenzflächen des menschlichen Körpers mit dem Allergen.

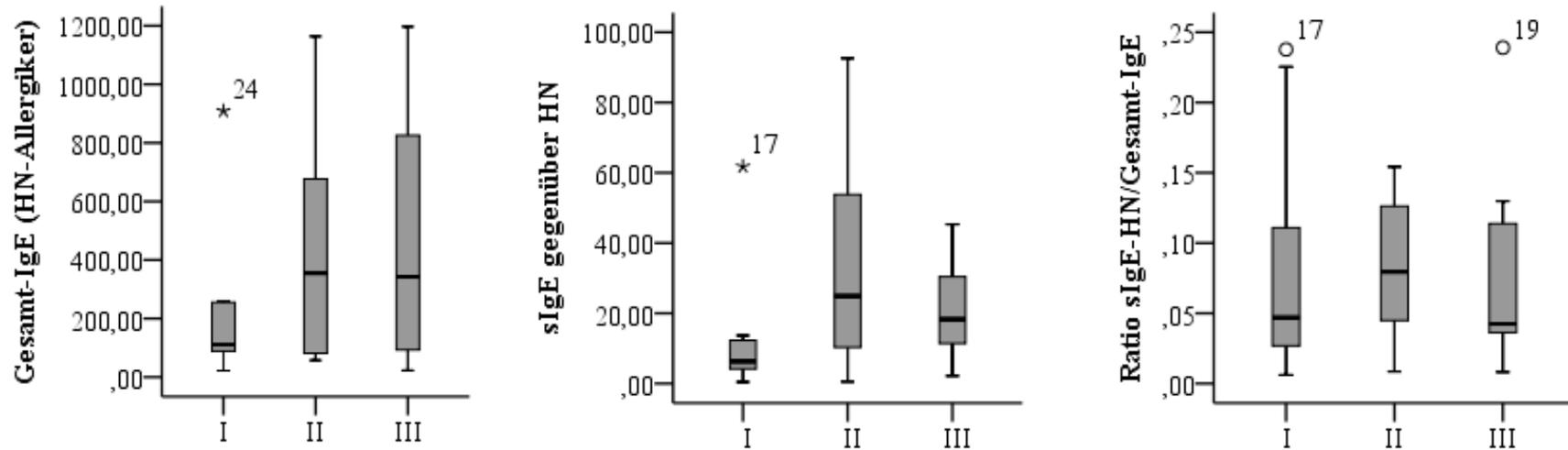
Die Mehrzahl unserer Probanden entwickelte milde bis moderat ausgeprägte Symptome (Tabelle 13), da Probanden mit schweren lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen bereits im Vorfeld von der Testung ausgeschlossen wurden (siehe Ausschlusskriterien im Methodenteil).

Tabelle 13: Verteilung der Schweregrade der allergischen Reaktion

Reaktionsstärke im DBPCFC	Haselnussallergiker	Sellerieallergiker
	(n = 26)	(n = 21)
	Anzahl	
fragliche Relevanz	4	2
Schweregrad I.	9	7
Schweregrad II.	6	7
Schweregrad III.	7	5

Wie bereits in der Literatur beschrieben, ist die Vorhersagekraft der Hauttestbefunde und der spezifischen IgE-Werte (sIgE) hinsichtlich der Schwere der allergischen Reaktion begrenzt [65]. In unserer Stichprobe korrelierte die Größe der Quaddel im SPT mit der Höhe des spezifischen IgE im Serum (Korrelation nach Pearson, Haselnuss $p = 0,021$, Sellerie $p = 0,049$). Die Patienten mit einer schweren Reaktion im DBPCFC mit Haselnuss oder Sellerie hatten auch tendenziell höhere sIgE-Werte (Abbildung 9). Das haselnusspezifische IgE lag bei Schweregrad II und III (Median 24,9 IU/ml und 18,3 IU/ml) deutlich höher als bei Schweregrad I (Median 6,28 IU/ml). Das selleriespezifische IgE lag ebenfalls bei Schweregrad II und III (Median 3,81 IU/ml und 3,85 IU/ml) höher als bei Schweregrad I (Median 3,09 IU/ml). Es konnte jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Höhe des sIgE und der Schwere der allergischen Reaktion ermittelt werden. Die Quaddelgrößen im SPT mit Haselnuss und Sellerie korrelierten ebenfalls nicht mit der Schwere der Symptomatik. Im Gegensatz zum spezifischen IgE korrelierte die Höhe des Gesamt-IgE mit dem Schweregrad der allergischen Reaktion. Bei Haselnussallergikern nahm mit der Höhe des Gesamt-IgE der Schweregrad signifikant zu (Abbildung 9 A; Korrelation nach Pearson $p = 0,007$). Bei Sellerieallergikern zeichnete sich ein ähnlicher Trend ab (Abbildung 9 B), jedoch ohne statistische Signifikanz (Korrelation nach Pearson $p = 0,075$). Die Rate des spezifischen IgE gemessen am Gesamt-IgE war bei Haselnuss- und Sellerieallergikern in den Gruppen mit Schweregrad II höher als in den Gruppen mit Schweregrad I. Dagegen zeigten Allergiker mit Reaktionen vom Schweregrad III die niedrigste sIgE/Gesamt-IgE-Ratio, bedingt durch das hohe Gesamt-IgE in diesen Gruppen.

A)



B)

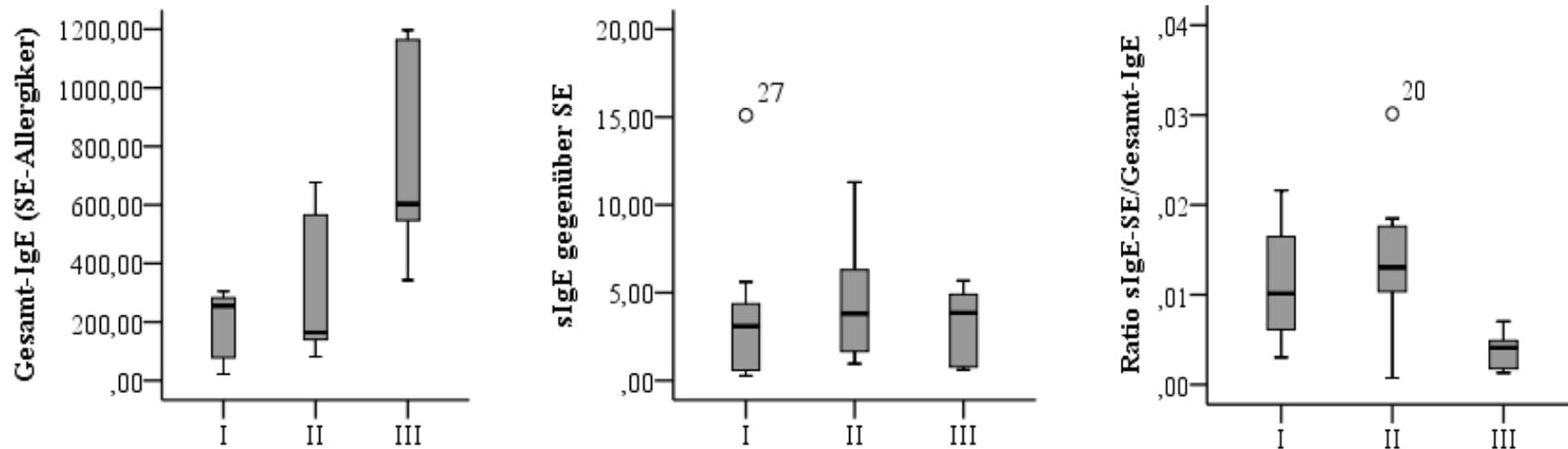


Abbildung 9: Gesamt- und sIgE im Vergleich zum Schweregrad der allergischen Reaktion

Dargestellt ist die Höhe des Gesamt- und spezifischen IgE (sIgE) gegenüber Haselnuss (A) und Sellerie (B) jeweils in IU/ml sowie das relative Verhältnis von sIgE zu Gesamt-IgE, unterteilt nach dem Schweregrad der allergischen Reaktion (Schweregrade I bis III) im Summenscore bei DBPCFC mit Haselnuss (A) und Sellerie (B). HN – Haselnuss. SE – Sellerie.

4.2 Charakterisierung von Sortenart und Anbaubedingungen von Knollensellerie

4.2.1 Hauttest – Ergebnisse mit verschiedenen Selleriesorten

19 von 21 Sellerieallergikern nahmen am SPT mit zehn verschiedenen Selleriesorten teil. Folgende Sorten an Knollensellerie wurden untersucht: Anita, Bergers weiße Kugel, Brilliant, Goliath, Ibis, Kojak, Mars, Monarch, Prinz und Rex. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt:

Im Vergleich zum SPT-Wert (Sellerie nativ, Screeningsorte Brilliant) zu Beginn der Studie (Screening) schwankten die Werte der verschiedenen Sorten im Median zwischen 5 und 7 mm. Die niedrigsten Werte im SPT wurden bei der Sorte Anita ermittelt. Diese Unterschiede waren in Bezug zum STP Sellerie (Screening) hoch signifikant ($p = 0,024$, Wilcoxon-Test). Bei den anderen Sorten fanden sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber Sellerie (Screening).

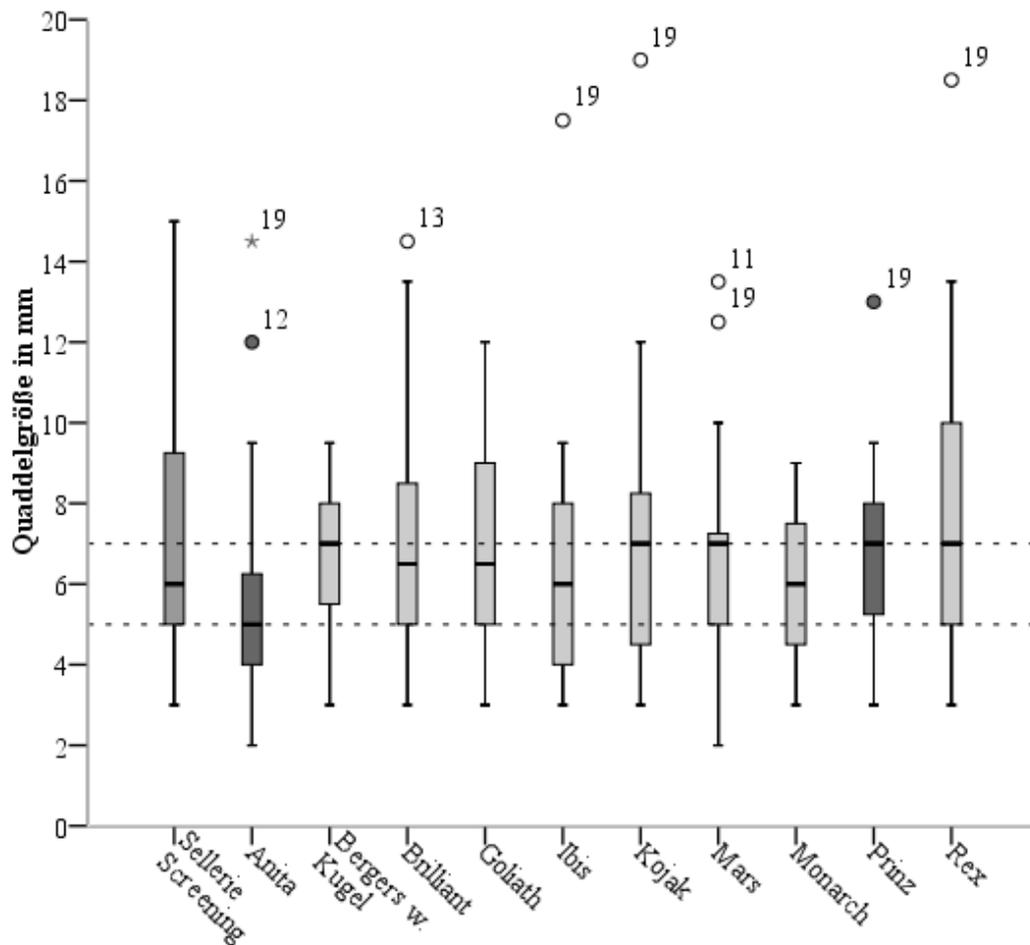


Abbildung 10: SPT-Ergebnisse mit zehn verschiedenen Selleriesorten bei 19 Sellerieallergikern

4.2.2 Hauttest – Ergebnisse bei verschiedenen Anbaubedingungen von Sellerie

Um den Einfluss von Umweltbedingungen auf die Allergenität von Sellerie zu untersuchen, wurden die Sorten Prinz und Monarch unter Trockenstress angebaut und mittels SPT getestet (Abbildung 11). Bei der Sorte Prinz lag die Quaddelgröße im Median bei 7 mm, sowohl bei herkömmlichen Anbaubedingungen als auch bei Trockenstress. Bei der Sorte Monarch stieg der Median unter Trockenstress auf 7 mm, im Vergleich zu 6 mm beim herkömmlichen Anbau. Es fanden sich bei beiden Sorten keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Streubreite der Werte nahm unter Trockenstress zu.

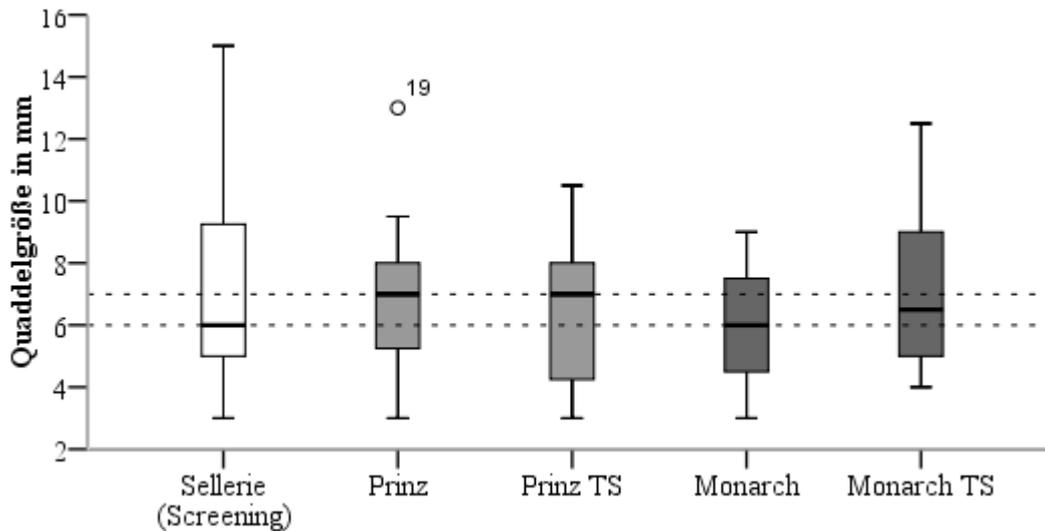


Abbildung 11: SPT-Ergebnisse mit den Sorten Prinz und Monarch unter verschiedenen Anbaubedingungen mit 19 Sellerieallergikern

TS – Anbau der Sorte unter Trockenstress.

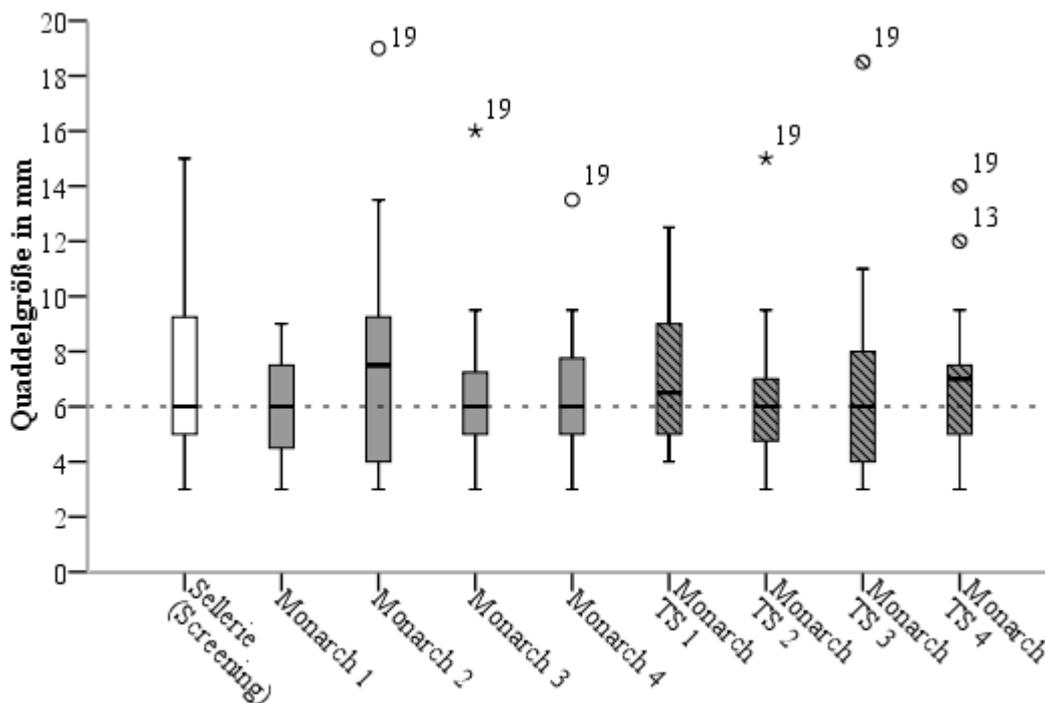


Abbildung 12: SPT-Ergebnisse der Sorte Monarch mit je vier Varianten unter normalen Anbaubedingungen und unter Trockenstress

Dargestellt sind die Ergebnisse von 19 Sellerieallergikern. Mit 1 – 4 sind die verschiedenen Knollen jeder Sorte nummeriert. TS – Anbau der Sorte unter Trockenstress.

Des Weiteren wurde die natürliche biologische Varianz mittels SPT exemplarisch an der Sorte Monarch bei 19 Sellerieallergikern untersucht. Dafür wurden jeweils vier verschiedene Knollen

der Sorte Monarch unter normalen Anbaubedingungen und unter Trockenstress verwendet (Abbildung 12). Im Median lagen die Quaddelgrößen für alle Varianten zwischen 6 und 7 mm. Diese Ergebnisse waren konsistent und reproduzierbar. Jedoch fand sich erneut eine hohe Streubreite, so dass die Vergleichbarkeit der Sorten untereinander als eingeschränkt einzustufen ist.

4.2.3 DBPCFC mit ausgewählten Selleriesorten

Um die klinische Relevanz der mittels SPT ermittelten tendenziellen Unterschiede in den Selleriesorten zu untersuchen, wurden 16 Sellerieallergiker mit zwei Sorten doppelblind placebokontrolliert oral provoziert. Für die orale Provokation wurde die Sorte Anita aufgrund der signifikant niedrigeren Werte im SPT ausgesucht. Auf der anderen Seite wurde die Sorte Prinz aufgrund der (im Median) höheren Werte im SPT und der weiten Verbreitung in der Nahrungsmittelindustrie (Gewürze, Tütensuppen, Fertiggerichte) herangezogen. Der Vergleich der Score- und Prickwerte mit Sellerie (Screening), Anita und Prinz ist in Abbildung 13 dargestellt.

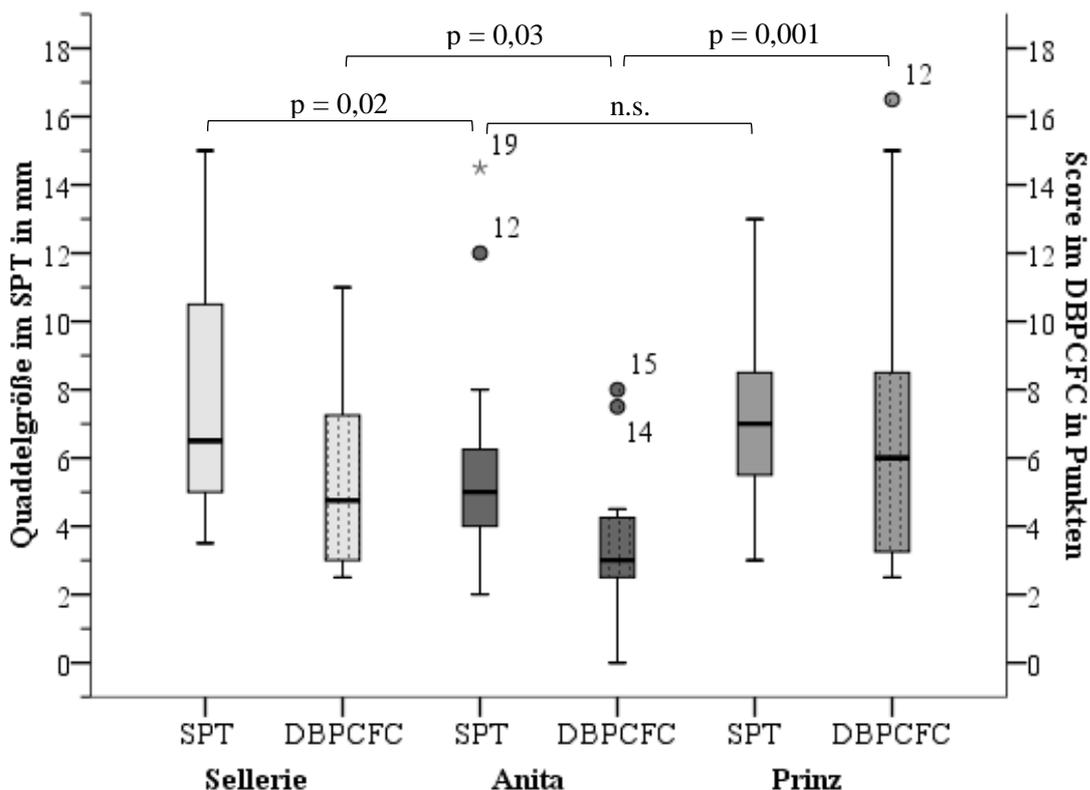


Abbildung 13: Vergleich der Werte im SPT und DBPCFC von drei Selleriesorten

Sowohl im SPT als auch in der DBPCFC löste die Sorte Anita geringer ausgeprägte Reaktionen aus. Im Durchschnitt lag der Score bei der Sorte Anita bei 3,41 Punkten im Vergleich zu 5,41 Punkten bei der Screeningsorte und 7,13 Punkten bei der Sorte Prinz. Die Unterschiede im Gesamtscore von Anita sind sowohl gegenüber Sellerie ($p = 0,031$, Wilcoxon-Test) als auch gegenüber Prinz ($p = 0,001$) hoch signifikant. Die Sorte Prinz löste stärkere Reaktionen im SPT und der DBPCFC aus, aber ohne statistische Signifikanz. Unterteilt nach objektiven und subjektiven Symptomen löst die Sorte Anita signifikant weniger Symptome gegenüber Screening-Selleriesorte Brilliant (OSc $p = 0,048$; SSc $p = 0,018$) und Prinz (OSc $p = 0,003$; SSc $p = 0,002$) aus.

Auch die Einzelwerte unterscheiden sich bei den Sorten Anita und Prinz deutlich im Umfang der subjektiven und objektiven Symptome, wie in Tabelle 14 dargestellt. Intraindividuell sind bei der Sorte Anita deutlich weniger Organsysteme von der allergischen Reaktion betroffen als bei Sellerie (Screening) und bei Prinz.

Tabelle 14: Einzelwerte der klinischen Symptome in der DBPCFC mit drei Selleriesorten

objektive Symptome	Symbol	Sellerie	OSc	Anita	OSc	Prinz	OSc
	SH-1	SH, H(3)	6	-	0	SH	2
	SH-3	SH	2	SH	2	SH, H(3)	6
	SH-4	SH, H(3), GIT(1)	8	SH, KV(1)	4	SH, KV(1)(4)	7
	SH-7	SH, H(3), R	8	SH	2	SH, R, N	4
	SH-8	SH	2	SH	2	SH	2
	SH-11	SH	2	SH	2	SH	2
	SH-15	SH, H(3)	6	SH	2	SH, KV(1), P(1), H(4), M(2)(3)	13
	SH-21	SH	2	SH	2	SH, H(2)(3), M(2)(3)	13
	SH-23	SH	2	SH, H(3)	6	SH, H(3)	6
	SH-24	SH, R, N	4	SH, H(3)	6	SH, H(1)(3), M(2)(3)	13
	SH-25	SH, R, K	6	SH	2	SH, R	4
	SH-27	SH, GIT(1)	4	SH, P(1)	4	SH, GIT(1)	4
	SH-28	SH, H(3), GIT(1)	8	SH	2	SH, R	4
	SH-45	SH	2	SH	2	SH	2
	SH-46	SH	2	SH	2	SH, GIT(1)	4
	SH-47	SH,	2	-	0	SH	2
subjektive Symptome	Symbol	Sellerie	SSc	Anita	SSc	Prinz	SSc
	SH-1	JR(sh), HG	2	-	0	JR(sh)	1
	SH-3	JR(sh)	1	JR(sh)	1	JR(sh)	1
	SH-4	JR(sh)	1	JR(sh)	1	JR(sh), Ü, SB, Sw	4
	SH-7	JR(sh), HG	2	JR(sh)	1	JR(sh), Ü, HG	3
	SH-8	JR(sh), Ü	2	JR(sh), Ü	2	JR(sh), Ü, HG	3
	SH-11	JR(sh)	1	JR(sh)	1	JR(sh)	1
	SH-15	JR(sh), SB	2	JR(sh), SB, BSm	3	JR(sh)(h), Ü, SB, BSm, Sw, rAZ	7
	SH-21	JR(sh)	1	JR(sh)	1	JR(sh), E	2
	SH-23	JR(sh), rAZ	2	JR(sh)(h), rAZ	3	JR(sh), Ü, SB, BSm	4
	SH-24	JR(sh), Ü, BSm, Sw, rAZ	5	JR(sh)(h), Ü, rAZ	4	JR(sh)(h), Sw, rAZ	4
	SH-25	JR(sh), JR(h), SB	3	JR(sh)	1	JR(sh), KS, HG	3
	SH-27	JR(sh), Ü	2	JR(sh)	1	JR(sh), Ü, SB	3
	SH-28	JR(sh), Ü, BSm, Sw, rAZ, E	6	JR(sh), SB, BSm	3	JR(sh), Ü, SB, BSm, KS, rAZ, HG	7
	SH-45	JR(sh), Ü, BSm, Sw, rAZ	5	JR(sh), rAZ	2	JR(sh), rAZ	2
	SH-46	JR(sh), BSm, SB, rAZ, HG	5	JR(sh), Ü, SB, BSm	4	JR(sh), Ü, SB, BSm, rAZ	5
	SH-47	JR(sh), SB, Sw	3	JR(sh)	1	JR(sh)(h)	2

OSc – objektiver Symptomscore. SSc – subjektiver Symptomscore. H – Symptome an der Haut: Erythem (1), Urtikaria (2), Angioödem (3), SCORAD-Anstieg um zehn Punkte (4). SH – Symptome an der Schleimhaut wie Erythem, Papeln, Vesikel. K – Konjunktivitis. R – Rhinitis. N – Niesen. GIT – Gastrointestinale Symptome: Durchfall (1). KV – Kardiovaskuläre Symptome: Änderung des Blutdrucks um > 20 mmHg (1), Blässe, Kaltschweißigkeit, Kreislaufzentralisierung (kalte Extremitäten) (4). P – pulmonale Symptome: Abfall des FEV1 > 10 % (1). M – medikamentöse Intervention: H1-Rezeptorenblocker (2), Glukokortikoide (3). JR(h) – Juckreiz der Haut. JR(sh) – Juckreiz, Brennen, Kribbeln, Taubheit, pelziges Gefühl an der Schleimhaut. Ü – Übelkeit, Brechreiz, flaes Gefühl. BSm – Bauchschmerzen. SB – Sodbrennen, Blähbauch. KS – Kopfschmerzen. Sw – Schwindel, Flush. rAZ – leicht reduzierter Allgemeinzustand, Abgeschlagenheit, Müdigkeit. HG – Hustenreiz, Heiserkeit, Globusgefühl. E – Engegefühl in der Brust.

Bei allen drei getesteten Selleriesorten sind die Schleimhautsymptome des Oropharynx und gastrointestinale Symptome führend, gefolgt von kardiovaskulären und pulmonalen Symptomen. Bei der Sorte Anita treten die Reaktionen an allen Organsystemen seltener auf als bei der

Screeningsorte und der Sorte Prinz. Zwischen der Screeningsorte und Prinz bestehen prozentual kaum Unterschiede in der Verteilung der allergischen Reaktion auf die Organsysteme. Allgemein kann zwischen den drei Sorten keine prozentuale Verschiebung zugunsten bestimmter Organsysteme festgestellt werden.

4.2.4 SPT mit Extrakten der Selleriesorten Anita und Prinz

In einem weiteren Schritt wurden von den Sorten Anita und Prinz Proteinextrakte hergestellt und die verschiedenen Konzentrationen dieser Extrakte vergleichend zur Nativtestung bei acht Probanden untersucht. Die Titrationsstufen 0,1 und 1 µg/ml der Extrakte lösten bei beiden Sorten keine als positiv zu bewertenden Reaktionen aus. Bei den Titrationsstufen 10 und 100 µg/ml gab es im Median kaum Unterschiede zwischen der Sorte Anita und Prinz. Der Median der Quaddelgröße lag bei der Titrationsstufe 10 µg/ml bei 3mm und bei der Titrationsstufe 100 µg/ml bei 5 mm. Nur bei Verwendung nativer Sellerieknolle für den SPT waren die Unterschiede im Median deutlich ausgeprägt (Median von Anita 5 mm und Prinz 7 mm, Abbildung 14) und statistisch signifikant (Wilcoxon-Test, $p = 0,018$).

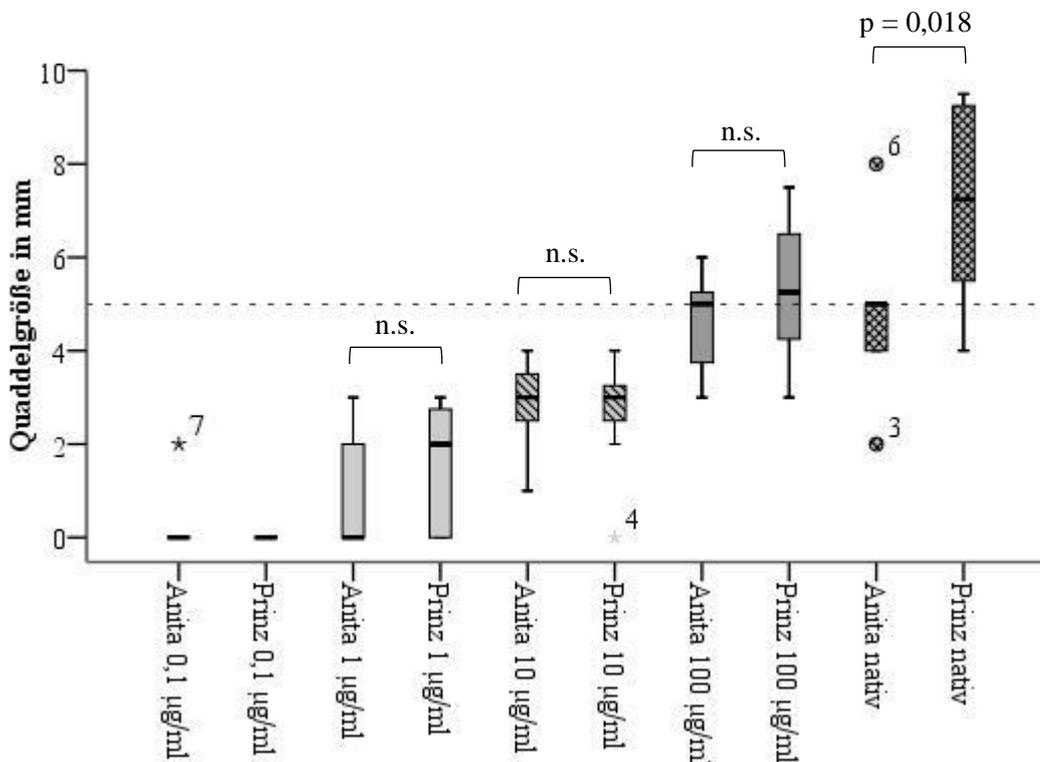


Abbildung 14: SPT mit Proteinextrakten der Sorten Anita und Prinz bei acht Probanden

4.3 SPOT-Synthese und Optimierung des Protokolls

Zur Identifizierung von Bindungsstellen des spezifischen IgE von Sellerie- und Haselnussallergikern an die Hauptallergene Api g 1 und Cor a 1 wurden Peptidmembranen mithilfe der SPOT-Synthese-Technik hergestellt. Dabei wurden die Proteinsequenzen von Api g 1 und Cor a 1 in Reihen überlappender Peptide hergestellt und mit den Patientenseren inkubiert. Zur Durchführung dieser Untersuchungen lagen unterschiedliche Protokolle in der Arbeitsgruppe und Literatur vor.

Im ersten Teil der methodischen Arbeit wurde ein optimiertes Protokoll für die Durchführung der folgenden Inkubationsanalysen etabliert. Dafür wurden die experimentellen Bedingungen in Hinsicht auf den Membrantyp, die Peptidbeladung, Synthesequalität, Peptidlängen, das Detektions- und Visualisierungssystem, die Blockierungsreagenzien und Inkubationsparameter untersucht.

4.3.1 Membrantyp

Als Grundlage für die Synthese der Peptidarrays wurden einfache Cellulosemembranen verwendet. Cellulose eignet sich gut als Träger für die Peptidsynthese, da sie weitestgehend stabil gegenüber den meisten Lösungsmitteln (Dimethylformamid (DMF), N-Methylpyrrolidon (NMP), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dichlormethan (DCM), Methanol, Ether) und Reagenzien (Piperidin, Trifluoressigsäure (TFA), Triisobutylsilan (TIBS), Phenol) ist, die für die Peptidsynthese und die Abspaltung der Schutzgruppen notwendig sind [78]. Als unverzweigtes Polysaccharid besitzt Cellulose freie Hydroxylgruppen, die im ersten Schritt aminofunktionalisiert werden und somit zur Immobilisierung der zu synthetisierenden Peptide verwendet werden können.

Für unsere Versuchsreihen erfolgte die Derivatisierung der Cellulose auf zwei verschiedenen Wegen: bei der Membran vom Estertyp (β -Ala-Membran) und der Membran vom Ethertyp (N-CAPE-Membran). Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, konnten auf N-CAPE-Membranen deutlich mehr Signale identifiziert werden, bei einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis. Dieser Unterschied war sowohl bei Api g 1 Peptiden als auch bei Cor a 1 Peptiden nachweisbar. Zusätzlich hatten N-CAPE-Membranen durch die Etherbindung den Vorteil einer stabileren Verankerung der Peptide an der Membran im Gegensatz zur Ester-Typ-Membran (β -Alanin). Ester-Bindungen mit OH-Gruppen der Cellulose sind unter den Bedingungen der Peptidsynthese

nicht völlig stabil. Zum Beispiel führt die Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (18 Synthesezyklen) zu 6 % Peptidverlust und die Behandlung mit 25 % TFA (12 Synthesezyklen) zu 9 % Peptidverlust [79].

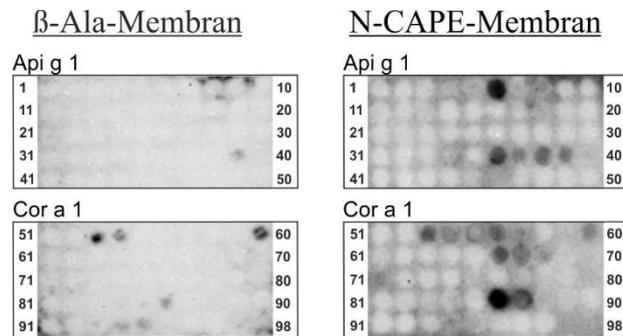


Abbildung 15: Vergleich zwischen β-Ala-Membran und N-CAPE-Membran

Dargestellt sind die Inkubationsergebnisse mit überlappenden 12-mer Peptiden (3 Aminosäuren Versatz) der Api g 1 und Cor a 1 Sequenz. Die Inkubation erfolgte mit dem Serum SH-1 (Verdünnung 1 : 5) und die Detektion mit anti-human-IgE-Antikörper (A 9667, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1 : 5000).

4.3.2 Einfluss der Membranbeladung (Peptiddichte)

Die Peptiddichte auf der Membran stellt einen wesentlichen Einflussfaktor für Bindungsstudien mit Immunglobulinen und Peptiden dar [52]. Zur Modulation der Membranbeladung wurde jeder Schritt des Syntheseprotokolls verändert (siehe Methoden) und die erzielte Membranbeladung gemessen (Abbildung 16).

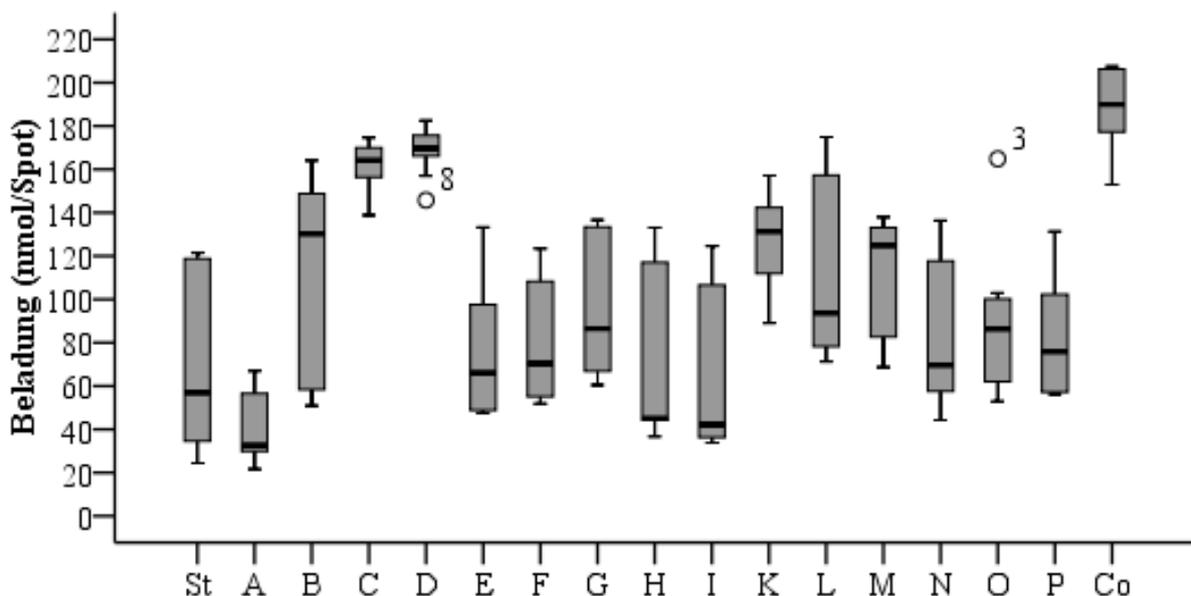


Abbildung 16: Beladung der N-CAPE Membranen mit verschiedenen Modifikationen

St – Membranherstellung entsprechend Standardprotokoll. A-P – Modifikationen: Verwendung der halben (A) und doppelten (B) Menge an Perchlorsäure beim Ansäuern der Membran. Verwendung von Wasser statt Methanol beim Ansäuern mit einer Reaktionszeit von 2 min (C) und 10 min (D). Verlängerung der Reaktionszeit beim Ansäuern (Perchlorsäure in Methanol) von 2 auf 5 min (E) und 10 min (F). Halbe (G) und doppelte (H) Menge an Epibromhydrin in der Etherbildung mit OH-Gruppen der Cellulose. Verwendung der halben (I) und doppelten (K) Menge an Perchlorsäure in der Etherbildung. Änderung der Reaktionszeit in der Etherbildung von drei auf eine Stunde (L) und von drei auf 24 Stunden (M). Halbe Menge (N) und doppelte Menge (O) an 1,3-Diaminopropan zur Substitution der Brom-Funktion. Trocknung der Membran nach dem Ansäuern mit 2 x 3 min in Ether (P) anstatt drei Stunden bei Raumtemperatur. Co – Kombination der besten Zwischenergebnisse. Angegeben sind die Werte von zehn Messungen pro Modifikation.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das Ansäuern der Membran den wichtigsten Schritt bildet, um hohe Beladungen zu erzielen (Abb. 16 B). Die Verwendung von Wasser statt Methanol führt zur zweieinhalbfachen Beladung (Abb. 16 C, D) ($p = 0,000$). Zusätzlich kommt es durch die Quellung der Cellulose in Wasser zu einer viel gleichmäßigeren Funktionalisierung der OH-Gruppen und dementsprechend geringeren Schwankung der Beladung innerhalb der Membran (Abb. 16 C, D, Co – Standardabweichung). Die doppelte Menge von Perchlorsäure beim Ansäuern (Abb. 16 B) und in der Etherbildung (Abb. 16 K) steigert zusätzlich die Beladung. Eine weitere Verbesserung kann durch Verringerung der Menge an Epibromhydrin (Abb. 16 G) und Verlängerung der Reaktionszeit (Abb. 16 M) in der Etherbildung erzielt werden. Auch die

Verkürzung der Reaktionszeit führt zu leicht erhöhter Beladung (Abb. 16 L). Mit verschiedenen Konzentrationen von Diaminopropan konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Eine hohe Konzentration (Abb. 16 O) führte aber zu einer gleichmäßigeren Membranbeladung und geringen Standardabweichung.

Durch die Kombination der besten Modifikationen war es möglich, Membranen mit sehr hoher und gleichmäßiger Beladung bis zu 200 nmol/Spot (d. h. 800 nmol/cm²) herzustellen (Abb. 16 Co). Allerdings erfordert dieses Herstellungsprotokoll aufgrund der begrenzten Stabilität der Cellulose gegenüber Perchlorsäure einen sehr vorsichtigen Umgang mit der Membran.

Bei den Inkubationen mit den Seren der Probanden fanden sich die besten Ergebnisse und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis auf Membranen mit einer Beladung zwischen 160 – 190 nmol/Spot (d. h. 640 – 760 nmol/cm²). Die Reduktion der Membranbeladung auf 60 – 80 nmol/Spot (Standardprotokoll) oder 10 – 30 nmol/Spot führte zu einem deutlichen Signalverlust (Abbildung 17).

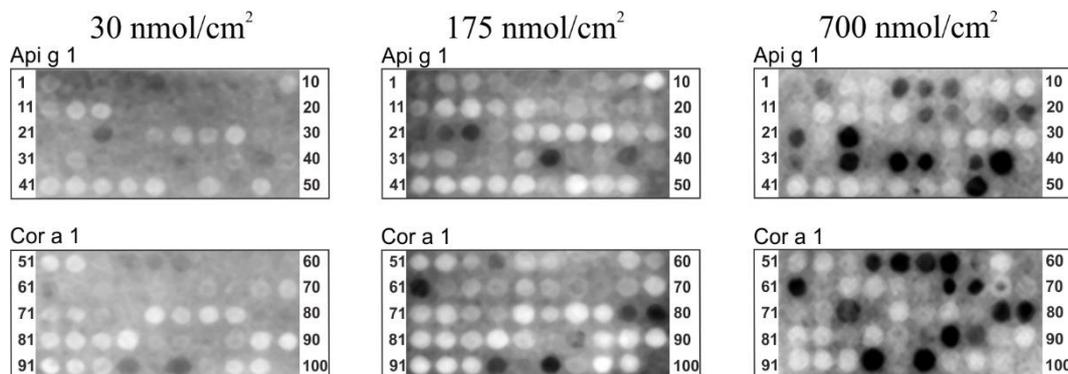


Abbildung 17: Einfluss der Membranbeladung auf N-CAPE-Membranen

Dargestellt sind die Inkubationsergebnisse mit 12meren Peptiden (Versatz 3 Aminosäuren) der Api g 1 und Cor a 1 Sequenz. Es wurden das Serum SH-24 (Verdünnung 1 : 5) und der anti-human-IgE-Antikörper (A 9667, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1 : 5000) eingesetzt.

4.3.3 Qualität der hergestellten Peptide

Um die Qualität der hergestellten Peptide zu untersuchen, wurden bei der Herstellung jeder Membran Kontrollpeptide synthetisiert. Diese 7-, 12- und 24-meren Peptide wurden auf β -Ala- und N-CAPE-Membranen hergestellt und von der Membran abgespalten. Bei den β -Ala-Membranen erfolgte die Abspaltung zunächst mit NaOH (0,125 M). Später wurde die Abspaltung mit Ammoniakgas durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. Bei den N-

CAPE-Membranen erfolgte die Abspaltung unter Verwendung des säurelabilen F-moc-Rink-Amid-Linkers. Die abgespaltenen Peptide wurden mittels Massenspektrometrie (ESI MS, QTOFmicro[®]) auf ihre Identität und Synthesequalität untersucht und anschließend die Reinheit mit der HPLC ermittelt. Eine kleine Auswahl der insgesamt 186 Kontrollpeptide ist in den Tabellen 15 und 16 und in der Abbildung 18 dargestellt. Dabei waren alle gemessenen Molekülmassen konform zu den erwarteten Massen und die Reinheit der Peptide lag im Durchschnitt bei 70 – 90 % (7- und 12-mer Peptide) und 30 – 60 % (24-mer Peptide). Durch längere Kopplungszeiten bei den 24-meren Peptiden kommt es zur Verdunstung von Lösungsmitteln im offenen Reaktionssystem des SPOT-Synthese-Apparats, und dies führt zur niedrigeren Reinheit, wie bereits beschrieben [78]. Somit waren die synthetisierten Peptide in ausreichender Qualität und Reinheit für die weiteren Untersuchungen vorhanden [78, 80].

Tabelle 15: Validierung der an N-CAPE-Membranen synthetisierten und abgespaltenen Kontrollpeptide mittels ESI MS und RP-HPLC

Sequenz	Berechnet [M + H ⁺] ⁺	Gemessen [M + H ⁺] ⁺	HPLC <i>t</i> [min]	Reinheit [(%) area]
DTVLPKA	742.4119	742.3340	9.35	> 95.00
TLKIITL	800.5265	800.4508	13.79	73.00
GDILLGF	733.3904	733.3226	15.49	79.25
IKYANEQ	864.4235	864.3649	7.60	64.11
PARLFKR	886.5395	886.4972	9.74	85.99
SGLFKAVEGYLL	1295.7019	1295.6864	16.81	84.18
GDAVVPEENIKY	1332.6455	1332.6383	10.91	69.83
GSILKSISKYHT	1332.7295	1332.7168	11.90	41.88
MTLRIDGVNKEA	1345.6918	1345.6943	11.99	56.17
NFSYRYSVIEGD	1448.6466	1448.6532	13.07	64.80
FIESIENHVVLV	1397.7448	1397.7321	13.92	75.00
LPKAAPGAYKSV	1200.6760	1200.6064	9.79	> 95.00
EIIEGNGGPGTI	1155.5665	1155.4437	10.80	78.50
ETETTSVIPPARLFKRFVLDSNDL	2747.4387	1374.5625 ^[a]	15.67	33.02
GDAVVPEENIKYANEQNTALFKAL	2633.3230	1317.5336 ^[a]	14.27	53.39
DKLEKINYEIKIVASPHGGSILKS	2638.4587	800.6022 ^[b]	14.05	33.85
EIKGDGGPGTLKIITLPDGGPITT	2349.2685	1175.5259 ^[a]	14.00	52.41
IGDHELKDEQIKAGKEKASGLFKA	2611.3863	871.6334 ^[b]	11.52	30.25

Alle Kontrollpeptide wurden mithilfe des Fmoc-Rink-Amid-Linkers auf N-CAPE-Membranen hergestellt und als Amide von der Membran abgespalten. [a] [M + 2H⁺]⁺⁺. [b] [M + 3H⁺]⁺⁺⁺. [c] [M + 4H⁺]⁺⁺⁺⁺.

Tabelle 16: Validierung der an β -Ala-Membranen synthetisierten und abgespaltenen Kontrollpeptide mittels ESI MS

Sequenz ^[a]	Berechnet [M + H ⁺] ⁺	Gemessen [M + H ⁺] ⁺
FNYETETTSVIP-BB ^[b]	1541.7143	1541.792
AEKIFQGFVIDV-BB ^[b]	1506.7976	1506.859
LPKAAPGAYKSV-BB ^[b]	1342.7502	1342.793
EIEGNGGPGTI-BB ^[b]	1297.6407	1297.701
MTLRIDGVNKEA-BB ^[b]	1487.7660	1487.815
NFSYRYSVIEGD-BB ^[b]	1590.7208	1590.802
FIESIENHVVLV-BB ^[b]	1539.8190	1539.855
GSILKSYSKYHT-BB ^[b]	1474.8037	737.976 ^[d]
GDAVVPEENIKY-BB ^[b]	1474.7197	1474.878
SGLFKAVEGYLL-BB ^[b]	1437.7761	1437.929
SVSAEKIFQGFVIDVDTVLPKAAP-BB ^[c]	2672.4318	1337.286 ^[d]
EIKGDGGPGTLKIITLPDGGPITT-BB ^[c]	2491.3427	1246.772 ^[d]
GDAVVPEENIKYANEQNTALFKAL-BB ^[c]	2775.3972	1388.762 ^[d]
ETETTSVIPPARLFKRFVLDSNL-BB ^[c]	2889.5129	1445.854 ^[d]
DNLIPKVAPKAIKSIEIEGNGGP-BB ^[c]	2614.4587	873.548 ^[e]
EGSPFNYIKQKVEEIDQANFSYRY-BB ^[c]	3066.4616	1023.546 ^[d]
IGDHELKDEQIKAGKEKASGLFKA-BB ^[c]	2753.4605	918.557 ^[e]

[a] Alle Kontrollpeptide beinhalten C-terminal 2 β -Alanin Aminosäuren. Das erste β -Alanin stammt von der Aminofunktionalisierung der Cellulosemembran mit aktiviertem Fmoc- β -Alanin. Das zweite β -Alanin stammt aus der SPOT-Definition auf der Membran mit aktivierter Fmoc- β -Alanin-Lösung. [b] Peptide wurden mit Ammoniakgas abgespalten. [c] Peptide wurden mit NaOH (0.125 M) abgespalten. [d] [M + 2H⁺]⁺⁺. [e] [M + 3H⁺]⁺⁺⁺.

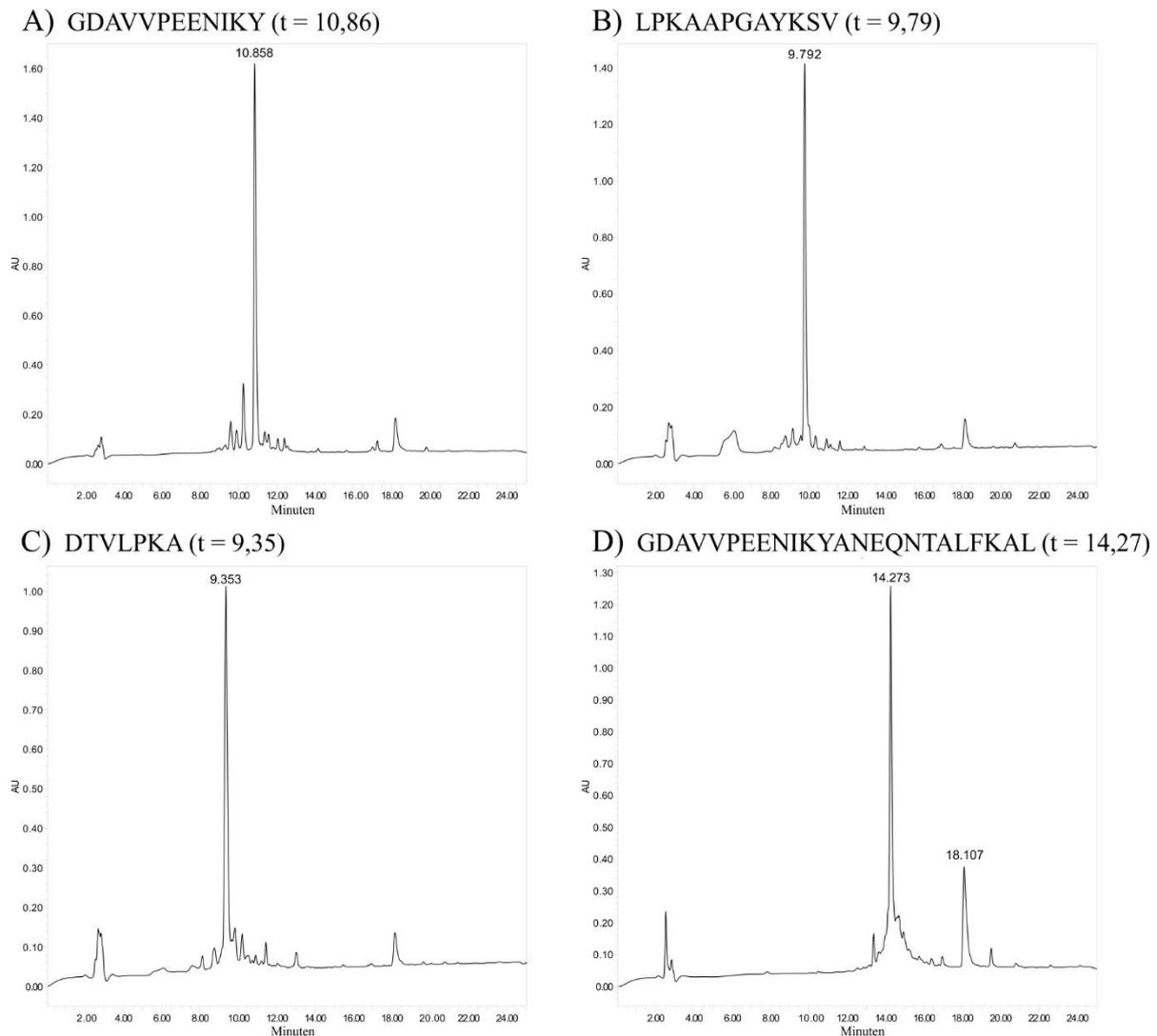


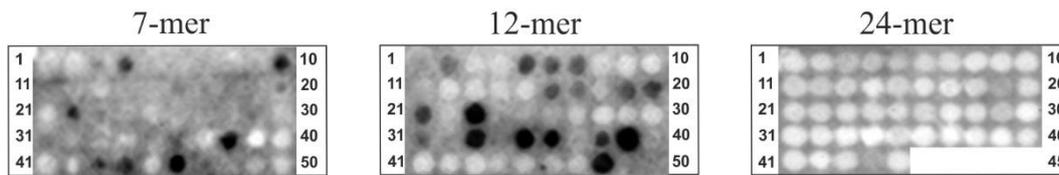
Abbildung 18: HPLC Chromatogramm von vier ausgewählten Peptiden zur Qualitätskontrolle

A) GDAVVPEENIKY (t = 10.86 min, peak area = 69.83 %), B) LPKAAPGAYKSV (t = 9.79 min, peak area > 95%), C) DTVLPKA (t = 9.35 min, peak area > 95 %), D) GDAVVPEENIKYANEQNTALFKAL (t = 14.27 min, peak area 53.39 %).

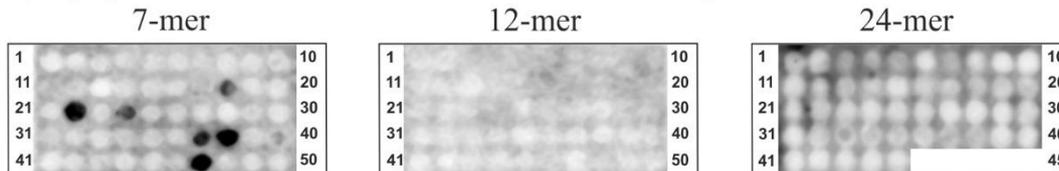
4.3.4 Einfluss der Peptidlänge (Sequenzfenster)

Um die geeignete Peptidlänge zur Identifizierung der IgE-Bindung an Peptide der Api g 1 und Cor a 1 Sequenz zu ermitteln, wurden überlappende Peptide mit einem Versatz von drei Aminosäuren, bestehend aus sieben, zwölf und 24 Aminosäuren, synthetisiert und mit Seren von Haselnuss- und Sellerieallergikern inkubiert. Als Kontrolle, zur Ermittlung unspezifischer Bindungen der Peptide mit dem Detektionsantikörper, wurden die Peptide auch ohne Serum inkubiert.

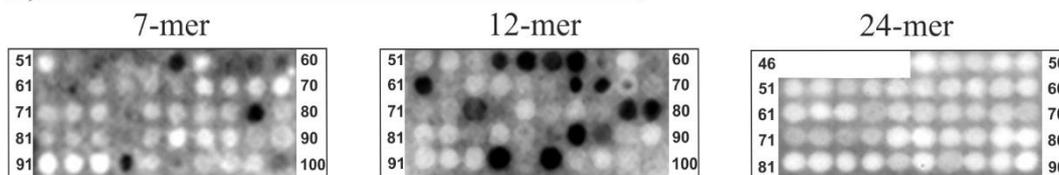
A) **Api g 1**: Inkubation mit Serum der Probanden



B) **Api g 1**: Inkubation nur mit dem Detektionsantikörper



C) **Cor a 1**: Inkubation mit Serum der Probanden



D) **Cor a 1**: Inkubation nur mit dem Detektionsantikörper

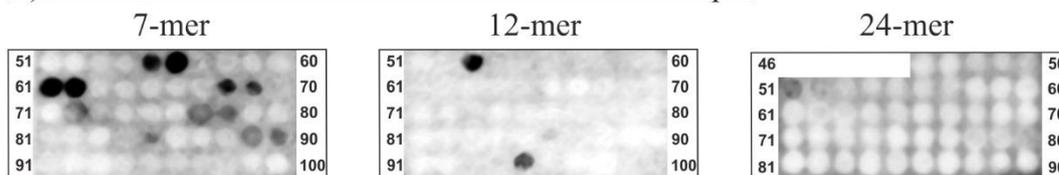


Abbildung 19: Einfluss der Peptidlänge auf N-CAPE-Membranen

Dargestellt sind die Inkubationsergebnisse mit 7-, 12 und 24-meren Peptiden (Versatz 3 Aminosäuren) der Api g 1 und Cor a 1 Sequenz. Es wurde das Serum SH-24 (Verdünnung 1 : 5) und der anti-human-IgE-Antikörper (A 9667, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1 : 5000) eingesetzt.

In Zusammenschau der verschiedenen Versuchsbedingungen kann festgestellt werden: je kürzer das Peptid, desto mehr Signale können identifiziert werden und gleichzeitig steigt die unspezifische Bindung des eingesetzten Detektionsantikörpers zu den Peptiden (Abbildung 19). Das beste Verhältnis der spezifischen IgE-Bindung versus unspezifischer Bindung des Detektionsantikörpers wurde mit 12-meren Peptiden sowohl bei Cor a 1 als auch Api g 1 erzielt.

4.3.5 Einfluss der verwendeten Antikörper und des Detektions- und Visualisierungssystems

Die Bindung der spezifischen IgE-Antikörper aus dem Serum an membrangebundene Peptide kann entweder direkt durch einen gegen IgE gerichteten Enzym-markierten (hier HRP - Meerrettichperoxidase) Antikörper oder indirekt über einen anti-IgE gerichteten IgG-Erstantikörper, welcher spezifisch durch einen Enzym-markierten IgG-Zweitantikörper gebunden wird (Sandwich), dargestellt werden. Zusätzlich kann ein biotinylierter anti-IgE-

Antikörper – durch die Bindung von Biotin zu Streptavidin – zur Darstellung der IgE-Bindung verwendet werden. In Abbildung 20 sind stark vereinfacht die drei unterschiedlichen Detektionsmethoden skizziert, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

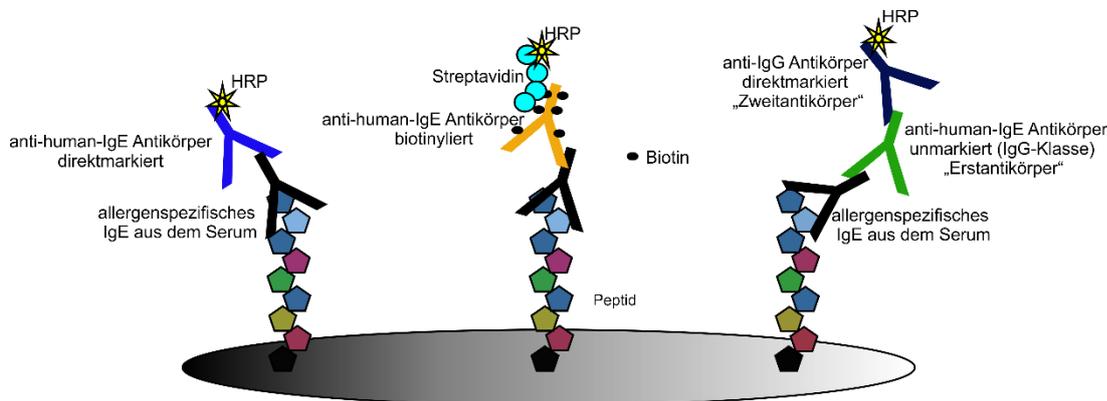


Abbildung 20: Vereinfachtes Schema der drei verwendeten Methoden zur Detektion von IgE-Bindung an membrangebundene Peptide

Die Verwendung von Zweitantikörpern ist bei der Inkubation mit membrangebundenen Peptiden kritisch zu sehen, da häufig unspezifische Bindungen zwischen dem Zweitantikörper und Peptiden auftreten und somit die spezifische Bindung des IgE verfälscht wird. Zusätzlich erschweren Bindungen des Detektionsantikörpers an Peptide die Interpretation der Signalmuster, weil die IgE-Bindung zu Peptiden sehr niedrig sein kann. Somit wird es schwierig, Interaktionen mit geringer Bindung zu identifizieren, da das Gleichgewicht während der Inkubation mit dem Zweitantikörper in Richtung der ungebundenen Moleküle verschoben ist [55].

Zur Untersuchung des am besten für die Fragestellung geeigneten Systems wurden die direkte und indirekte Detektionsmethode verwendet. Es wurden Peptidarrays (12-mer) mit überlappenden Peptiden von Cor a 1 und Api g 1 auf N-CAPE-Membranen mit Seren (jeweils einzeln, nicht gepoolt) von 26 Haselnuss-, 21 Sellerieallergikern und 17 gesunden Kontrollprobanden inkubiert. Die Bindungsmuster nach Seruminkubation wurden mit den Bindungsmustern bei reiner Antikörperinkubation verglichen, um zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungen zu unterscheiden.

I) Das Biotin-Streptavidin-System (biotinylierter anti-IgE-Antikörper wird im zweiten Schritt vom HRP-markierten Streptavidin gebunden) erwies sich als nachteilig, da sowohl der biotinylierte anti-IgE-Antikörper (BA-3040 von Vector laboratories) als auch das HRP-markierte Streptavidin (S 5512 von Sigma-Aldrich) zu unspezifischen Bindungen bei bis zu 25 % der verwendeten Peptide führten (Abbildung 21).

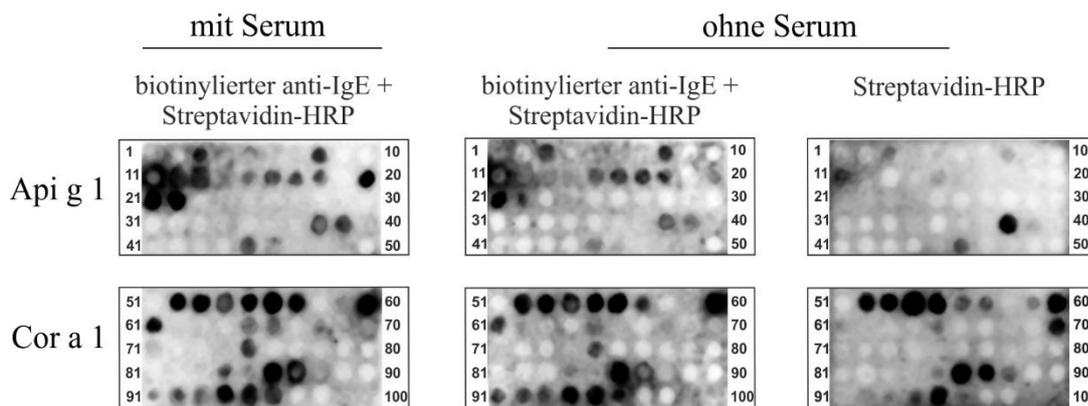


Abbildung 21: Detektion über das Biotin-Streptavidin-System

Für die Inkubation wurde das Serum SH-1 (Verdünnung 1 : 5) verwendet.

II) Als zweite indirekte Methode wurde ein monoklonaler Maus-anti-human-IgE-Antikörper (IgG, I 6510 von Sigma-Aldrich), der im zweiten Schritt von einem HRP-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper (A 5906 von Sigma-Aldrich) gebunden wird, verwendet (Abbildung 22). Beide Antikörper zeigten zwar keine Bindung zu den verwendeten Peptiden, jedoch wies der HRP-markierte anti-Maus-IgG-Antikörper kreuzreaktive Bindungen zu menschlichem IgG auf (welches unspezifisch an Peptide gebunden war) und verfälschte daher die Aussagekraft des Assays. Die hierbei resultierenden Signale waren eine Mischung von spezifischen IgE- und unspezifischen IgG-Bindungen.

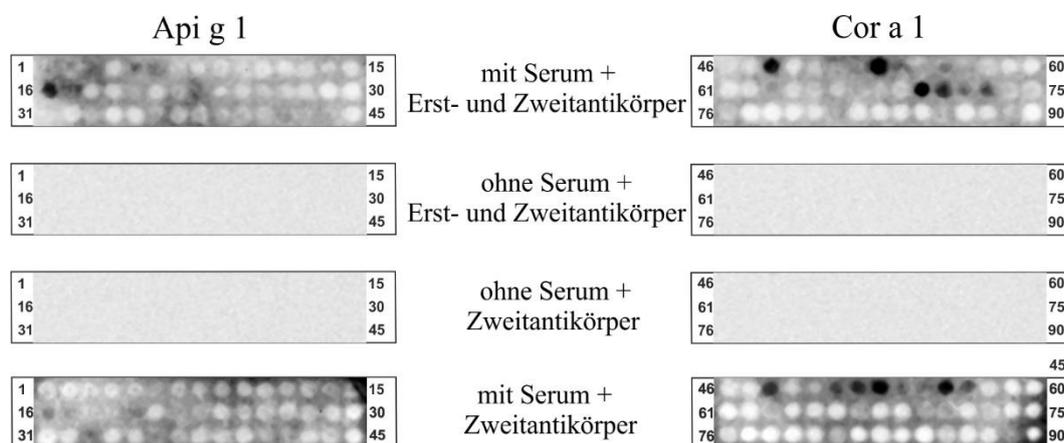


Abbildung 22: Detektion über das „Sandwich“-System

Erstantikörper: monoklonaler Maus-anti-human-IgE-Antikörper (IgG, I 6510 von Sigma-Aldrich). Zweitantikörper: HRP-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper (A 5906 von Sigma-Aldrich). Es wurde das Serum SH-1 (Verdünnung 1 : 5) verwendet.

III) Als direkte Methode wurden zwei verschiedene polyklonale anti-human-IgE-Antikörper (P 0295 von Dako und A 9667 von Sigma-Aldrich) verwendet, beide spezifisch gegen die schwere

ϵ -Kette des IgE. Beide waren direkt markiert mit HRP (Abbildung 23). Sie zeigten nur wenige kreuzreaktive Bindungen zu den verwendeten Peptiden, dafür aber sehr gute Signale nach Inkubation mit den Seren der Probanden. Die besten Ergebnisse mit stärkeren Signalen wurden mit dem anti-human-IgE-Antikörper A 9667 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) bei einer Verdünnung von 1 : 5000 erzielt, sodass dieser Antikörper für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

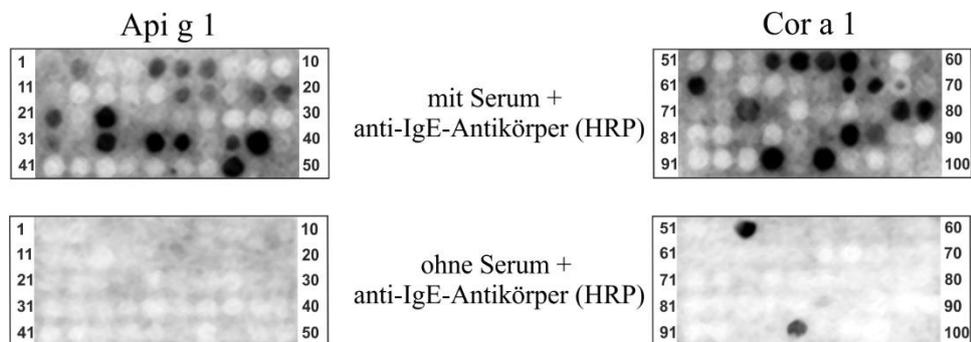


Abbildung 23: Detektion über einen direktmarkierten anti-IgE-Antikörper

Es wurden das Serum SH-24 (Verdünnung 1 : 5) und der anti-human-IgE-Antikörper (A 9667, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1 : 5000) eingesetzt.

4.3.6 Einfluss der Blockierungsreagenzien

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen während der Inkubationsversuche wurden Blockierungsreagenzien eingesetzt. Es ist offensichtlich, dass durch den Einsatz unterschiedlicher Blockierungsreagenzien aufgrund ihres Einflusses auf Antikörper-Peptid-Interaktionen auch unterschiedliche Ergebnisse in Immunoassays erzielt werden. Somit spielt die Wahl der Blockierungsreagenz eine wesentliche Rolle in Immunoassays, insbesondere dann, wenn Seren mit polyklonalen Antikörpern (z. B. menschlichem Serum) eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden fünf verschiedene Blockierungsreagenzien auf ihre Blockierungskapazität hin untersucht. Zum Vergleich wurden die Blockierungsversuche zwei Stunden bei Raumtemperatur und 16 Stunden bei 4 °C durchgeführt.

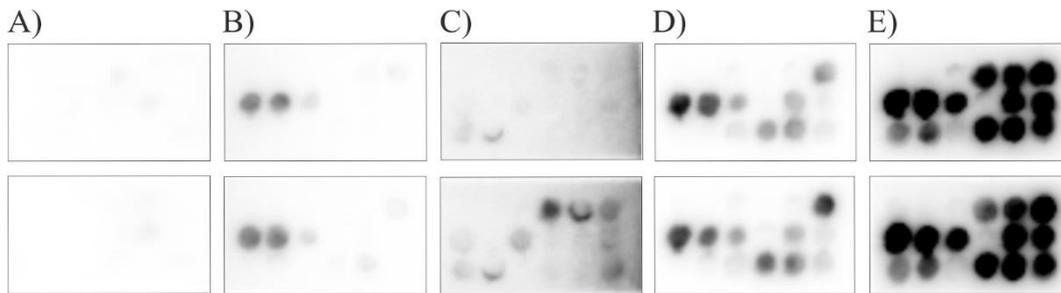


Abbildung 24: Einfluss der Blockierungsreagenzien

Peptidarrays mit zufällig ausgewählten 12-meren Api g 1 Peptiden wurden mit dem HRP-markierten anti-human IgE Detektionsantikörper (A 9667, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1 : 5000) für zwei Stunden bei Raumtemperatur (obere Reihe) und 16 Stunden bei 4 °C (untere Reihe) ohne vorherige Inkubation mit Probandenserum inkubiert. Folgende Blockierungsreagenzien wurden eingesetzt: A) verdünntes Sigma-Genosys Blockpuffer Konzentrat in TBS mit 5 % (w/v) Saccharose, B) Roti[®]-ImmunoBlock, C) Milchpulver, D) BSA-Blockpuffer, E) Tween 20 in TBS. Grau und schwarz dargestellte Signale stellen unerwünschte Interaktionen des Detektionsantikörpers mit membrangebundenen Peptiden dar.

Weder BSA- noch Tween-20-basierte Blockierungsreagenzien konnten wesentlich die unspezifischen Bindungen zwischen dem HRP-markierten Antikörper und membrangebundenen Peptiden reduzieren (Abb. 24 D, E). Die Blockierungsreagenzien auf Milch- oder Polymerbasis waren wesentlich stärker, jedoch nicht ausreichend (Abb. 24 B, C). Die besten Ergebnisse konnten mit dem Sigma-Genosys Blockpuffer Konzentrat in TBS mit 5 % (w/v) Saccharose erzielt werden (Abb. 24 A). Im Vergleich waren die Ergebnisse während der Blockierung über zwei Stunden etwas besser als über 16 Stunden bei 4 °C, aber diese Unterschiede fielen minimal aus. Aufgrund praktischer Aspekte wurde die Blockierung über zwei Stunden bei Raumtemperatur präferiert.

4.3.7 Einfluss der Inkubationsparameter

Die Inkubationstemperatur stellt einen besonders wichtigen Parameter bei Immunoassays dar und betrifft unspezifische Bindungen an membrangebundene Peptide. Oft sind hydrophobe Wechselwirkungen mit Peptidsequenzen des Proteinkerns, welche normalerweise in der 3-D-Struktur des Proteins nicht zugänglich sind, aber bei der SPOT-Synthese in kurzen Pepscons über die Proteinsequenz zugänglich gemacht werden, der Grund für unspezifische Bindungen. Im Gegensatz zu anderen Interaktionen, können diese hydrophoben Interaktionen durch Absenkung der Inkubationstemperatur verringert werden [55].

Um die optimale Temperatur zu ermitteln, wurden die Inkubationen I) eine Stunde bei Raumtemperatur, II) eine Stunde bei 37 °C, III) 16 Stunden bei 37 °C und IV) 16 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Bessere Ergebnisse wurden bei der Seruminkubation bei 4 °C über 16 Stunden erzielt (Abbildung 25).



Abbildung 25: Einfluss der Temperatur auf die Peptidbindung

Es wurden das Serum SH-1 (Verdünnung 1 : 5) und der anti-human-IgE-Antikörper (A 9667, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1 : 5000) eingesetzt. Dargestellt sind Inkubationsergebnisse mit einer Auswahl an Api g 1 und Cor a 1 Peptiden bei 4 °C (16 h), Raumtemperatur (1 h) und 37 °C (1 h).

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Serumverdünnung. In Anbetracht der sehr niedrigen Konzentration von IgE im menschlichen Serum (verglichen mit dem Anteil anderer Immunglobuline) und der sehr hohen Variationsbreite (niedrige IgE-Konzentrationen bei Probanden mit Rhinitis und sehr hohe IgE-Konzentrationen bei Probanden mit Atopischer Dermatitis) wurden unterschiedliche Serumverdünnungen (1 : 1 bis 1 : 30) untersucht. Bei allen Verdünnungsreihen wurden IgE-Bindungen nachgewiesen. Die besten Ergebnisse wurden jedoch bei einer Serumverdünnung von 1 : 5 erzielt.

4.4 Inkubationsanalysen

Nachdem jeder Schritt bei der Herstellung der Grundmembran, die Peptidlängen und Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur, Antikörper, Inkubationszeiten und Serumverdünnung) untersucht wurden, wurden die geeignetsten Bedingungen zum optimierten Protokoll zusammengefügt. Sehr hoch beladene N-CAPE Membranen (640 – 760 nmol/cm²) mit überlappenden Peptiden (12-mer) der Api g 1- und Cor a 1- Sequenz wurden für die Inkubation mit Seren von 21 Sellerie-, 26-Haselnussallergikern und 17 gesunden Probanden verwendet. Dabei wurde für jeden Probanden eine Membran mit 49 Haselnusspeptiden und mit 49 Selleriepeptiden hergestellt und untersucht. Die Membranen wurden zunächst für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit verdünntem Sigma-Genosys Blockpuffer Konzentrat in TBS mit 5 % (w/v) Saccharose geblockt. Für die Peptid-IgE-Bindung wurden die Membranen anschließend 16 Stunden bei 4 °C mit 1 : 5 verdünntem Serum der Probanden (in Blockpuffer verdünnt) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS (je 3 min) wurde das peptidgebundene IgE durch einen HRP-markierten anti-IgE-Antikörper (A 9667, Sigma-Aldrich) gebunden und nach weiteren drei Waschschritten per Chemilumineszenz (Luminol) dargestellt. Die Signalintensitäten der einzelnen Spots wurden am LumiImager gemessen und mit der LumiAnalyst-Software verarbeitet.

Trotz Optimierung der durchgeführten Schritte im Protokoll kam es nach Einsatz menschlicher Seren (polyklonale Antikörper verschiedener Klassen und Proteine im Serum) interindividuell zu großen Schwankungen in der Signalintensität der Spots und des Hintergrundes. Die Signale waren deutlicher, wenn der Anteil von spezifischem IgE relativ hoch in Bezug zum Gesamt-IgE lag. Zusätzlich variierte bei den Probanden die Aktivität der endogenen Peroxidase im Serum (z. B. freigesetzte Glutathionperoxidase aus lysierten Erythrozyten während der Blutentnahme bei zu hohem Sog der Vakuumröhrchen), sodass es teilweise zu einer sehr starken Hintergrundfärbung bei der Detektion über den HRP-markierten Detektionsantikörper kam. Aus diesen Gründen wurde, wie im Methodenteil beschrieben, eine einheitliche Methode zur Messung der BLU-Werte gewählt, um interindividuelle Schwankungen der Signalintensitäten und des Hintergrundes herauszurechnen und die Vergleichbarkeit der Werte innerhalb der Probanden zu gewährleisten.

Die Ergebnisse der Inkubationsanalysen mit den Api g 1-Peptiden sind zusammenfassend in Abbildung 26 dargestellt.

Die Sellerieallergiker haben im Vergleich zu Gesunden deutlich mehr positive Spots und somit mehr IgE-Bindungen zu Api g 1 Peptiden (136 vs. 36). Innerhalb der Probanden schwankt die Häufigkeit positiver Spots bei den Allergikern zwischen 1 – 18 und bei den gesunden Probanden zwischen 0 – 8 Spots. Innerhalb der Api g 1 Sequenz werden vor allem drei Cluster spezifisch erkannt. Die erste Region umfasst die Aminosäuren 1 – 30, die mittlere Region die Aminosäuren 46 – 72 und die C-terminale Region die Aminosäuren 100 – 126.

Bei den Sellerieallergikern wird die erste Region (AA 1 – 30) von 13 Probanden (62 %) erkannt, dagegen nur von drei (18 %) der gesunden Probanden. In der mittleren Region (AA 46 – 72) weisen zwölf (57 %) allergische Probanden und fünf (29 %) gesunde Probanden Bindungen auf. Die dritte Region (AA 100 – 126) wird von allen (100 %) Seren der Allergiker erkannt. Hier ist insbesondere das Peptid 35 (AA 103 – 114) mit der Sequenz VLVPTADGGSIC zu nennen, das von allen Allergikerseren, aber von keinem Serum der gesunden Probanden erkannt wird. Sogar pollensensibilisierte Haselnuss-Allergiker ohne Sellerieallergie (negativer DBPCFC) zeigen keine Bindung zum Peptid 35, sodass dieses Peptid offensichtlich zur Diskriminierung zwischen Gesunden und Allergikern genutzt und sogar bei pollensensibilisierten Probanden eingesetzt werden kann.

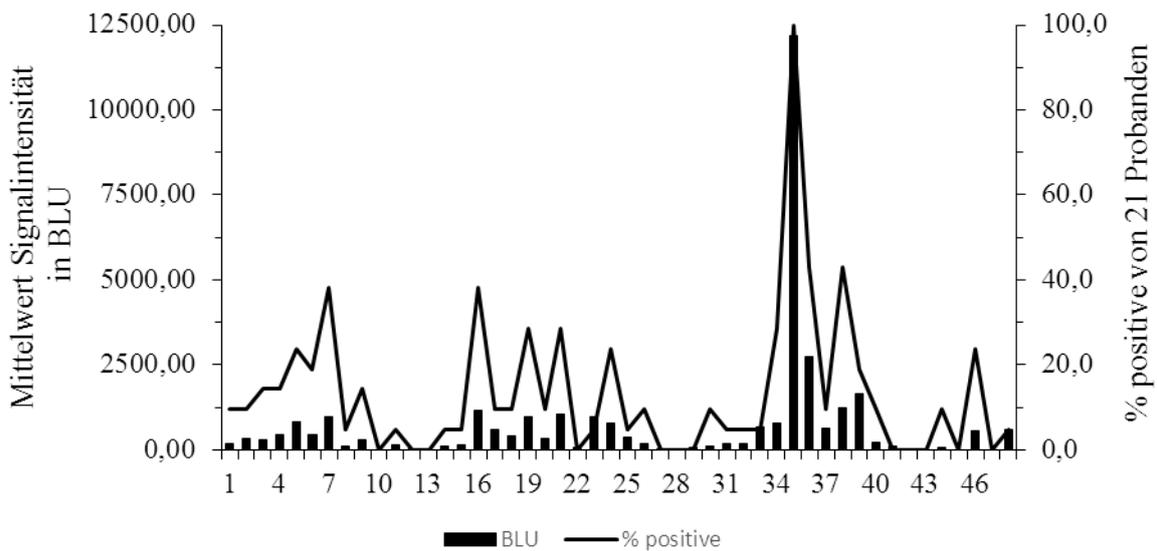


Abbildung 27: Vergleich der durchschnittlichen Signalintensität in BLU mit der Prozentzahl der allergischen Probanden (n = 21) mit positiver Bindung zu den Api g 1.0101 Peptiden

Werden die Sequenzmuster nach Atopiestatus des Probanden betrachtet, kann kein signifikanter Zusammenhang mit dem Vorliegen von allergischer Rhinitis, Asthma oder atopischer Dermatitis hergestellt werden.

In Hinsicht auf Geschlechtsunterschiede fällt auf, dass die mittlere Region (Peptid 16, AA 46 – 57) ausschließlich von Seren weiblicher Probanden gebunden wird. Die Seren von männlichen Probanden zeigen hier keinerlei Bindung. Insgesamt zeigen die Seren von Frauen signifikant mehr positive Spots als die Seren von Männern über die gesamte Api g 1 Sequenz ($p = 0,018$, Korrelation nach Pearson).

Weiterhin besteht ein enger Zusammenhang von Peptid 16 und 19. Peptid 19 wird nur dann gebunden, wenn der gleiche Proband auch Bindung zum Peptid 16 zeigt. Dieses kann durch die starke Sequenzähnlichkeit beider Peptide erklärt werden. Im unten stehenden Sequenzalignment lässt sich erkennen, dass die Bindung hier bei beiden über die Aminosäuren DGGPIT vermittelt wird.

Peptid 16	<u>GDGGP</u> GTLKI <u>IT</u>
	DGGP IT
Peptid 19	IITLP <u>DGGP</u> ----- <u>IT</u>

Wird die klinische Symptomatik der Probanden bei der DBPCFC mit Sellerie im Vergleich zu den Sequenzmustern betrachtet, unterscheiden sich die Muster je nach reagierendem Organsystem. Probanden mit kardiovaskulären Reaktionen zeigen häufig Bindungen und hohe Signalintensitäten zum Peptid 19 (57 % positive Bindungen mit durchschnittlicher Intensität von 3991,7 BLU bei Probanden mit kardiovaskulären Reaktionen im Vergleich zu 14 % positive Bindungen mit 905,5 BLU bei Probanden ohne kardiovaskuläre Reaktionen).

Probanden mit gehäuften mukokutanen Reaktionen, insbesondere Angioödem der Lippen oder der Zunge (6 von 21 Probanden), zeigen kaum Bindung zum Peptid 19 (16,6 % positive Bindungen mit 814,8 BLU bei Probanden mit Angioödem im Vergleich zu 33,3 % positive Bindungen mit 3392,6 BLU bei Probanden ohne Angioödem). Diese Probanden weisen auch kaum eine Bindung zum Peptid 7 auf (16,6 % Bindung bei Probanden mit Angioödem und 46,66 % Bindung bei Probanden ohne Angioödem).

Bei Probanden mit pulmonalen Symptomen (4 von 21 Probanden) fand sich keine Bindung zum Peptid 7.

Von allen getesteten Selleriesorten hat die Sorte Anita die geringsten Quaddelgrößen im SPT und die mildesten klinischen Symptome in der DBPCFC ausgelöst.

16 Probanden, die mit der Sorte Anita provoziert wurden und mit alleinigem OAS reagiert haben, zeigen keine Bindung zu den Peptiden 16 – 19. Dagegen korrelieren hohe Werte im Symptomenscore (DBPCFC Anita), und somit Reaktion mehrerer Organsysteme, mit starker Bindung zum Peptid 16 (OSc $p = 0,006$, SSc $p = 0,030$, Gesamtscore $p = 0,003$) und zum Peptid 19 (OSc $p = 0,002$, SSc $p = 0,023$, Gesamtscore $p = 0,001$). Ein ähnliches Bild stellt sich bei der Sorte Prinz dar. Probanden mit positiver Bindung zu den Peptiden 16 und 19 haben schwere Reaktionen mit hohen Score-Werten. Probanden mit leichten und nur mukokutanen Reaktionen weisen dagegen keine Bindung zu den Peptiden 16 und 19 auf.

Das Peptid 46 zeigt eine hohe Korrelation zum Peptid 16, jedoch ohne Vorliegen von Sequenzähnlichkeit.

Aminosäuren 49 – 63, die vierte Region die Aminosäuren 103 – 123 und die C-terminale Region die Aminosäuren 130 – 150.

Die Peptide 4, 11 und 37 werden nahezu von allen Seren der Allergiker und der gesunden Probanden gebunden und können daher nicht zur Diskriminierung verwendet werden. Das Peptid 5 wird von 85 % (18/21) der Seren von Allergikern mit beiden Allergien (Haselnuss und Sellerie), jedoch von keinem (0/5) Serum von Allergikern mit reiner Haselnussallergie, und von 35 % (6/17) der Seren von gesunden Probanden erkannt. Das Peptid 7 wird ebenfalls von 85 % (18/21) der Seren von Allergikern mit beiden Allergien, von 40 % (2/5) der Seren von Allergikern mit reiner Haselnussallergie und von 47 % (8/17) der Seren von gesunden Probanden erkannt. Die Peptide 17 und 18 werden fast nur von Seren von Probanden mit beiden Allergien erkannt (Peptid 17 von 66,6 % (14/21) und Peptid 18 von 42 % (9/21)) und von Probanden mit reiner Haselnussallergie gar nicht (beide 0/5) gebunden. Das Peptid 38 wird von 66,6 % der Seren von Allergikern mit beiden Allergien, von 20 % (1/5) Allergikern mit reiner Haselnussallergie und von 23,5 (4/17) der gesunden Probanden erkannt.

In Abbildung 29 wurden die BLU-Werte der einzelnen Spots und die Anzahl von Allergikerseren (in %) mit positiver Bindung verglichen. Dabei bilden sich die genannten fünf Cluster ab. Die rot markierten Areale können nicht mit einbezogen werden, da hier auch Gesunde reagieren. Das Peptid 7 hat demnach die höchste Intensität (BLU) mit einer Trefferquote von 76 % (20/26) bei allen Haselnussallergikern, gefolgt von den Peptiden 5, 17 und 18.

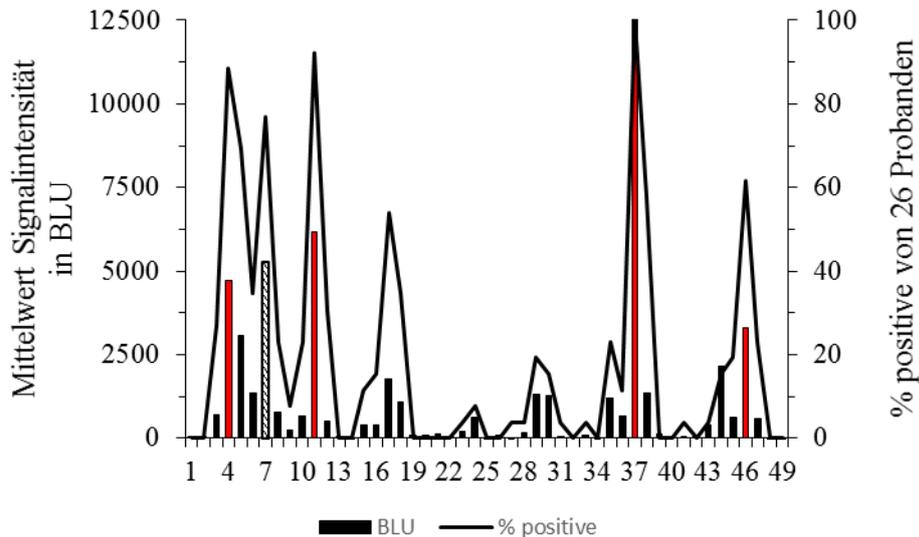


Abbildung 29: Vergleich der durchschnittlichen Signalintensität in BLU mit der Prozentzahl der allergischen Probanden (n = 26) mit positiver Bindung zu den Cor a 1.0301 Peptiden

In Rot sind Bereiche dargestellt, die fast von allen Gesunden erkannt werden. Das Peptid 7 ist gestreift wiedergegeben, weil hier etwa die Hälfte der Gesunden positiv reagiert.

Werden die Sequenzmuster nach Atopie oder Geschlecht betrachtet, können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Das Ausmaß des haselnuss- oder selleriespezifischen IgE ist nicht mit dem Sequenzmuster assoziiert. Jedoch zeigt die Höhe des Gesamt-IgE eine signifikante Korrelation zur Signalintensität in BLU bei Peptid 7 ($p = 0,025$, Korrelation nach Pearson) und auf die Sequenzmuster der Peptide 17 und 18. Diese werden abhängig vom Gesamt-IgE im Serum erkannt. Bei einem Gesamt-IgE bis 255 IE werden diese Regionen von jedem Probanden mit Sellerie- und Haselnussallergie erkannt, ab einem Gesamt-IgE von über 260 IE trifft das nur noch auf jeden zweiten zu.

Probanden mit schweren kardiovaskulären Reaktionen (OSc und SSc) in der DBPCFC mit Haselnuss zeigen zwar auf der Cor a 1.0301 Sequenz keine Unterschiede zu den anderen Probanden, binden aber stark die mittlere Region der Api g 1.0101 Sequenz (Peptide 16 und 19). In Hinsicht auf weitere klinische Reaktionsmuster (gastrointestinale Symptome, Angioödeme, pulmonale Symptome usw.) ergeben sich auf der Cor a 1.0301 Sequenz keine signifikanten Unterschiede zu den übrigen Probanden.

Zum Haselnuss-Hauptallergen Cor a 1 zählen insgesamt zehn untergeordnete Allergene (Cor a 1.0101 bis Cor a 1.0404). Zu Beginn der Bindungsstudien haben wir uns auf die Untersuchung des Allergens Cor a 1.0301 festgelegt und die oben beschriebenen Ergebnisse erzielt.

Im nächsten Schritt sollten nun diese Ergebnisse mit den weiteren neun Allergenen des Cor a 1 verglichen werden. Hierzu wurden zunächst alle zehn Sequenzen zu 12-meren Peptiden mit einem Versatz von drei Aminosäuren zerlegt. Es ergaben sich insgesamt 510 Peptide. Doppelte Peptide mit identischen Aminosäuresequenzen wurden anschließend aussortiert, sodass insgesamt 249 Peptide resultierten, die die gesamten Sequenzen aller 10 Cor a 1 Varianten widerspiegeln.

Aufgrund der großen Peptidmenge (249 Peptide für jeden Probanden und jeden Vorversuch) wurden die weiteren Inkubationen nur mit Seren von zehn Probanden (8 Haselnussallergiker und 2 Gesunde) anstatt wie zuvor von 43 Probanden (26 Haselnussallergiker und 17 Gesunde) durchgeführt.

In Abbildung 30 (Teil 1 und 2) sind die Inkubationsergebnisse mit Peptiden aller 10 Cor a 1 Varianten dargestellt. Gesunde Probanden zeigen innerhalb der Sequenzen oft positive Signale. Diese resultieren meist nicht von einer spezifischen Antikörperbindung des Serums, sondern entstehen durch Kreuzreaktivitäten des Detektionsantikörpers. Bei der Bewertung der Sequenzmuster wurden, wie auch bei den vorhergehenden Inkubationen, Bindungsstellen des Detektionsantikörpers nicht in die Auswertung einbezogen, da bei diesen Peptiden zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung nicht unterschieden werden kann. Spezifische IgE-Bindungen der Seren von Haselnussallergikern an die Peptide (ohne Bindung Gesunder oder des Antikörpers) findet sich bei Peptid 1 (37,5 % positive), 7 (25 %), 10 (50 %), 19 (37,5 %), 24 (50 %), 47 (25 %), 70 (87,5 %), 125 (25 %), 136 (25 %), 157 (25 %), 186 (25 %) und 213 (75 %).

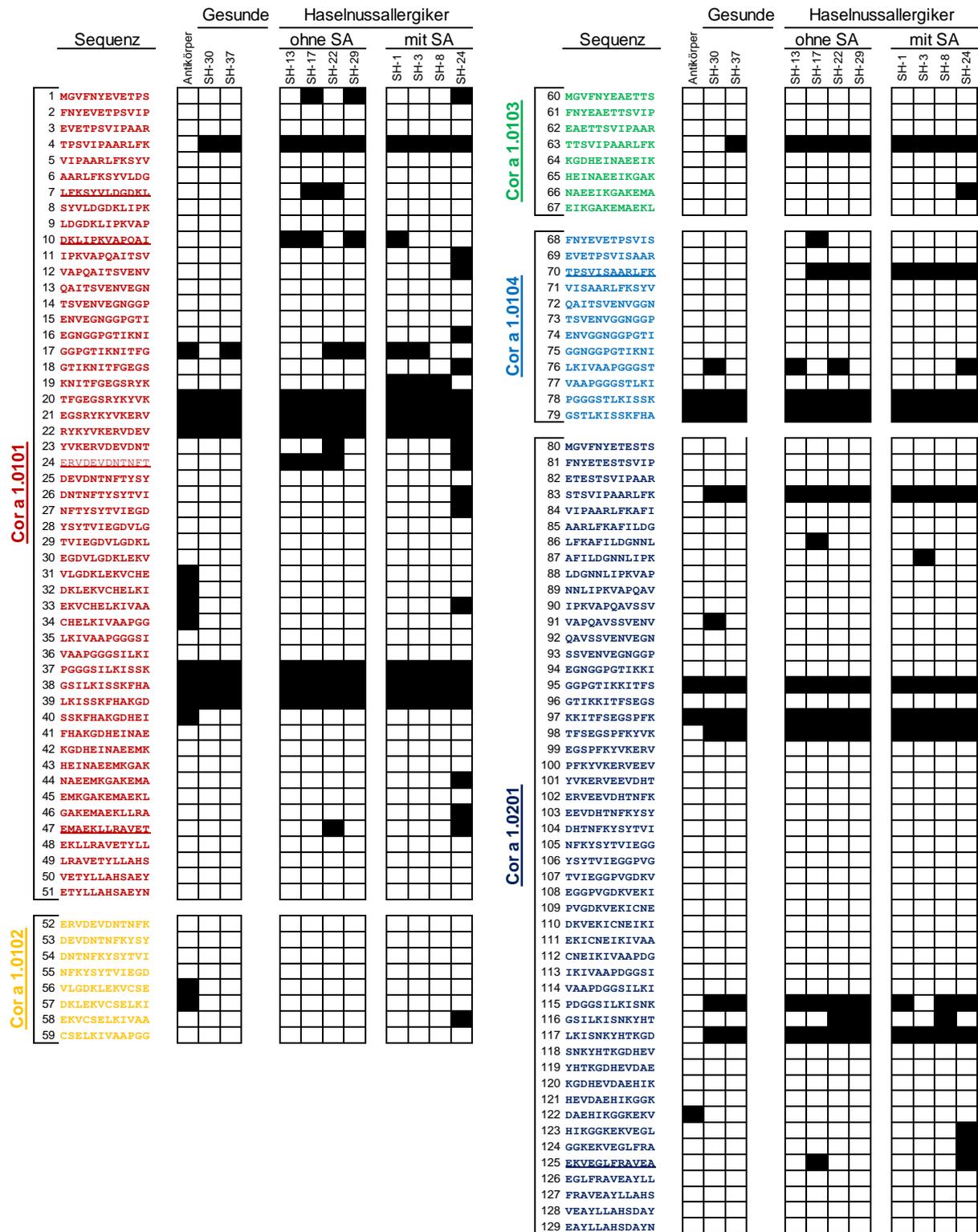
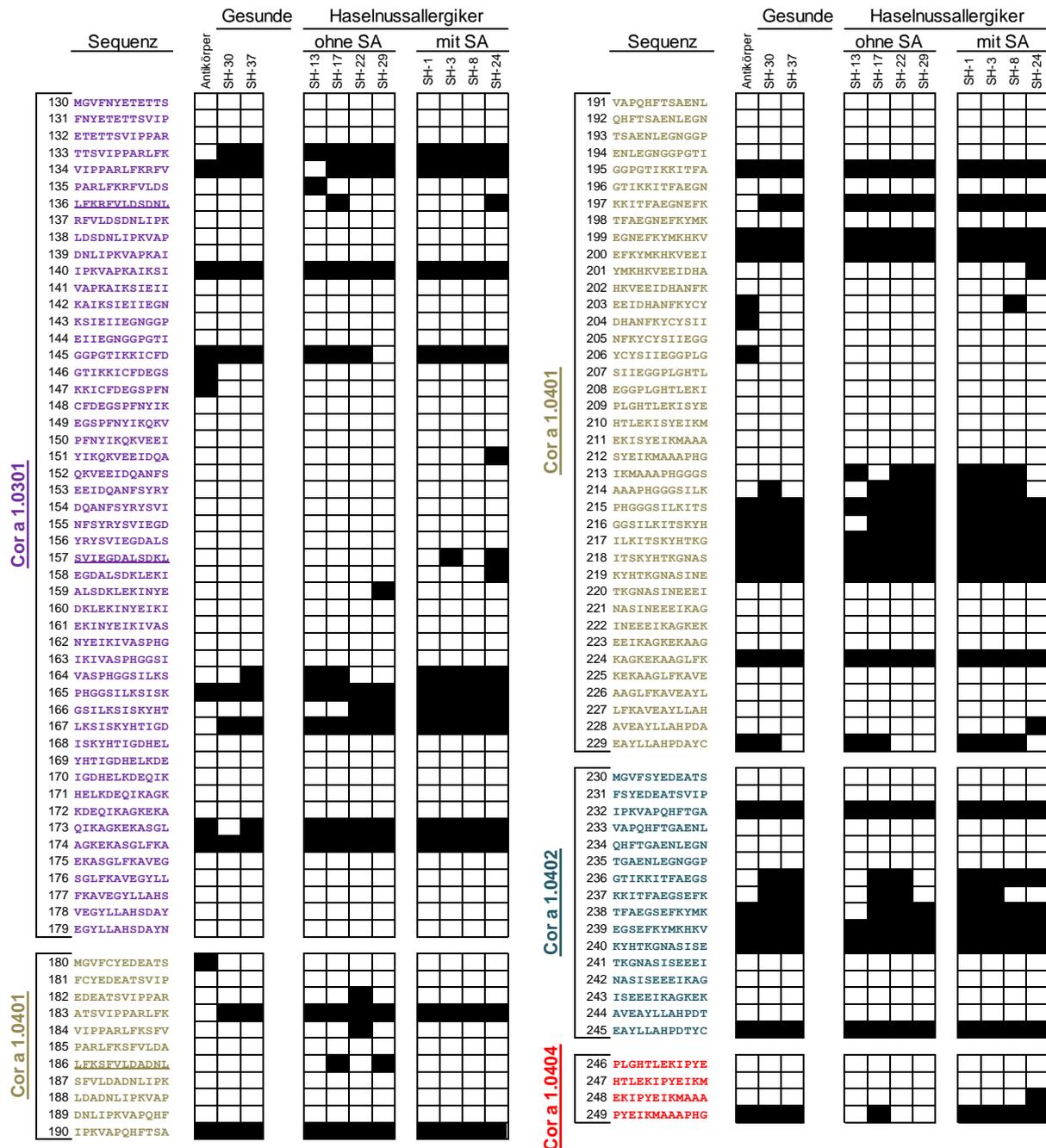


Abbildung 30 Teil 1: Ergebnisse mit Peptiden der Sequenzen Cor a 1.0101 bis Cor a 1.0201
 Auf der linken Seite sind die Spot-Nummern auf der Membran mit den entsprechenden Peptidsequenzen (12-mer, Versatz von 3 Aminosäuren) dargestellt. Doppelte Peptidsequenzen wurden aussortiert und erscheinen nur einmal. Die übrigen Sequenzen sind farblich voneinander abgegrenzt. Die Seren wurden einzeln untersucht. Die Inkubationen erfolgten nach dem optimierten Protokoll, wie oben beschrieben. Schwarze Kästchen beim Antikörper markieren unerwünschte kreuzreaktive Bindung des Antikörpers zu den Peptiden. Schwarze Kästchen bei den Probanden markieren eine spezifische IgE-Bindung aus dem Serum zu den Peptiden.



der Literatur beschriebenen T-Zell-Epitopen [81] von Bet v 1 und Api g 1 verglichen (Abbildung 31).

P-Schleife

Bet v 1.0101 MGVFNYETETTSVIPAAARL**FKAFIL**DGDNLF**PKVAPQ**AISSVENIE**GNGGPGT**IKKI
 1 10 20 30 40 50
 Cor a 1.0101 MGVFNYEVETPSVIPAAAR**L**FKSYVLDGDKL****IPKVAPQAITSVENVE**GNGGPGT**IKNI
 Cor a 1.0102 MGVFNYEVETPSVIPAAAR**L**FKSYVLDGDKL****IPKVAPQAITSVENVE**GNGGPGT**IKNI
 Cor a 1.0103 MGVFNYEAETTSVIPAAAR**L**FKSYVLDGDKL****IPKVAPQAITSVENVE**GNGGPGT**IKNI
 Cor a 1.0104 MGVFNYEVETPSVISAAR**L**FKSYVLDGDKL****IPKVAPQAITSVENVG**GNGGPGT**IKNI
 Cor a 1.0201 MGVFNYETESTSVIPAAAR**L**FKAFIL**DGNNL**IPKVAPQAVSSVENVE**GNGGPGT**IKKI
 Cor a 1.0301 MGVFNYETETTSVIPPAR**L**FKRFVLDSDNL****IPKVAPKAIKSIETIE**GNGGPGT**IKKI
 Cor a 1.0401 MGVFNCYEDEATSVIPPAR**L**FKSFVLDADNL****IPKVAPQHFTSAENLE**GNGGPGT**IKKI
 Cor a 1.0402 MGVFSYEDATSVIPPAR**L**FKSFVLDADNL****IPKVAPQHFTGAENLE**GNGGPGT**IKKI
 Cor a 1.0403 MGVFNCYEDEATSVIPPAR**L**FKSFVLDADNL****IPKVAPQHFTGAENLE**GNGGPGT**IKKI
 Cor a 1.0404 MGVFSYEDATSVIPPAR**L**FKSFVLDADNL****IPKVAPQHFTSAENLE**GNGGPGT**IKKI
 1 10 20 30 40 50
Api g 1.0101 MGVQTHVLELTSSVSAEK**I**FOGFVIDVD**TV**LPKAAPGAYKSVEIK-**GDGGPGT**LKIIT

Bet v 1.0101 SFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTNFYKYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDG-GS
 60 70 80 90 100 110
 Cor a 1.0101 TFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFYSYTVIEGDVLGDKLEKVCHELKIVAAPGG-GSI
 Cor a 1.0102 TFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFYSYTVIEGDVLGDKLEKVCSELKIVAAPGG-GSI
 Cor a 1.0103 TFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFYSYTVIEGDVLGDKLEKVCHELKIVAAPGG-GSI
 Cor a 1.0104 TFGEGSRYKYVKERVDEVDNTNFYSYTVIEGDVLGDKLEKVCSELKIVAAPGG-GS**T**
 Cor a 1.0201 TFSEGSFPKYVKERVVEVDHTNFYKYSYTVIEGGPVGDKVEKICNEIKIVAAPDG-GSI
 Cor a 1.0301 **CFDEGS**PFNY**IK**QKVEEID**Q**ANFSYRSVIEGD**ALS**DKLEKINYEIKIVASPH**G-GSI**
 Cor a 1.0401 TFAEGNEFKYMKHKVVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKISYE**IKMAAAPHGGSSI**
 Cor a 1.0402 TFAEGSEFKYMKHKVVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKISYE**IKMAAAPHGGSSI**
 Cor a 1.0403 TFAEGSEFKYMKHKVVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKISYE**IKMAAAPHGGSSI**
 Cor a 1.0404 TFAEGNEFKYMKHKVVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKIPYE**IKMAAAPHGGSSI**
 60 70 80 90 100 110
Api g 1.0101 LPDGGPITMTLRIDGVNKEALTFDYSVIDGDILLGFIESIENHV**VLVPTADGSSI**

Bet v 1.0101 ILKISNKYHTKGDHEVKAEOVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
 120 130 140 150
 Cor a 1.0101 LKISSKFHAKGDHEINAEEEMKGAK**EMA**EKLLRAVET****YLLAHSAEYN
 Cor a 1.0102 LKISSKFHAKGDHEINAEEEMKGAK**EMA**EKLLRAVET****YLLAHSAEYN
 Cor a 1.0103 LKISSKFHAKGDHEINAEEIKGAK**EMA**EKLLRAVET****YLLAHSAEYN
 Cor a 1.0104 LKISSKFHAKGDHEINAEEEMKGAK**EMA**EKLLRAVET****YLLAHSAEYN
 Cor a 1.0201 LKISNKYHTKGDHEVDAEHIKGGKEKVEGLFRAVEAYLLAHSDAYN
 Cor a 1.0301 **LKSISKYHT**IGDHELKDEQIKAGKEKASGLFKAVEGYLLAHSDAYN
 Cor a 1.0401 LKITSKYHTKGNASINEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPDAYC
 Cor a 1.0402 LKITSKYHTKGNASISEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPDTC
 Cor a 1.0403 LKITSKYHTKGNASISEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPDTC
 Cor a 1.0404 LKITSKYHTKGNASINEEIKAGKEKAAGLFKAVEAYLLAHPDAYC
 120 130 140 150
Api g 1.0101 **CKT**AI**FHT**KGDVVPEENIKY**ANEQNTALFKALEAYLIAN**

Abbildung 31: Sequenzalignment über Bet v 1.0101, 10 Cor a 1 Sequenzen und Api g 1.0101

Die Sequenzen und ihre Zugangsnummern sind (von oben nach unten): Bet v 1.0101 Birken-Hauptallergen (*Betula verrucosa*, P15494), Cor a 1 Haselnuss-Hauptallergen (*Corylus avellana*) Cor a 1.0101 (Q08407), Cor a 1.0102 (Q08407), Cor a 1.0103 (Q08407), Cor a 1.0104 (Q08407), Cor a 1.0201 (Q39453), Cor a 1.0301 (Q39454), Cor a 1.0401 (Q9SWR4), Cor a 1.0402 (Q9FPK4), Cor a 1.0403 (Q9FPK3), Cor a 1.0404 (Q9FPK2), Api g 1.0101 Sellerie-Hauptallergen (*Apium graveolens*, P49372). Fett und unterstrichen sind spezifisch IgE-bindende Regionen

innerhalb der Sequenz dargestellt. Kursiv und mit einer Wellenlinie unterstrichen ist der bindende Bereich der Glycin-reichen Schleife wiedergegeben. Unspezifische Bereiche mit positiver Bindung bei Gesunden oder durch den Antikörper sind grau hinterlegt. Einzelne Aminosäuren, die in Bereichen unspezifischer Bindung zu einer spezifischen Bindung führen, sind als weiße Buchstaben auf dunkelblauem Hintergrund dargestellt. Gerade und wellenförmig unterstrichene Bereiche auf der Bet v 1 Sequenz markieren die beschriebenen T-Zell-Epitope aus der Arbeit von Bohle et al. [81]. In Rot, Blau und Gelb sind die korrespondierenden gefundenen Bereiche von Api g 1 und Cor a 1.

Interessanterweise bildeten sich nun konsistente Muster heraus. Alle Sequenzen zeigten eindeutig drei bindende Cluster. Die erste Region umfasst die Aminosäuren 19 bis 30 aller Sequenzen. Hier findet sich spezifische Bindung auf allen Cor a 1 Sequenzen, auf der Api g 1 und auf der Bet v 1 Sequenz mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit. Die zweite Region umfasst die Aminosäuren 47 bis 63 und beinhaltet die hoch konservierte Glycin-reiche P-Schleife der PR-10 Proteinfamilie. Die dritte Region umfasst die Aminosäuren 103 bis 123 und ist bereits als diskontinuierliches Epitop der PR-10 Familie diskutiert worden [21].

Die identifizierten Regionen werden spezifisch sowohl von Sellerie- als auch Haselnussallergikern erkannt und liegen innerhalb der konservierten Oberflächen-Patches, die bereits als putative kreuzreaktive Epitope zwischen Api g 1 und Bet v 1 in der Literatur vermutet wurden [21].

Im nächsten Schritt wurden die identifizierten Regionen mithilfe des STRAP-Alignment-Programms auf die dreidimensionale Struktur der Proteine Api g 1 und Cor a 1 projiziert (Abbildung 32).

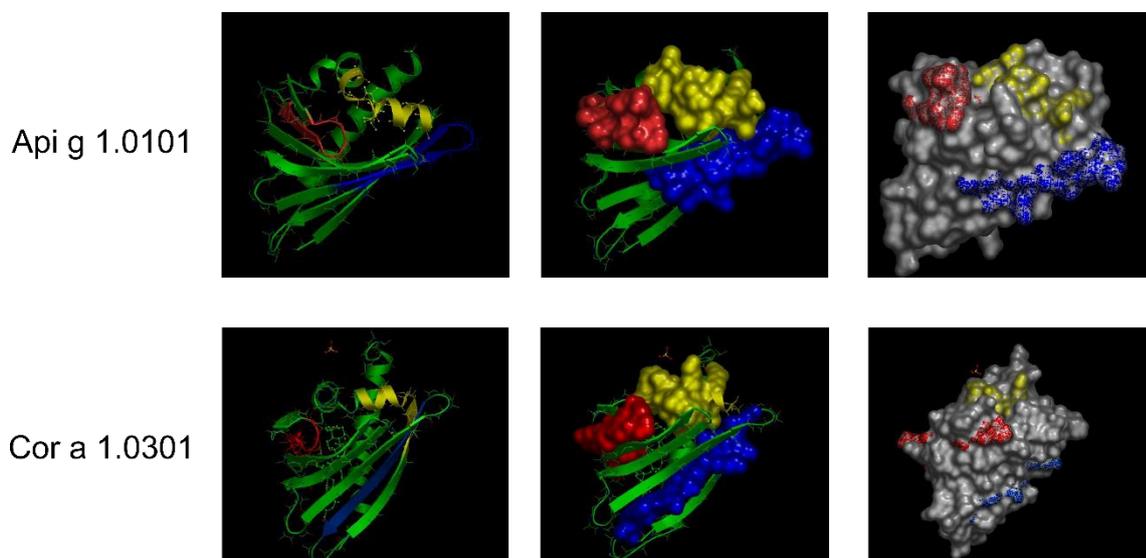


Abbildung 32: Dreidimensionale Darstellung von Api g 1.0101 und Cor a 1.0301

Links ist das Backbone mit der Sekundärstruktur der beiden Moleküle dargestellt. Rechts ist die Proteinoberfläche mit der vollständigen Molekülstruktur wiedergegeben. Die drei identifizierten Regionen sind gelb (AS 16-30), rot (AS 47-63) und blau (103-123) dargestellt. In der Mitte wurden, zur Verdeutlichung der räumlichen Lage, die drei Regionen in der vollständigen Molekülstruktur auf dem Backbone dargestellt.

Abbildung 32 zeigt, dass nicht alle Aminosäuren der identifizierten Areale an der Antikörperbindung beteiligt sind. Viele Aminosäuren werden in der dreidimensionalen Struktur verdeckt und sind nicht an der Oberfläche zugänglich.

In der ersten Region (AS 16 – 30: AEKIFQGFVIDTDTV, gelb dargestellt) sind die Aminosäuren A16 (A16 = Alanin an Aminosäureposition 16), E17, K18, I19, Q21, G22, I25, D26, V27, D28, T 29 und V30 gut zugänglich. Die Aminosäuren F20, F23 und V24 liegen in der 3D-Struktur verdeckt und sind weniger an der Bindung beteiligt.

In der zweiten Region (AS 46 – 63: GDGGPGTLKIITLPDGGP, rot dargestellt) sind vor allem die Aminosäuren G46, D47, G48, G49, P50, G51, T52, P59, D60, G61, G62 und P 63 an der Bindung beteiligt. Der mittlere Abschnitt mit den Aminosäuren L53, K54, I55, I56, T57 und L58 ist dagegen schwer zugänglich in der 3D-Struktur des Gesamtproteins. Bei der dritten Region (AS 103 – 123: VLVPTADGG SICKTTAIFHTK ist vor allem der mittlere Abschnitt A108, D109, G110, G111, S112 prominent. Im Gegensatz dazu wird der Bereich T116, T117, A118, I119 und F120 verdeckt.

Um die Spezifität der Bindung zu untersuchen, wurde die Aminosäuresequenz der beiden ersten putativen Epitope von Api g 1 (AS 16-27 und AS 46-57) mutiert.

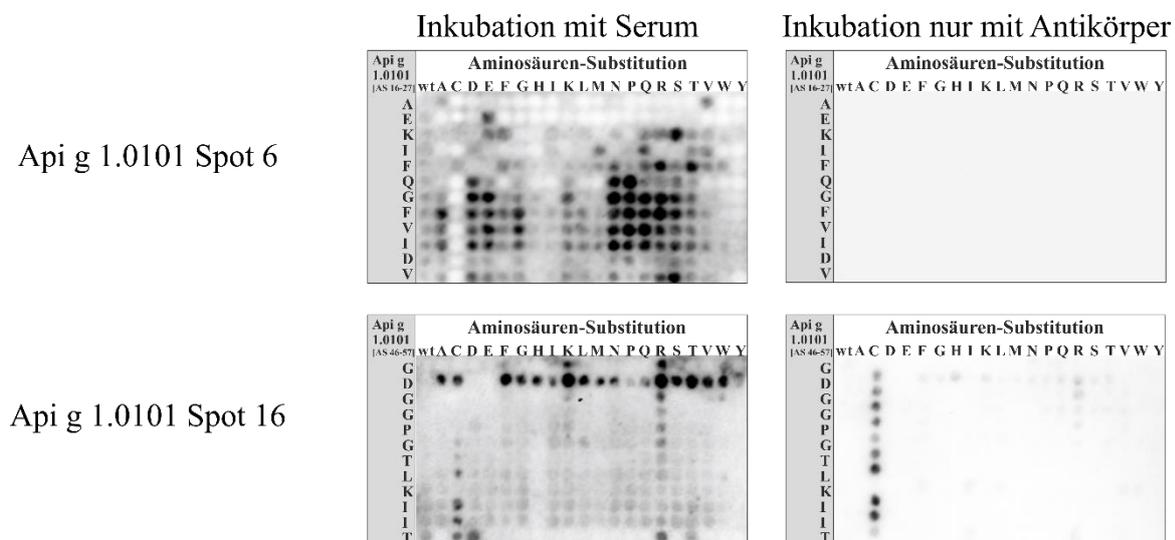


Abbildung 33: Mutationsanalyse der Api g 1.0101 Sequenz (Spots 6 und 16)

Dargestellt sind Mutationsanalysen der Api g 1-Peptide AEKIFQGFVIDV (oben) und GDGGPGTLKIIT (unten). Links auf den Membranen ist jeweils die Originalsequenz = „Wildtyp“ synthetisiert. Jede Position der Sequenz wird durch jede Aminosäure von links nach rechts ersetzt, unter Beibehalten der restlichen 11 Aminosäuren. In der linken Spalte sind die Inkubationsergebnisse mit IgE-Bindungen nach Inkubation mit Serum von Sellerieallergikern und rechts zur Kontrolle, ohne Serum, nur nach Inkubation mit dem Detektionsantikörper dargestellt.

Dafür wurden die Api g 1 Spots 6 und 16 ausgewählt. Jede der Sequenzen wurde systematisch mutiert. Das heißt, jede Aminosäure der 12-meren Sequenz wurde durch 20 Aminosäuren nacheinander substituiert. In Abbildung 33 ist in der ersten Spalte 12-mal untereinander der „Wildtyp“ der Api g 1.0101 Sequenz zu sehen. Links ist die Sequenz des „Wildtyps“ von oben nach unten aufgelistet. In der ersten Spalte wird nun die erste Aminosäure der Sequenz nacheinander durch andere Aminosäuren (obere Beschriftung) unter Beibehaltung der übrigen elf Aminosäuren ausgetauscht. Und so wird Spalte für Spalte die zweite, dritte, vierte usw. Aminosäure ausgetauscht, immer unter Beibehaltung der übrigen elf Aminosäuren. Nach diesem Prinzip können an jeder Stelle des Peptids Punktmutationen mit allen Aminosäuren generiert werden.

Bei der ersten Sequenz AEKIFQGFVIDV spielen Alanin (A) und Glutaminsäure (E) eine essentielle Rolle. Bei dem Austausch von Alanin durch jegliche Aminosäuren (außer Valin (V)) und dem Austausch von Glutaminsäure erlischt die IgE-Bindung. Der Austausch der Aminosäuren QGFVI durch Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Asparagin (N), Prolin (P), Glutamin (Q), Arginin (R) und Serin (S) führt jeweils zur gesteigerten IgE-Bindung. Der Austausch jeglicher Position durch die Aminosäuren Cystein (C), Histidin (H), Isoleucin (I), Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) bewirkt, bis auf wenige Ausnahmen, eine abgeschwächte IgE-Bindung.

Bei der zweiten Sequenz GDGGPGTLKIIT handelt es sich um die hoch konservierte Glycinreiche Schleife der PR10-Proteinfamilie. Entsprechend der natürlichen Sequenzvariation innerhalb der PR10-Familie führt der Austausch von Asparaginsäure (D) durch alle Aminosäuren, außer Glutaminsäure (E) und Tyrosin (Y), zu einer deutlich gesteigerten IgE-Bindung. Wird in dieser Sequenz eine beliebige Position gegen Cystein (C) ausgetauscht, kommt es zur gesteigerten Bindung, jedoch nicht durch IgE, sondern durch den Detektionsantikörper.

Als Grund für diese starke Bindung wäre eine Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Schwefel-Atomen zweier Cystein-Moleküle denkbar. Genau diese chemische Reaktion führen Peroxidasen durch. Die Sulfhydrylgruppe (-SH) des Cysteins wird durch die Peroxidase oxidiert und lagert sich mit einer analogen SH-Gruppe zu einer Disulfidbrücke zusammen. In unserem konkreten Fall wäre diese Reaktion durch die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen cysteinhaltigem Peptid und Detektionsantikörper (Cystein zwischen Fc und Fab-Teil des Antikörpers) durch die Meerrettichperoxidase (HRP) denkbar.

Die doppelt vorkommende Aminosäure Threonin (T) ist für die IgE-Bindung essentiell und kann nur durch Cystein (C), Asparaginsäure (D) und Arginin (R) ausgetauscht werden, sonst droht ein Verlust der Bindung. Der Austausch jeglicher Position durch Histidin (H), Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) führt, wie bereits bei Peptid 6, zur abgeschwächten IgE-Bindung. Bis auf diese drei genannten Aminosäuren kann sonst der Bereich TLKII durch alle Aminosäuren ohne Bindungsverlust ausgetauscht werden.

Werden nun diese Erkenntnisse auf die Bet v1 und die 10 Cor a 1 Sequenzen (Abbildung 34) übertragen, wird deutlich, dass die meisten natürlichen Mutationen im ersten Epitop zu einer gleich starken Bindung zu Bet v1 und einer sogar gesteigerten (durch Einbau von Serin (S)) Bindung zu den Cor a 1 Peptiden führen.

Im zweiten hoch konservierten Epitop (Glycin-reiche Schleife) führt die natürliche Mutation von Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N) zu einer deutlichen Steigerung der IgE-Bindung. Der Austausch von Threonin (T) ist kritisch für die Bindung und daher über die Sequenzen hinweg konserviert. Die zwischen den beiden Threonin liegende Sequenz LKII kann nach Belieben durch andere Aminosäuren ohne Bindungsverlust ausgetauscht werden.

Bet v 1.0101	MGVFN	YETET	TSVIP	AA	LFKAF	ILDGD	NL	LPKV	APQAI	SSVEN	IE	GNGGP	GT	IKKIS		
	1	10	20	30	40	50										
Cor a 1.0101	MGVFN	YEVE	TSP	VIP	AA	LFKSY	VLDGDKL	IPKV	APQAI	TSVEN	VE	GNGGP	GT	IKKNIT		
Cor a 1.0102	MGVFN	YEVE	TSP	VIP	AA	LFKSY	VLDGDKL	IPKV	APQAI	TSVEN	VE	GNGGP	GT	IKKNIT		
Cor a 1.0103	MGVFN	YEAET	TSVIP	AA	LFKSY	VLDGDKL	IPKV	APQAI	TSVEN	VE		GNGGP	GT	IKKNIT		
Cor a 1.0104	MGVFN	YEVE	TSP	VISA	AA	LFKSY	VLDGDKL	IPKV	APQAI	TSVEN	VG	GNGGP	GT	IKKNIT		
Cor a 1.0201	MGVFN	YETE	TEST	SVIP	AA	LFKAF	ILDGN	NL	IPKV	APQAV	SSVEN	VE	GNGGP	GT	IKKIT	
Cor a 1.0301	MGVFN	YETE	TTSVIP	IP	AA	LFKR	FVLD	SDNL	IPKV	APKAI	KSIE	IE	GNGGP	GT	IKKIC	
Cor a 1.0401	MGVFC	YEDE	ATS	SVIP	AA	LFKSF	VLDAD	NL	IPKV	APQH	FHTSA	EN	GNGGP	GT	IKKIT	
Cor a 1.0402	MGVFS	YEDE	ATS	SVIP	AA	LFKSF	VLDAD	NL	IPKV	APQH	FHTGA	EN	GNGGP	GT	IKKIT	
Cor a 1.0403	MGVFC	YEDE	ATS	SVIP	AA	LFKSF	VLDAD	NL	IPKV	APQH	FHTGA	EN	GNGGP	GT	IKKIT	
Cor a 1.0404	MGVFS	YEDE	ATS	SVIP	AA	LFKSF	VLDAD	NL	IPKV	APQH	FHTSA	EN	GNGGP	GT	IKKIT	
	1	10	20	30	40	50										
Api g 1.0101	MGVQ	THVLE	LTS	SVSA	AEK	IFOG	FVID	VDTV	LPKA	APGAY	KSVE	IK	GD	GGP	GT	IKKIT

Abbildung 34: Sequenzalignment über die ersten 58 Aminosäuren der Bet v 1.0101-, 10 Cor a 1- Api g 1.0101-Sequenz

Die Sequenzen und ihre Zugangsnummern sind (von oben nach unten): Bet v 1.0101 Birken-Hauptallergen (*Betula verrucosa*, P15494), Cor a 1 Haselnuss-Hauptallergen (*Corylus avellana*) Cor a 1.0101 (Q08407), Cor a 1.0102 (Q08407), Cor a 1.0103 (Q08407), Cor a 1.0104 (Q08407), Cor a 1.0201 (Q39453), Cor a 1.0301 (Q39454), Cor a 1.0401 (Q9SWR4), Cor a 1.0402 (Q9FPK4), Cor a 1.0403 (Q9FPK3), Cor a 1.0404 (Q9FPK2), Api g 1.0101 Sellerie-Hauptallergen (*Apium graveolens*, P49372). Fett und unterstrichen sind spezifisch IgE-bindende Regionen innerhalb der Sequenz dargestellt. Kursiv und mit einer Wellenlinie unterstrichen ist der bindende Bereich der Glycin-reichen Schleife wiedergegeben. Innerhalb des ersten Epitops (AS 17 – 30) sind identische AS gelb und innerhalb des zweiten Epitops (AS 46 – 57) sind identische AS rot hinterlegt. Ein Aminosäurenaustausch (in Bezug auf die Api g 1 Sequenz) mit gleich starker IgE-Bindung ist bei beiden Epitopen orange unterlegt. Bei einem Aminosäurenaustausch, der zur verstärkten IgE-Bindung führt, ist die AS rot und fett gedruckt. Bei einem Aminosäurenaustausch, der zum Verlust der IgE-Bindung führt, bleibt der Hintergrund innerhalb des Epitops weiß.

Somit konnte durch den Versuch gezeigt werden, dass die Substitutionsanalyse in der SPOT-Synthese geeignet ist, Epitope auf höhere und niedrigere IgE-Reaktivität zu untersuchen.

Zusätzlich erlaubt diese Methode Rückschlüsse über die Bindung der kreuzreaktiven Epitope innerhalb der pollenassoziierten Nahrungsmittelallergene der PR10-Familie.

5 Diskussion

5.1 Sensibilisierungsprofile bei Sellerie- und Haselnussallergikern

Für die vorliegende Arbeit wurden 33 anamnestisch gesunde Probanden als Kontrollgruppe rekrutiert, von denen 30 mittels SPT untersucht wurden. Keiner der gesunden Probanden wies klinische Symptome einer Allergie auf, jedoch konnte bei 30 % (9/30) der Probanden eine positive Reaktion im SPT nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben [62, 64], wird der SPT häufig zur Identifizierung einer atopischen Prädisposition eingesetzt. Demnach hätten 30 % unserer gesunden Probanden eine atopische Prädisposition. Interessant wäre es im Verlauf zu untersuchen, bei wie vielen Probanden sich im Verlauf tatsächlich eine klinisch relevante Allergie entwickelt. Die gesunden Probanden waren durchschnittlich 26 Jahre alt, sodass die Sensibilisierungen möglicherweise auf das Risiko einer Allergieentstehung hinweisen. Andererseits zeigen die Ergebnisse, wie wichtig es ist, Sensibilisierungen mithilfe einer sorgfältigen Anamnese zu überprüfen bzw. anamnestische „Negativ“-Kontrollen für Serum-Assays mittels eines Hauttests zu überprüfen.

Bei den Haselnussallergikern konnte in 93 % der Fälle und bei den Sellerieallergikern in 78 % der Fälle die anamnestische Angabe der Allergie mittels der DBPCFC bestätigt werden. Auf den ersten Blick widerspricht diese hohe Bestätigungsrate aktuellen Studienergebnissen [82]. Demzufolge wird nur jeder 6. bis 10. geäußerte Verdacht klinisch bestätigt [1]. Ein Grund dafür könnte in der Rekrutierung der allergischen Probanden über das Allergie-Centrum-Charité liegen. In die Hochschulambulanz der Universitätsklinik werden meist vordiagnostizierte Patienten aus dem ambulanten niedergelassenen Bereich überwiesen. Dadurch kommt es zu einer Selektion des Patientenkollektivs. Dies kann die hohe Bestätigungsrate der anamnestischen Angaben im Vergleich zur unselektierten Allgemeinbevölkerung begünstigen.

96 % (25/26) der Haselnussallergiker waren primär über Birkenpollen sensibilisiert. Nur ein einziger Allergiker (SH-17) hatte eine primäre Typ-1-Haselnussallergie ohne Pollensensibilisierung. 100 % (21/21) der Sellerieallergiker zeigten eine Sensibilisierung gegenüber Birkenpollen. Hier erfolgte die Sensibilisierung ausschließlich sekundär (Typ-2-Allergie) [81]. Dieses Ergebnis war im Vorfeld durch die immunologische Kreuzreaktivität von

Bet v 1 zu Cor a 1 [83, 84] und Api g 1 [21, 81] zu erwarten. Eine frühere Studie konnte bereits auf T-Zell-Ebene die primäre Sensibilisierung über kreuzreaktive Epitope von Bet v 1 und daraus resultierender Sensibilisierung zu Cor a 1 und Api g 1 nachweisen [42]. Es wird vermutet, dass (abgesehen von Haselnuss und Karotte) Bet v 1-assoziierte Nahrungsmittelallergene nicht in der Lage sind eine primäre Sensibilisierung auszulösen [85]. Diese Befunde sind mit dem Sensibilisierungsmuster unserer Probanden vergleichbar.

Des Weiteren zeigte unser Probandenkollektiv eine hohe Sensibilisierungsrate gegenüber Gräsern (81 % der HN-Allergiker und 86 % der SE-Allergiker) und Beifuß (54 % der HN-Allergiker und 57 % der SE-Allergiker) auf. Diese Verteilung stimmt mit den bisher beschriebenen Sensibilisierungsmustern für diese Allergene überein. Für Nord-, Zentral- und Osteuropa sind die Birkenpollen, gefolgt von Gräser- und Beifußpollen führende Aeroallergene, die eine allergische Rhinitis auslösen [86].

5.2 Korrelation des Prick-Testes und des spezifischen IgE mit der klinischen Symptomatik

Innerhalb der HN-Allergiker und SE-Allergiker korrelierte die Quaddelgröße sehr gut mit dem sIgE (Korrelation nach Pearson, Haselnuss $p = 0,021$, Sellerie $p = 0,049$). Werden aber die Gruppen miteinander verglichen, dann fällt auf, dass HN-Allergiker eine geringe Streubreite der Quaddelgröße (3 – 8 mm mit Median bei 5 mm) bei moderaten sIgE-Werten (Mittelwert 19,83 kU/l) zeigen. Dagegen weisen SE-Allergiker eine große Streubreite in der Quaddelgröße (3 – 15 mm mit Median bei 5 mm) bei niedrigeren sIgE-Werten (Mittelwert 3,71 kU/l) auf. Als Ursache für diese Beobachtung wäre hier eine irritative Komponente bei der Testung mit frischer Sellerieknolle denkbar. In beiden Gruppen nehmen die Quaddelgrößen, das Gesamt-IgE und die sIgE-Werte deutlich mit steigender Anzahl atopischer Erkrankungen zu (Rhinitis + Asthma + Atopische Dermatitis). Die positiven Korrelationen sind aufgrund der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen möglich (hohe sIgE-Werte, höhere Beladung von Mastzellen mit sIgE, stärkere Degranulation bei Allergenkontakt im Gewebe während des Prick-Tests).

Kritisch ist jedoch die Übertragung dieser Befunde auf die klinische Symptomatik. Zum einen finden sich im klinischen Alltag viele Patienten mit positiven SPT und sIgE gegenüber Sellerie oder Haselnuss als ausschließliche Sensibilisierung ohne jegliche Relevanz [82]. Zum anderen kann die positive Korrelation nicht die Schwere der allergischen Reaktion vorhersagen. Zwar zeigten die Haselnuss- und Sellerieallergiker mit schwereren Reaktionen auch tendenziell höhere sIgE-Werte, jedoch konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. In der Gesamtbetrachtung hatten die Haselnuss- und Sellerieallergiker einen vergleichbaren Gesamtscore (HN-Allergiker 4,25 Punkte, SE-Allergiker 4,5 Punkte), obwohl die sIgE-Werte für Haselnuss (Durchschnitt 19,83 kU/l) deutlich höher lagen als die für Sellerie (Durchschnitt 3,71 kU/l). Auch die Quaddelgrößen im SPT in den Gruppen korrelierten nicht mit der klinischen Symptomatik. Diese Erkenntnisse stimmen gut mit den bisher veröffentlichten Studien überein und unterstreichen die besondere Bedeutung der Anamnese bzw. Provokationstestung zur Bestätigung einer Nahrungsmittelallergie [3, 87].

5.3 Einfluss von Geschlecht und dem atopischen Profil auf die klinische Symptomatik bei Sellerie- und Haselnussallergikern

Eine Reihe weiterer Faktoren spielen für die allergische Reaktion eine Rolle. In der Literatur sind Geschlechtsunterschiede als ein relevanter Faktor beschrieben worden. Tatsächlich wiesen unsere Probanden ein interessantes Reaktionsmuster auf. In beiden Gruppen hatten die Männer ein deutlich höheres Gesamt-IgE und sIgE gegenüber Haselnuss und Sellerie, was rein spekulativ eine stärkere Reaktion erwarten ließ. Bei Auftreten einer klinischen Reaktion, reagierten die Frauen jedoch stärker. Vor allem bei den subjektiven Symptomen zeigten die Frauen die höchsten Werte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Soost et al. überein [88]. In einer allgemeinen Bevölkerungsumfrage mit einer Stichprobe von 13300 Einwohnern aus der Berliner Bevölkerung konnten sie für Frauen ein höheres Risiko für allergische Symptome einer NMA und ein höheres Risiko einer mittels DBPCFC-bestätigten NMA ermitteln. Dagegen hatten die Männer eine höhere Prävalenz von Nahrungsmittel-spezifischer IgE-Sensibilisierung und ein höheres Gesamt-IgE als Frauen [88].

Um die Unterschiede in der Reaktionsstärke bei der Provokation genau erfassen zu können, verwendeten wir einen klinischen Symptomenscore, der von Dölle et al. bereits erfolgreich zur

Untersuchung von Tomatenallergikern eingesetzt wurde [59]. Er ermöglicht es trotz Halbierung der überaus häufigen subjektiven Symptome der Probanden, geringe Unterschiede im Reaktionsmuster zu erfassen, und eignet sich somit gut für die weiteren Untersuchungen der Sortenunterschiede.

Die Gegenüberstellung beider Gruppen zeigt, dass die Haselnuss häufiger objektive Symptome während der DBPCFC als Sellerie ausgelöst hat, wobei die Schwere der Symptome proportional zur Anzahl atopischer Erkrankungen (Rhinitis + Asthma + Atopische Dermatitis) zunahm. Genau den gleichen Effekt konnten wir bereits bei der Quaddelgröße, dem Gesamt- und sIgE feststellen, so dass aus klinischer Sicht die Anzahl und Schwere der vorbestehenden atopischen Erkrankungen eine bessere Einschätzung über die zu erwartende Schwere der allergischen Reaktion erlaubt als das Ausmaß des Prick- oder IgE-Werts.

Im Gegensatz zu den objektiven Symptomen waren die subjektiven Symptome sehr variabel und korrelierten nicht mit dem atopischen Profil. Hier spielt auch die persönliche Wahrnehmung des Patienten eine große Rolle. Außerdem spielen erlebte schwere Reaktionen in der Vorgeschichte eine große emotionale Rolle, so dass die Patienten bereits ein leichtes Kribbeln als sehr bedrohlich oder stark ausgeprägt empfinden können.

In Zusammenschau reagieren im vorliegenden Kollektiv Frauen stärker als Männer und berichteten deutlich häufiger über subjektiv wahrgenommene Symptome. In Hinsicht auf objektive Messgrößen (IgE, SPT und objektive Symptome) zeigte sich ein statistischer Einfluss zur Anzahl bestehender atopischer Erkrankungen.

5.4 Bedeutung verschiedener Sorten und Anbaubedingungen bei Sellerieallergie

Sellerie wird in der europäischen Küche sehr häufig eingesetzt und ist vor allem in vielen industriellen Fertigprodukten, Suppen und Salaten enthalten. Es finden sich unzählige Sorten auf dem Frischmarkt, wobei nur einzelne Sorten bevorzugt von der Industrie verarbeitet werden. Ein größerer Prozentsatz von Patienten mit pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien reagiert allergisch auf Sellerie. Von anderen Nahrungsmitteln ist bereits bekannt, dass verschiedene Sorten eines pflanzlichen Nahrungsmittels eine unterschiedliche Allergenität aufweisen können [29, 58, 59, 89, 90]. Aufgrund der Relevanz und weiten Verbreitung von Sellerie bestand ein

Teil dieser Arbeit darin, die Allergenität verschiedener Sorten von Knollensellerie und den Einfluss von Trockenstress beim Anbau auf die Allergenität von Sellerie zu untersuchen.

5.4.1 Einfluss der Sortenart und Anbaubedingungen im SPT

Es wurden zunächst zehn verschiedene Selleriesorten von Knollensellerie (Anita, Bergers weiße Kugel, Brilliant, Goliath, Ibis, Kojak, Mars, Monarch, Prinz und Rex) bei 19 nachgewiesenen (DBPCFC) Sellerieallergikern mittels SPT untersucht. Im Median lösten alle Sorten eine Quaddel von 5 – 6 mm aus, wobei die Werte sehr stark schwankten (2 – 19 mm). Die Sorten Anita, Bergers weiße Kugel, Ibis, Monarch und Prinz wiesen im Vergleich zu den anderen Sorten eine geringere Streuung (3 – 9 mm) auf. Vier der getesteten Sorten (Anita, Bergers weiße Kugel, Mars und Rex) zeichneten sich durch eine besonders hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber *Septoria* aus. *Septoria apii* gehört zur Gattung der Schlauchpilze, die meist Nekrosen auf den Blättern der Pflanze auslösen. Dabei werden die überirdischen Anteile der Pflanze befallen, verfärben sich dunkel und verdorren. Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit dieser Sorten haben wir einen höheren Anteil an PR-10 Proteinen (pathogenesis related proteins) in diesen Sorten vermutet. Tatsächlich führten die Sorten Bergers weiße Kugel, Mars und Rex zu dem höchsten Median (7 mm) im SPT. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant im Vergleich zu den anderen Sorten. Entgegen unserer Annahme, hatte die Sorte Anita die kleinste Quaddelgröße ausgelöst, trotz hoher Widerstandsfähigkeit gegen *Septoria*. Ein Grund für die Diskrepanz unserer Erwartungen könnte eine unterschiedliche Expression von PR-10 Proteinen in verschiedenen Pflanzenteilen sein. Es ist bekannt, dass Allergene aus der Bet v-Familie häufig im Fruchtfleisch, die nsLTPs oftmals in der Schale und die Speicherproteine meist in Kernen, Samen und Nüssen exprimiert werden. *Septoria* befallen die überirdischen Anteile der Pflanze, aber die Prick-Testungen wurden mit dem Fruchtfleisch der unterirdischen Sellerieknollen durchgeführt. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Expression von PR-10 Proteinen und anderen Einzelallergenen in den unterschiedlichen Pflanzenanteilen zu ermitteln.

Sellerie benötigt zum optimalen Wachstum feuchten Boden und bevorzugt moorige Gebiete. Äußere Stressfaktoren führen bei Pflanzen zu einer gesteigerten Expression von PR-10 Proteinen. Aus diesem Grund wurden zwei Sorten im Vergleich unter Trockenstress angebaut. Dafür wurden die Sorten Prinz und Monarch, aufgrund ihres großen industriellen Einsatzes und der starken Verbreitung als Gewürz in Tütensuppen ausgewählt. Trockenstress führte bei beiden

Sorten zu einer Zunahme der Streubreite. Bei der Sorte Monarch stieg der Median im SPT unter Trockenstress von 6 mm auf 7 mm an und bei der Sorte Prinz blieb der Wert unverändert. Insgesamt waren die Unterschiede nur marginal und statistisch nicht signifikant.

Die Testung von frischen Nahrungsmitteln hat den Nachteil der begrenzten Vergleichbarkeit aufgrund verschiedener Protein- und Wasseranteile der einzelnen Früchte, der Sorte oder des Reifegrades. Um die Variation im Reifegrad zu beschränken, wurden alle Untersuchungen mit frisch geerntetem Sellerie (2x pro Woche) durchgeführt, sodass die Lagerzeit der Knollen maximal drei Tage betrug (kühl, dunkel, in Papier ummantelt). Zum Vergleich der Ergebnisse innerhalb einer Sorte wurden vier verschiedene Knollen (Monarch) unter normalem Anbau und Trockenstress untersucht. Leider variierte die Streubreite sogar innerhalb einer Sorte sehr stark (4.2.2), ganz unabhängig von der Anbauart. Im Median waren die Ergebnisse vergleichbar (6 mm).

Zusammenfassend hat der Anbau unter Trockenstress vermutlich wenig Einfluss auf das allergene Potential von Knollensellerie. Anders könnte es für Stangensellerie sein, da hier vermutlich die relevanten Stress- und Abwehrproteine in den Blättern oberhalb der Erdoberfläche exprimiert werden. Die Vergleichbarkeit der Sorten untereinander ist in Anbetracht der starken Streuung der SPT-Werte bereits innerhalb einer einzigen Sorte deutlich eingeschränkt. Als Referenz einer Gruppe ist der Median am stabilsten und kann für Gruppenunterschiede von zwei Sorten herangezogen werden. Weitere Untersuchungen zur Proteinexpression in verschiedenen Pflanzenteilen von Sellerie sind notwendig, um abschließende Bewertungen über den Einfluss von Anbaubedingungen und Stressfaktoren auf die Allergenität geben zu können.

5.4.2 Klinische Reaktionen auf die Sorten Anita und Prinz

Zur Verifizierung der SPT-Ergebnisse wurden anschließend DBPCFC mit der Sorte Anita (geringste Reaktion im SPT) und der Sorte Prinz (stärkere Reaktion im SPT, weit verbreitet in Industrie und Tütensuppen) bei 16 Sellerieallergikern durchgeführt. Hierbei wurden nur solche Allergiker ausgewählt, die mindestens ein objektives Symptom in der DBPCFC mit der Screeningsorte zeigten, um eine Objektivierbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Dabei löste die Sorte Anita die geringsten Reaktionen aus. Der Gesamtscore lag bei Anita bei 3,41 Punkten, bei Prinz bei 7,13 Punkten und für Sellerie (Screeningsorte Brilliant) bei 5,47 Punkten. Dieses Ergebnis war hoch signifikant (Anita – Prinz $p = 0,001$, Anita – Sellerie $p = 0,031$). Sowohl bei

den subjektiven als auch objektiven Symptomen führte die Sorte Anita zu weniger starken Reaktionen als die anderen beiden Sorten.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Sorte Anita tatsächlich weniger allergene Bestandteile enthält oder aber, über mehr Wasseranteile verfügt, so dass ein Verdünnungseffekt für die Allergene pro Gramm Lebensmittel eintritt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden standardisierte Proteinextrakte beider Sorten hergestellt und titrierte SPT mit den Sorten Prinz und Anita durchgeführt.

Tatsächlich ergaben sich beim SPT nun keine Unterschiede mehr. Bei gleicher Proteinkonzentration waren die Quaddelgrößen für beide Sorten im Median vergleichbar (3 mm mit 10 µg/ml Protein, und 5 mm mit 100 µg/ml Protein). Das deutet darauf hin, dass die Proteine bzw. Allergene in beiden Sorten ähnlich stark exprimiert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die Sorte Anita eine höhere Wasserbindungskapazität des Fruchtfleisches aufweist und es somit zu einem Verdünnungseffekt kommt. Die geringere relative Konzentration der allergenen Bestandteile führt bei Verwendung nativer Knolle zu geringeren Reaktionen im SPT und DBPCFC.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sorte Anita sowohl im Hauttest als auch in der DBPCFC deutlich geringere Reaktionen auslöst. Anita ist eine ertragreiche Sorte mit guter Innenqualität und zeichnet sich durch eine hervorragende Widerstandsfähigkeit gegenüber Septoria aus, was sie für die Industrie zu einer lukrativen Sorte macht. Im Vergleich zu der industriell stark verbreiteten Sorte Prinz (Gewürze, Tütensuppen etc.) löst Anita aufgrund des hohen Wasseranteils weniger starke allergische Reaktionen aus. Weitere Untersuchungen zu den genauen Proteinanteilen und zur Zusammensetzung der Einzelallergene im Knollensellerie sind notwendig.

5.5 Optimierung des SPOT-Synthese-Protokolls

Ziel im zweiten Teil der Arbeit war es, ein optimiertes Protokoll zu erarbeiten, um IgE-Epitope innerhalb der Hauptallergene Api g 1 und Cor a 1 zu ermitteln. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Muster der Epitoperkennung Rückschlüsse auf die klinische Symptomatik zulassen.

Als grundlegender Baustein zur Protokolloptimierung wurde zunächst die Funktionalisierung der Grundmembran untersucht. Die Art der Funktionalisierung freier OH-Gruppen der Cellulose hat Einfluss auf die Qualität des Immunoassays. In unseren Versuchen konnten wir ein niedrigeres Hintergrundrauschen und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis bei Verwendung von N-CAPE Membranen erzielen [74]. Zusätzlich konnten wir mehr Signale auf N-CAPE- statt auf β -Ala-Membranen detektieren. Ein möglicher Grund dafür ist die stabilere Verankerung der Peptide von N-CAPE-Membranen durch die Etherbindung. Im Vergleich dazu ist die Esterbindung der β -Ala-Membran während der Abspaltung der Schutzgruppen nicht völlig stabil und führt zum Peptidverlust [79].

Eine Reihe von Publikationen [52, 70, 77, 78, 91-93] zeigen, dass neben der Funktionalisierung die Peptidbeladung (Peptiddichte) auf der Membran eine wesentliche Einflussgröße darstellt. Die besten Signale konnten bei einer Membranbeladung von ca. 700 nmol/cm² erzielt werden.

Landgraf und Kramer konnten jeweils eine gute Korrelation zwischen der gemessenen Signalintensität und der Affinität der Ligandenbindung zeigen [70, 94]. Bei einem Einsatz von 12meren Peptiden mit einer durchschnittlichen Molmasse von 1300 g/mol (variiert je nach AS-Sequenz) ergeben sich 1,3 μ g reines Peptid pro Nanomol. In unserem Fall werden bei 700 nmol auf 1 cm² insgesamt 910 μ g Peptid pro cm² synthetisiert. Beim Array-Design wählten wir für das Screening ca. neun Spots pro Zentimeter (somit 101 μ g Peptid pro Spot) und erzielten eine durchschnittliche Reinheit von 70 – 90 % (12mere Peptide). Wird eine geringere Reinheit zugrunde gelegt (50 %), so sind es mindestens 50 μ g Peptid pro Spot, die für eine optimale Bindung von IgE ermittelt wurden, damit auch schwache Bindungen identifiziert werden können. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnte von Kramer et al. [70] eine höhere Signalintensität bei niedriger Membranbeladung (10 nmol/cm²) gezeigt werden. Dort wurden 7- bis 12mere Peptide (als bekannte Epitope der eingesetzten Antikörper) mit neun verschiedenen IgG-Antikörpern untersucht und bei sechs Antikörpern ein besseres Signal mit niedriger Beladung erzielt. Jedoch wurden auch mit zwei Antikörpern bessere Signale mit steigender Membranbeladung ermittelt, sodass die Höhe der Beladung je nach Fragestellung individuell

angepasst werden muss. Man muss bedenken, dass allergenspezifisches IgE zu einem großen Anteil membrangebunden an Effektorzellen (Mastzellen, Basophile) im Gewebe vorliegt und nur ein geringer Teil frei im Blut zirkuliert [95, 96]. Zudem ist die Halbwertszeit des zirkulierenden IgE sehr kurz (maximal 2,5 Tage). Im Vergleich dazu beträgt die Halbwertszeit in der Bindung an den FcεRI ($K_a = 10^{-9} - 10^{-10}/M$) über 100 Stunden und IgE kann bis zu zwei Wochen zellgebunden im Gewebe persistieren [8]. Außerdem hat IgE quantitativ im Vergleich mit den anderen Immunglobulinklassen (IgG, IgM) den weitaus geringsten Anteil im Serum (0,00005 mg/ml IgE im Vergleich zu 13,5 mg/ml IgG) und konkurriert somit um die Peptidbindung. In der Literatur ist die „selektive Konkurrenz“ in der Bindung eines Allergens unter den Immunglobulinen IgE, IgA_{1,2} und IgG₁₋₄ bei allergischen Atopikern, nichtallergischen Atopikern und Gesunden beschrieben worden [97]. Alle diese Faktoren erschweren es, IgE-Bindung zu detektieren. Ein Vorteil ist allerdings die hohe Affinität von IgE an ein Epitop ($K_a = 10^{-10} - 10^{-11}/M$) im Vergleich zu IgG ($K_a = 10^{-6} - 10^{-7}/M$) [98, 99]. Durch die hohe angebotene Peptidmenge (50 µg/Spot) sind trotz konkurrierender Antikörper und Proteine im Serum (unspezifische Bindungen) noch genügend Peptide für die spezifische IgE-Bindung vorhanden. Eine weitere Optimierung des Assays erfolgte mit Hilfe der Inkubationstemperatur und -Zeit (4 °C über 16 Stunden, niedrige Temperatur zur Vermeidung unspezifischer Bindung), der Blockierungsreagenzien (Sigma Genosys Blockpuffer Konzentrat in TBS mit 5 % (w/v) Saccharose, erhöht die Sensitivität und Spezifität) und der eingesetzten Menge von Serum (Verdünnung 1 : 5).

Der von uns verwendete Blockpuffer konnte bereits in vielen anderen cellulosebasierten SPOT-Immunoassays [75, 100] und mit Zusatz von 0,05 % Tween 20 auch bei Microarrays [101] erfolgreich eingesetzt werden.

Zeitgleich zu unseren Untersuchungen (2009) beschäftigte sich eine andere Arbeitsgruppe aus den USA mit Fragestellungen zur Optimierung der Inkubationsbedingungen eines Peptidassays [102]. Diese Publikation dient inzwischen als Grundlage für Microarrays für lineare Typ-1-Allergene [101]. Diese Gruppe verwendet im Gegensatz zu uns am Harz (Festphasen-Peptidsynthese) synthetisierte Peptide, welche auf die Epoxidoberfläche von Glaträgern gekoppelt wurden (Microarray). Ganz erstaunlich ist in diesem Zusammenhang, dass beide Arbeitsgruppen, ohne voneinander zu wissen, zu den gleichen Erkenntnissen kamen. Unsere Ergebnisse und die Ergebnisse von Lin et al. stimmen in den Inkubationsbedingungen (4 °C über 16 Stunden) und der Serumverdünnung (1 : 5 bei Verwendung einzelner nicht gepoolter Seren) überein. Auch konnte eine vergleichbare Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit den Peptidarrays gezeigt werden. Der Unterschied beider Arbeiten liegt ausschließlich in den Verhältnissen beider

Analyten zueinander. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir Typ-2-Allergene, die hauptsächlich konformatorische Epitope aufweisen. Deshalb ist die Bindung zu den entsprechenden Bruchstücken dieser Epitope niedrig und der Nachweis schwieriger zu führen. Weiterhin haben unsere Probanden niedrigere sIgE-Werte (Median sIgE-Haselnuss 12,10 kU/l und sIgE-Sellerie 3 kU/l) als Konsequenz der primären Sensibilisierung über Aeroallergene. Um hier eine gute Bindung zu erzielen, mussten wir das Peptidangebot deutlich erhöhen (50 $\mu\text{mol/Spot}$). Im Gegensatz dazu arbeitete die Arbeitsgruppe von Lin et al. mit Milchallergikern, die als primäre Sensibilisierung auf Typ-1-Allergene hohe sIgE-Werte haben (dort Serumpool mit sIgE 850 kU/l und Einzelseren mit sIgE > 100 kU/l eingesetzt) mit hauptsächlich beschriebenen kurzen linearen Epitopen, welche eine viel höhere IgE-Bindung zeigen als Bruchstücke eines konformatorischen Epitops. Aus diesem Grund konnten dort deutlich niedrigere Peptidkonzentrationen verwendet werden, um eine gute Bindung zu erzielen [102]. Dieser Vergleich macht deutlich, dass bei der Auswahl eines Assays nicht nur das Zielallergen bzw. das putative Epitop berücksichtigt werden muss, sondern auch die Eignung des Assays für ein bestimmtes Patientenkollektiv (Sensibilisierungsprofil). Aufgrund der Kombination dieser Erkenntnisse ist es möglich, ein kombiniertes klinisches Tool zu entwickeln. Durch einheitliche Durchführungs- und Inkubationsbedingungen vergleichbarer Reproduzierbarkeit kann zum Beispiel ein Träger mit Peptiden von Typ-1- und Typ-2-Allergenen in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt werden, um das gesamte Patientenkollektiv zu erfassen. Für die linearen Epitope von Typ-1-Allergenen können Peptide im fmol-Bereich [102] und für Epitop-Bruchstücke von Typ-2-Allergenen Peptide im nmol-Bereich gekoppelt werden. Die Bestückung eines solchen Trägers mit Peptiden ist deutlich kosteneffizienter als der Einsatz großer rekombinant hergestellter Allergene in der Diagnostik. Zusätzlich bieten kurze Peptide den Vorteil einer beliebigen und eindeutigen Sequenzauswahl und können in kurzer Zeit entweder am Harz (Festphasen-Peptidsynthese) oder auf der Cellulose (mit hoher Beladung, siehe Methodenteil) in großer Menge und hoher Reinheit synthetisiert werden. Durch die Entwicklung einer Zyklisierungsmethode von Boisguerin [75] und Aÿ et al. [103] zur Herstellung von Peptiden mit authentischen C-termini auf N-CAPE Membranen und unserer Modifikation dieser Membran zur größtmöglichen effizienten Beladung (ca. 700 nmol/cm²) können bis zu 5000 abspaltbare bioaktive Peptide (Nachweis von Stimulation über T-Zell-Epitope [103]) im oberen μg -Bereich (hier 910 $\mu\text{g/cm}^2$) auf nur einer Cellulosemembran (20,3 x 28,5 cm) innerhalb einer Woche hergestellt und zur Kopplung auf Trägern (z. Bsp. Epoxid-Oberfläche) verwendet werden. Das wäre eine zusätzliche Effizienz und Kostensenkung im Vergleich zur relativ teuren und großvolumigen Festphasen-Peptidsynthese [103].

Eine weitere wesentliche Einflussgröße des Immunoassays betrifft die Peptidlänge (Sequenzfenster). Zum einen lassen sich kurze Peptide in sehr guter Qualität und Reinheit synthetisieren, zum anderen steigt die unspezifische Kreuzreaktivität der eingesetzten Detektionsantikörper mit abnehmender Länge (siehe Ergebnisse Kapitel 4.3.4). Zusätzlich sinkt die spezifische Bindung an die ohnehin schon schwach gebundenen Epitop-Bruchstücke konformatorischer Epitope. Die besten Resultate konnten wir mit dodecameren Peptiden (zwölf Aminosäuren) erzielen. Die Ergebnisse mit 24meren Peptiden waren enttäuschend. Ein Grund für ihre schlechte Erkennung könne die geringere Reinheit (30 – 50 %, siehe Ergebnisse Kapitel 4.3.3) aufgrund der längeren Synthese sein, dies erklärt aber nicht vollständig das ungünstige Resultat.

Nach Aufnahme des Allergens (Proteins), seiner Internalisierung und Prozessierung werden kurze lineare Peptide mithilfe von MHC-Klasse-II-Komplexen an der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert und von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor gebunden. Das führt zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen. Diese Peptide stellen lineare T-Zell-Epitope dar [7]. Studien zur Peptidlänge haben gezeigt, dass Peptide, die von MHC-Klasse-I-Komplexen präsentiert werden, in der Regel 9 – 11 Aminosäuren lang sind [104]. Peptide, die an MHC-II-Komplexen präsentiert werden, haben in der Regel eine Länge von 12 – 25 Aminosäuren, jedoch können auch 9mere und kürzere Peptide präsentiert werden [104, 105]. In Stimulationsversuchen mit CD4⁺ T-Zellen konnten Peptide mit mindestens acht Aminosäuren T-Zellen stimulieren, wobei längere Peptide zu einer besseren Stimulation führten [105]. Diese Untersuchungen bestätigen indirekt unsere Ergebnisse einer günstigeren Erkennung von 12meren Peptiden anstelle kürzerer 7merer Peptide, da es für die Produktion von allergenspezifischen IgE zunächst der Sensibilisierungsphase mit der Erkennung von MHC-II-gebundenen Peptiden durch den T-Zell-Rezeptor bedarf. Dennoch kann das nicht allein als Begründung für die IgE-Erkennung dienen, sondern stützt die Präferenz 12merer Peptide anstatt 7merer Peptide. In diesem Zusammenhang müsste auch die Erkennung von 24meren Peptiden bevorzugt werden. Das konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. MHC-Klasse-I-Moleküle binden das 9 – 11 Aminosäuren lange Peptid in der Bindungsgrube, wobei es N- und C-terminal an den Enden des Spalts fixiert wird [104]. Peptide, die zu kurz sind, um den Spalt zu überbrücken, werden nur an einem Ende fixiert und hängen aus dem Spalt heraus. Zu lange Peptide (ca. 13 AS) protrudieren in der Mitte der Spalte. Dagegen binden MHC-Klasse-II-Moleküle längere Peptide (12 – 25 AS), die sich über einen kurzen Bereich von ca. neun Aminosäuren im Spalt befinden, sodass flankierende Aminosäurereste aus dem Spalt

hinausragen [104, 105]. Es konnte gezeigt werden, dass die Kernsequenz (gebundener 9 AS-kurzer Bereich) wesentlich für die T-Zell-Erkennung ist und von den flankierenden Sequenzen moduliert wird [104]. Das könnte eine weitere Begründung für die Präferenz der Bindung 9 – 11 AS-langer Peptide sein.

Werden bereits bekannte Epitope von Nahrungsmittelallergenen betrachtet, variiert die Länge je nach Art des Allergens [57]. Zahlreiche Arbeiten mit Klasse-1-Allergenen haben kurze lineare Epitope identifiziert. Für Weizen sind Epitope aus lediglich 4 – 7 Aminosäuren beschrieben worden [106]. Spannend an diesen Allergenen ist das zentrale Prolin, flankiert von Glutaminresten, denn es konnte vor langer Zeit verdeutlicht werden (unabhängig von der Fragestellung der allergischen Reaktion), dass vor allem Prolin bevorzugt in zweiter Position bei der Assoziation in der Bindungsgrube von MHC-II-Komplexen gebunden wird [104]. Weitere kurze lineare Epitope sind für das Ei (5 – 12 AS [107, 108]) und etwas längere Epitope für Milch (10 – 24 AS [109]) und Erdnuss (10 – 15 AS [110, 111]) beschrieben worden. Für die pollenassozierten Klasse-2-Allergene sind vor allem konformatorische Epitope innerhalb konservierter Regionen dargestellt worden [5]. Insbesondere für Bet v 1 konnte eine konservierte immundominante Region (Bet v 1_{142–156}) nachgewiesen werden, die für die Kreuzreaktivität mit pollenassozierten Nahrungsmitteln verantwortlich ist [112]. Diese Region umfasst 15 Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden homologen Peptide (15mer) von Apfel, Kirsche, Haselnuss, Sellerie, Karotte und Soja in der Lage sind, Bet v 1-spezifische T-Zellen zu stimulieren.

Somit passt die bevorzugte Peptidlänge von zwölf Aminosäuren in unseren Versuchen gut zu den bisher beschriebenen Sequenzfenstern linearer Epitope und entspricht vom Bindungsmuster auch der bevorzugten Bindung an MHC-II-Moleküle während der Sensibilisierungsphase.

Ein weiterer wesentlicher Faktor bei Immunoassays ist die Detektionsmethode bzw. der Einsatz von Detektionsantikörpern. Dürauer et al. [113] beschrieben den Einsatz biotinylierter Antikörper auf Peptidarrays und fanden bei dem Einsatz von IgG-Antikörpern kaum unspezifische Bindungen. Im Gegensatz dazu verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass sich das Biotin-Streptavidin-System nicht für die Detektion von IgE-Bindungen an kurze Peptide eignet, da sowohl durch das HRP-markierte Streptavidin als auch durch den biotinylierten anti-IgE-Antikörper starke unspezifische Bindungen (25 %) an Peptide resultieren (Ergebnisse Kapitel 4.3.5).

Eine beliebte Methode ist der Einsatz von einem Erst- und einem Zweitantikörper zur Detektion einer IgE-Bindung (Sandwich-System). Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass der

Einsatz dieser Methode nicht empfohlen werden kann. Die Abbildung des Sandwich-Systems in Kapitel 4.3.5 verdeutlicht, dass Kreuzreaktivitäten des Zweitantikörpers (in der Regel anti-IgG) zum menschlichen IgG oder zu anderen Proteinen aus dem menschlichen Serum, die sich über Protein-Peptid-Wechselwirkungen unspezifisch an den membrangebundenen Peptiden anlagern, zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Leider finden sich in der Literatur kaum Studien, die diesen möglichen Fehler durch Vorversuche berücksichtigen. Die meisten Studien führen lediglich Serum von gesunden Probanden als Kontrolle mit. Einige Studien sind differenzierter und schließen im Vorfeld auch Kreuzreaktionen zu Peptiden durch Antikörperinkubation ohne Serum aus. Leider konnte keine Studie in der Literatur gefunden werden, wo Nahrungsmittelpitope beim Einsatz eines Sandwich-Systems im Vorfeld in Bezug auf Kreuzreaktivitäten des Zweitantikörpers nach Seruminkubation mit Peptiden geprüft wurden. Aufgrund der großen Störanfälligkeit (durch andere Antikörperklassen und verschiedene Serumproteine) kann das Sandwich-System nicht bei peptidbasierten Systemen zur eindeutigen Identifikation einer reinen IgE-Bindung mit menschlichem Serum empfohlen werden. Die besten und klar reproduzierbaren Ergebnisse werden mit einem direkt markierten anti-IgE-Antikörper erzielt.

Durch die Reproduktion der Ergebnisse konnten Schwankungen in den Signalintensitäten der Peptide und des Hintergrundes gefunden werden. Dabei waren die entsprechenden Relationen der Signalintensitäten innerhalb eines Patientenserums zu den Peptiden jeweils konstant. Ein Grund für diese Unterschiede könnte freigesetzte Peroxidase aus lysierten Erythrozyten während der Blutentnahme sein, die während der Detektion mit dem Chemilumineszenz-Substrat reagiert. Auch Schwankungen in der Synthesequalität der Peptide können die Signalintensität beeinflussen, wobei aufgrund der konstanten Relationen innerhalb der Replikate bei der Synthesequalität von 70 – 90 % von einer guten spezifischen Antigenbindung ausgegangen werden kann. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zwischen den Probanden zu ermöglichen, wurde eine einheitliche Umrechnung basierend auf der Formel von Weiser et al. [77] entwickelt (Methoden Kapitel 3.6). Aalberse beschreibt [114] die verschiedenen Fehlerquellen beim Einsatz unterschiedlicher Bewertungsformeln, die nur einzelne Aspekte einbeziehen (Hintergrund, Signal leerer Spots). Deshalb war es uns bei unserer Berechnung sehr wichtig, sowohl die Hintergrundkorrektur als auch die Normierung über die gesamte Membran und alle Spots vorzunehmen und zu reproduzieren. In der Arbeit von Lin et al. wurde ebenfalls eine Formel wie hier, bestehend aus zwei Anteilen – 1. Normierung des Spot Wertes und 2. Berechnung des Cutoff-Wertes – verwendet [102]. Überraschenderweise ähnelt unsere SI^{norm} -Berechnung sehr der Z_i -Berechnung im Ergebnis (probeweise unsere Werte mit der Formel von Lin et al.

durchgerechnet, ergibt sehr ähnliche Resultate). Jedoch ist die Berechnung des hier eingesetzten Cut-off-Wertes deutlich niedriger als bei Lin et al. und korrespondiert sehr gut zur visuellen Detektion auf der Membran, sodass auch etwas schwächere Bindungen gut erkannt werden. Das ist insbesondere wichtig bei der Detektion schwacher Bindungen an Epitop-Bruchstücke konformatorischer Epitope (Klasse-2-Allergene hier) im Gegensatz zu starken Bindungen linearer Epitope (Klasse-1-Allergen bei Lin et al.).

In Zusammenschau konnte ein valider und reproduzierbarer Assay entwickelt werden. Durch Anpassung in der Art der Membran, der Beladung, Sequenzfenster und einheitlicher Inkubationsbedingungen zur Vermeidung unspezifischer Bindungen und reproduzierbarer Signalauswertung ermöglicht er unter Minimierung der Fehlerquellen eine sensible Detektion von IgE-Bindung an membrangebundene Peptide. Somit kann der Assay zum Screening von Epitopen verschiedener Nahrungsmittelallergene eingesetzt werden. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse, auch in Hinsicht auf die erforderliche Peptidmenge, kann der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Assay zur Entwicklung und Optimierung eines Peptid-Microarrays weiterentwickelt werden.

5.6 Immunologische Charakterisierung putativer Epitope

Nach wie vor stellt die DBPCFC aufgrund der mangelnden Vorhersagekraft von sIgE und SPT den Goldstandard in der Nahrungsmittel-Allergiediagnostik dar. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden enorme Fortschritte bezüglich der komponentenbasierten Diagnostik erzielt (CRD – component-resolved diagnostic) [5, 60]. Zahlreiche Major- und Minorallergene konnten identifiziert und als rekombinante Allergene für die klinische Routinediagnostik etabliert werden. Für einzelne Allergene weist das Sensibilisierungsprofil auf das Risiko für das Auftreten einer schweren systemischen Reaktion (nsLTP und Speicherproteine). Dabei hilft die CRD bei der Differenzierung einer positiven Reaktion im SPT auf Birke und Gräser zu ermitteln, ob eine primäre Sensibilisierung über Bet v 1 und/oder Phl p 1/Phl p 5 vorliegt und eine Hyposensibilisierung sinnvoll ist oder ob die Reaktion im SPT aufgrund einer Sensibilisierung auf Profilin vorliegt. Aufgrund der aufwendigen Herstellung solcher rekombinanter Allergene ist diese Diagnostik bisher kostenintensiv und wird in der ambulanten Praxis sehr selten und nur für spezielle Fragestellungen eingesetzt. Im Sinne einer effizienten Diagnostik wurden vor allem

in den letzten Jahren Microarrays mit rekombinanten Allergenen entwickelt. Eine Weiterentwicklung solcher Microarrays mit Peptiden anstatt mit rekombinanten Proteinen würde die Herstellung deutlich vereinfachen und die Kosten senken. Hierzu müssen jedoch zunächst entsprechende Epitope identifiziert und evaluiert werden. Lineare Peptide wurden eingesetzt, um zu prüfen, ob mithilfe von linearen Sequenzen, auch Teile von konformatorischen Epitopen identifiziert werden können. Sollte dies gelingen, wären definierte Gruppen linearer Peptide eine sehr einfache und kostengünstige Variante im Vergleich zur teuren und aufwendigen Proteinherstellung für rekombinante Proteine. Wünschenswert wäre in Zukunft ein Microarray mit definierten Gruppen von Peptiden, die ebenfalls Hinweise auf die klinische Symptomatik und Therapieplanung ermöglichen können.

Als Grundlage für diese Idee wurden in der vorliegenden Arbeit die Bet v 1-assoziierten Allergene von Haselnuss (Cor a 1) und Sellerie (Api g 1) in ein Set 12merer überlappender Peptide zerlegt und mit Seren von Gesunden und Allergikern untersucht.

Wir konnten innerhalb der Aminosäuresequenz von Api g 1.0101 drei spezifische IgE-bindende Cluster bei den Sellerieallergikern identifizieren. Die erste Region umfasst die Aminosäuren 1 – 30, die mittlere Region die Aminosäuren 46 – 72 und die C-terminale Region die Aminosäuren 103 – 126. Zum besseren Verständnis sind die Ergebnisse in einem Alignment mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen in der Abbildung 35 dargestellt. Als Breiteneder et al. 1989 das erste Mal die vollständige cDNA-Sequenz von Bet v 1 identifizierten [115], stellten sie eine starke Sequenzidentität (55 %) und Sequenzähnlichkeit (70 %) zum Krankheitsresistenz-Gen der Erbse [116] fest, welches bei Befall der Pflanze mit *Fusarium solani* f.sp. *pisi* und *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* hochreguliert wird. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt gingen sie anhand einer computerbasierten Vorhersage von IgE-bindenden Epitopen in der Nähe der Aminosäuren 10, 30, 50, 110, 120 und 155 aus [115]. Im Jahre 2000 beschrieben Ganglberger et al. mit Hilfe von IgE-Mimotopen, das erste konformatorische IgE-Epitop von Bet v 1, welches durch die Aminosäuren 9 – 22 und 104 – 113 gebildet wird [117]. Fünf Jahre später publizierten Schirmer et al. [21] die vollständige Kristallstruktur des Sellerie-Hauptallergens Api g 1 und zeigten, dass genau diese vorhergesagten Regionen konservierte putative Epitope formten. Nach der Übertragung der konservierten Aminosäurepositionen auf die dreidimensionale Struktur von Api g 1 schlugen sie drei Epitope vor. Für einen besseren visuellen Vergleich mit unseren Ergebnissen, sind diese drei Epitope entsprechend ihrer Publikation [21] in Gelb, Grün und Rot in der Abbildung 35 dargestellt.

Die Zugangsnummern der entsprechenden Sequenzen sind links dargestellt. Bei der Nummerierung wurde in dieser Arbeit das Methionin als erste Aminosäure mitgezählt. Bei vielen Publikationen wird das Methionin als Startsequenz weggelassen, jedoch geschieht das nicht einheitlich. Die Publikationen anderer Arbeitsgruppen werden im Original zitiert (sprich mit und ohne Methionin), das muss beim Ablesen der Sequenzen berücksichtigt werden. Unterstrichene Sequenzen stellen identifizierte Peptide mit IgE-Bindung dar. Eingerahmte Sequenzen bilden publizierte T-Zell-Epitope ab. Die entsprechende Publikation ist rechts am Rand gekennzeichnet. Die graue Füllung verdeutlicht konservierte Areale (dunkelgrau – identische Aminosäuren, hellgrau – ähnliche Aminosäuren). Vorgeschlagene konformatorische Epitope von Schirmer et al. [21] sind entsprechend der Publikation in Gelb, Grün und Magenta hinterlegt. Wesentliche Aminosäureaustausche, die Einfluss auf IgE-Reaktivität ausüben, sind als rote bzw. grüne Buchstaben dargestellt. Konservierte Regionen sind mit einem * gekennzeichnet.

Das von uns identifizierte Peptid VLVPTADGGSIC (AS 103 – 114) wurde ausschließlich von Sellerieallergikern erkannt. Seren von gesunden Probanden und pollensensibilisierten Haselnussallergikern zeigten keinerlei Bindung zu diesem Peptid (siehe Ergebnisse Kapitel 4.4). Anhand des Sequenzalignements (Abbildung 35) lässt sich gut erkennen, dass N-terminal in dieser Sequenz das hydrophobe Valin (V104) nur bei Sellerie und Karotte vorkommt anstelle des hydrophilen Lysins (K104) bei Bet v 1 und Cor a 1. Das Besondere an diesem Peptid ist seine Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren und die Kreuzreaktivität zwischen rApi g 1-spezifischen T-Zell-Klonen zu Bet v 1 zu vermitteln. Dieses Peptid ist Bestandteil der von Bohle et al. beschriebenen dominanten T-Zell-aktivierenden Region von Api g 1 [81]. Es hat eine hohe Sequenzidentität (58,33 %) und Sequenzähnlichkeit (66,66 %) zu der korrespondierenden Bet v 1-Sequenz. Diese korrespondierende Bet v 1-Sequenz (AS 103 – 114) ist ein Teil eines linearen T-Zell-Epitops von Bet v 1, welches bereits 1993 von Ebner et al. [118] beschrieben wurde. Zusätzlich wurde diese Bet v 1-Sequenz von Bohle et al. [81] und Jahn-Schmid et al. [112] in weiteren Studien als ein lineares T-Zell-Epitop von Bet v 1 bestätigt. Ganglberger et al. zeigten, dass diese korrespondierende Bet v 1-Sequenz (AA 104 – 113) zu einer konservierten Region innerhalb der Bet v 1-Familie gehört und Bestandteil eines konformatorischen IgE-bindenden Epitops ist. Durch eine Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit dem entsprechendem Mimotop dieses Epitops konnten spezifische IgG-Antikörper induziert werden, die *in vitro* die Bindung von humanem IgE an das Bet v 1 blockieren und somit die Relevanz dieses Epitops bestätigten [117].

Eine weitere Besonderheit dieser Api g 1-Sequenz ist ein Cystein an Position 114 (C 114). Keine der klassischen kreuzreaktiven Nahrungsmittelallergene zu Bet v 1 und auch das Bet v 1 selbst enthalten ein Cystein an dieser Position. Das ist insofern besonders, weil das Cystein zu einer Änderung der Struktur führt und in der Lage ist, mit anderen Cysteinen Disulfidbrückenbindungen zu bilden. Kramer und Landgraf et al. haben ermittelt, dass die gemessene Signalintensität auf der Membran mit der Affinität der Ligandenbindung korreliert [70, 94]. Unsere Ergebnisse zeigen die höchsten Signalintensitäten bei AS 103 – 114, sodass hier

eine hoch affine Ligandenbindung vorliegt. All diese Erkenntnisse und unsere Inkubationsergebnisse stützen die Theorie, dass die Sequenz VLVPTADGGGIC einen wesentlichen Bestandteil eines konformatorischen B-Zell-Epitops bildet und für die Auslösung der allergischen Reaktion mittels IgE verantwortlich ist. Eine weitere Unterstützung dieser These liefert die Arbeit von Schirmer et al. [21]. Aufgrund der Kristallstruktur von Api g 1 und einer computerbasierten Epitopvorhersage fällt genau diese Region (AS 105 – 115) zusammen mit einem Teil unserer ermittelten ersten Region (AS 9 – 12) in ein gemeinsames konformatorisches Epitop (siehe Alignment in Abbildung 35 zur Verdeutlichung – grüne Markierung). Weiterhin bildet die korrespondierende Bet v 1-Sequenz dieser Region (AA 104 – 113) einen Teil des konformatorischen IgE-bindenden Epitops auf der Oberfläche von Bet v 1 und gehört zu den konservierten Bereichen innerhalb der Bet v 1-Familie, welche die Kreuzreaktivität mit bedingen. In der dreidimensionalen Struktur liegt das putative Api g 1-Epitop (AS 9 – 12 und 103 – 114 an gleicher Stelle wie das konformatorische Bet v 1-Epitop (AS 9 – 22 und AS 104 – 113) [117] (siehe Alignment Abbildung 35 und 3-D-Struktur Abbildung 36 B).

Werden vor diesem Hintergrund die Einzelergebnisse betrachtet (siehe Ergebnisse Kapitel 4.4), so zeigt sich deutlich: Probanden mit einer Bindung in der ersten Teilregion (AS 9 – 12, also Spot 1 – 4) erkennen mehr Peptide aus der dritten Region (AS 103 – 126, also Spot 34 - 39), sodass die antigenbindenden Regionen ihrer IgE-Antikörper offenbar für beide Sequenzen spezifisch sind. Das ist ein weiterer Hinweis dafür, dass mithilfe des an die IgE-Bindung angepassten SPOT-Synthese-Protokolls in dieser Arbeit IgE-Bindung zu Bruchstücken eines gemeinsamen konformatorischen B-Zell-Epitops gefunden wurde. Die in diesem Epitop enthaltene lineare Sequenz (AS 103 – 114) kann zudem zur Unterscheidung von Sellerieallergikern zu Gesunden und zu Pollenallergikern herangezogen werden und hat gute Merkmale als „Kandidatpeptid“ für ein Peptid-Microarray oder Biochip. Ob die Sequenz aufgrund des Valins auch selektiv von Karottenallergikern erkannt wird, muss in weiteren Studien geprüft werden. Eine zusätzliche Validierung dieser ersten Ergebnisse an größeren Stichproben von Probanden, insbesondere pollensensibilisierten Allergikern mit und ohne weitere kreuzreaktiven NMA, ist erforderlich. Aus unseren Ergebnissen sind bei dieser Sequenz (AS 103 – 114) noch keine Rückschlüsse auf die Schwere der klinischen Symptomatik möglich.

Innerhalb der Haselnussequenz Cor a 1.0301 werden die Peptide GGPGTIKKICFD (AS 49 – 60) und GTIKKICFDEGS (AS 52 – 63) sehr spezifisch nur von Probanden mit gleichzeitiger Sellerieallergie erkannt (siehe Ergebnisse Kapitel 4.4). Sie unterscheiden sich von den

„Nachbarpeptiden“ durch das C-terminale Glycin in Kombination mit den Aminosäuren Isoleucin plus Cystein (G...IC). Diese Kombination scheint eine Schlüsselrolle für die selleriespezifische IgE-Bindung zu spielen. In Studien konnte gezeigt werden, dass lineare Peptid-Epitope in der Regel zwei bis fünf „kritische“ Aminosäuren besitzen, verteilt auf eine Peptidlänge von fünf bis acht Aminosäuren [120]. Diese „kritischen“ Aminosäuren sind für die Antigenbindung unerlässlich.

Die Kombination G...IC kommt exklusiv auf der Cor a 1.0301-Sequenz (AS 49 – 63, alle anderen Cor a 1-Varianten haben kein Cystein) und auch nur in unserer oben beschriebenen Sequenz VLVPTADGGSIC vor. Somit stellen diese beiden Sequenzen (Cor 1.0301 AS 49 – 60 und AS 52 – 63) weitere geeignete Kandidaten für ein peptidbasiertes diagnostisches Tool dar.

Dabei ist sehr interessant, dass das Peptid GSILKSISKYHT (AS 112 – 123, Spot 38 auf der Cor a 1.0301-Sequenz) auch fast ausschließlich von Sellerieallergikern gebunden wird. Hier wiederholt sich die Schlüsselsequenz: ein C-terminales Glycin, diesmal aber gefolgt von Isoleucin plus Serin (G...IS). Dieser Austausch von Cystein gegen Serin ist schlüssig, denn Cystein und Serin verfügen über das gleiche Grundgerüst (Cystein wird in der Leber aus Serin hergestellt), beide sind polar und haben neutrale Seitenketten. Somit ist das eine weitere Unterstützung der These, dass ein C-terminales Glycin, gefolgt von Isoleucin und Cystein/Serin, eine Schlüsselkombination für selleriespezifisches IgE darstellt. Aufgrund dieses besonderen Austauschs muss hier eine einzigartige Oberflächenstruktur entstehen, die diese hohe Sensitivität der IgE-Bindung bei den Sellerieallergikern vermittelt.

Beide Allergikergruppen (HN und SE) zeigen spezifische IgE-Bindung zu den Aminosäuren 16 – 30 auf der Api g 1.0101-Sequenz und zu den Aminosäuren 19 – 39 auf den Cor a 1-Sequenzen (Cor a 1.0101 – 1.0104, Alignment in der Abbildung 35). Dieser Bereich ist eine konservierte Region innerhalb der Bet v 1-Familie und formt strukturell einen Teil der α_1 - und α_2 -Helix und den Übergang zwischen den Helices (Abbildung 36).

Bestimmte Aminosäureaustausche kommen in der Evolution häufig vor. Diese Austausche beeinträchtigen aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften die Funktion oder die räumliche Struktur des Proteins nicht wesentlich (Hydrophilie, Polarität, Größe etc.). Beim Vergleich dieser Region von Bet v 1 zu Cor a 1 finden fast ausschließlich Austausche von identischen oder sehr ähnlichen Aminosäuren statt (außer Position 22 und 27). Somit scheint diese Region (AS 16 – 39) eine wichtige Rolle in der Kreuzreaktivität innerhalb der Bet v 1-Familie zu spielen, denn einzelne Sequenzen dieser Region sind als lineare T-Zell-Epitope von Bet v 1 [81, 112, 118],

rCor a 1.04 [84] und Api g 1 [81] beschrieben worden (Alignment in der Abbildung 41). Zusätzlich erkannten Api g 1-, Mal d 1- und Dau c 1-reaktive Bet v 1-spezifische T-Zellen dieser Region auf der Bet v 1-Sequenz [121]. Dadurch korrespondieren diese Arbeiten gut zu unseren Ergebnissen der spezifischen IgE-Bindung in diesem Bereich. Als Besonderheit speziell für Api g 1.01 ist das Glutamin an Position 21 (Q21) anstelle des basischen Lysins (K21), welches bei Bet v 1, Cor a 1 und den meisten Bet v 1-assoziierten Allergenen konserviert ist. Nur bei Sellerie (Q21) und Karotte (S21) findet ein Austausch statt.

Des Weiteren ist diese Region ein Bestandteil des von Schirmer et al. [21] vorgeschlagenen konformatorischen Epitops von Api g 1 (Alignment in der Abbildung 35 – zur Verdeutlichung in Magenta dargestellt), welches aus den Aminosäuren von Api g 1.0101 AS 27 – 39 und AS 142 – 153 geformt wird.

Der zweite Teil dieses konformatorischen Epitops (AS 142 – 153) stellt zugleich auch das dominante T-Zell-Epitop von Bet v 1 dar [112], was für die Kreuzreaktion zu Nahrungsmittelallergenen verantwortlich ist. Entsprechende homologe lineare Sequenzen dieses Bereichs sind als T-Zell-Epitope gegenüber Api g 1 [81] und Cor a 1.04 [84] beschrieben worden. Auch konnten wir in diesem Bereich IgE-bindende Peptide der Api g 1.01-Sequenz (AS 136 – 147) und der Cor a 1.01-Sequenz (AS 139 – 150) identifizieren. Genau wie im ersten Anteil des Epitops findet bei Api g 1.01 ein Austausch zum Glutamin (Q139) anstelle des Lysins statt. Auf den Cor a 1.01-Sequenzen erfolgt ebenfalls ein Austausch zum hydrophoben Methionin (M140) anstelle des hydrophilen Lysins (K140). Der Austausch des Lysins in Position 140 scheint entscheidend für die IgE-Bindung zu sein.

Durch unseren Nachweis der IgE-Bindung und verschiedene Publikationen linearer T-Zell-Epitope sowie die räumliche Relation in der 3D-Struktur wird die These eines konformatorischen Epitops bestehend aus den Aminosäuren von AS 19 – 39 und AS 142 – 153 gestützt. Zur gezielten Erkennung von selleriespezifischem IgE sind die Austausche von Glutamin Q21 und Q139 anstelle des konservierten Lysins entscheidend. Bei Dau c 1 der Karotte liegen die gleichen Austausche Q21 und Q139 vor, sodass in weiteren Studien ihre Relevanz für die IgE-Bindung und Abgrenzung zur Sellerie geprüft werden muss.

In der Api g 1-Sequenz konnten wir IgE-Bindungen im Bereich der Aminosäuren 46 – 72 (Spots 16 – 21) nachweisen. Diese Region umfasst die Glycin-reiche Schleife, die innerhalb der Bet v 1-Familie hoch konserviert ist. Auffällig war dabei, dass Peptid 19 nur dann gebunden wurde, wenn auch eine Bindung zum Peptid 16 vorlag. Bei genauer Betrachtung unterscheiden sich

diese beiden Peptide von den „Nachbarpeptiden“ nur durch das Motiv DGGP----IT, welches eine Schlüsselrolle zu spielen scheint.

Jensen-Jarolim et al. beschrieben 1998 mithilfe von murinen monoklonalen IgG-Antikörpern (BIP 1 und BIP 4) gegen Bet v 1 zwei IgG-Epitope auf der Oberfläche von Bet v 1, welche nach Immunisierung von BALB/c-Mäusen eine spezifische IgG-Antikörperbildung induzierten [122]. Die Bindung dieser induzierten IgG-Antikörper an die IgG-Epitope konnte durch Präinkubation mit natürlichen und rekombinatem Bet v 1 inhibiert werden und somit als relevantes IgG-Epitop bestätigt werden [122]. Innerhalb der dreidimensionalen Struktur des Bet v 1 ist das IgG-Epitop von BIP1 an der Glycin-reichen-Schleife zwischen den β -Faltblättern 3 und 4 (AA 58 – 66) lokalisiert [122]. Verglichen mit unseren Ergebnissen der IgE-bindenden Peptide, umfasst diese Region auf der Api-g 1 Sequenz das identifizierte Motiv DGGP----IT. Inwiefern diese Sequenz zur therapeutischen Immunisierung und Ausbildung inhibierender IgG-Antikörper zur kompetitiven Hemmung einer IgE-Bindung gegenüber Api g 1 verwendet werden kann, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Lüttkopf et al. haben die vier verschiedenen Varianten von Cor a 1.04 aus der Haselnuss untersucht und mit Cor a 1.0101 aus Haselpollen verglichen [119]. Dabei hatte Cor a 1.0401 die stärkste IgE-Bindung und löste die höchste Histaminfreisetzung aus, gefolgt von Cor a 1.0402 > Cor a 1.0403 und > Cor a 1.0404. Cor a 1.0402 und 1.0403 unterschieden sich lediglich im Austausch von Cystein gegen Serin in Position 4. Da beide eine vergleichbare Reaktivität aufwiesen, schlussfolgerten die Autoren, dass dieser Austausch keine Änderung der Struktur und Epitopoberfläche nach sich zieht. Ein ähnliches Phänomen fanden wir bei dem Cystein-Serin-Austausch von Cor a 1.0301 AS 49 – 63 und AS 112 – 123, wie oben beschrieben. Das Cor a 1.0404 hat im Gegensatz zu allen Cor a 1-Varianten in der Position 99 ein Prolin. Austausche gegen Prolin sind dafür bekannt, die Sekundärstruktur eines Proteins zu verändern. Somit schlussfolgerten Lüttkopf et al., dass das Prolin das Epitop und seine Faltung stark beeinträchtigt und somit zu einer geringeren immunologischen Reaktivität führt [119].

Wir fanden in der Cor a 1.0301-Sequenz ein IgE-bindendes Peptid (AS 85 – 102). Die homologen Sequenzen anderer Cor a 1-Varianten wiesen hier keinerlei Bindung auf. Ein Grund könnte ebenfalls der Austausch des Prolins (als Strukturbrecher) oder des hydrophoben Valins an Position 90 gegen ein Alanin (Alignment in Abbildung 35) in Kombination mit dem Austausch von Serin statt Glycin (S92G) sein, wobei Glycin bei Bet v 1 und allen anderen Cor a 1-Varianten konserviert ist. Diese beiden Aminosäureaustausche führen zu einem einzigartigen Epitop. Diesem Bereich geht ein weiteres IgE-bindendes Peptid auf Cor a 1.0301 in Position AS

67 – 79 voran. Es hat ebenfalls zwei entscheidende Austausche, nämlich Glutamin an Position 70 (Q70) und 79 (Q79). Die Position 70 ist sehr interessant, dort wechselt das basische Histidin (H70) im Cor a 1.04 der Haselnuss in die saure Glutaminsäure (E70) der Haselpollen (Cor a 1.01). Der Austausch dieser Position durch das polare Glutamin (Q70) in Cor a 1.03 der Haselblätter führt zur Formation eines Epitops. Ähnlich verhält es sich an Position 79. Hier werden das Asparagin (N79) von Cor a 1.01 und das Histidin (H79) von Cor a 1.04 und Cor a 1.02 gegen das polare Glutamin (Q79) in Cor a 1.03 ausgetauscht. Gleich zwei deutlich funktionsbeeinflussende Austausche gegen Glutaminreste in einer sonst stark konservierten Region scheinen hier für die IgE-Reaktivität verantwortlich zu sein (Alignment in der Abbildung 35). Bei Übertragung dieser beiden IgE-reaktiven Peptide von Cor a 1.03 (AS 67 – 79 und AS 85 – 102) auf die Kristallstruktur von Bet v 1 (Abbildung 36) formen die Peptide drei nebeneinander parallel verlaufende β -Faltblätter ($\beta 4$ – $\beta 6$), sodass die oben genannten Austausche räumlich zusammentreffen. All diese Gründe sprechen für ein konformatorisches IgE-reaktives Epitop von Cor a 1.03 (AS 67 – 79 und AS 85 – 102), das sich grundlegend in von denen der Haselpollen und der Haselnuss unterscheidet.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse unter Berücksichtigung der bisher publizierten Literatur auf das Vorhandensein mehrerer konformatorischer Epitope. In der Api g 1.0101 Sequenz formen die Aminosäuren 9 – 12 und 103 – 114 das erste Epitop (grün in der Abbildung 36). Das zweite Epitop wird durch die Aminosäuren 16 – 30 und 136 – 147 geformt (magenta in der Abbildung 36). Analog dazu wird ein Epitop in der Cor a 1.0301-Sequenz von den Aminosäuren 19 – 39 und 139 – 150 gebildet (magenta in der Abbildung 36). Ein weiteres Epitop von Cor a 1.0301 befindet sich an den Aminosäurepositionen 67 – 79 und 85 – 102 (hellblau in der Abbildung 36) und korrespondiert damit zum vorgeschlagenen konformatorischen Epitop (gelb in der Abbildung 36) von Schirmer et al. [21].

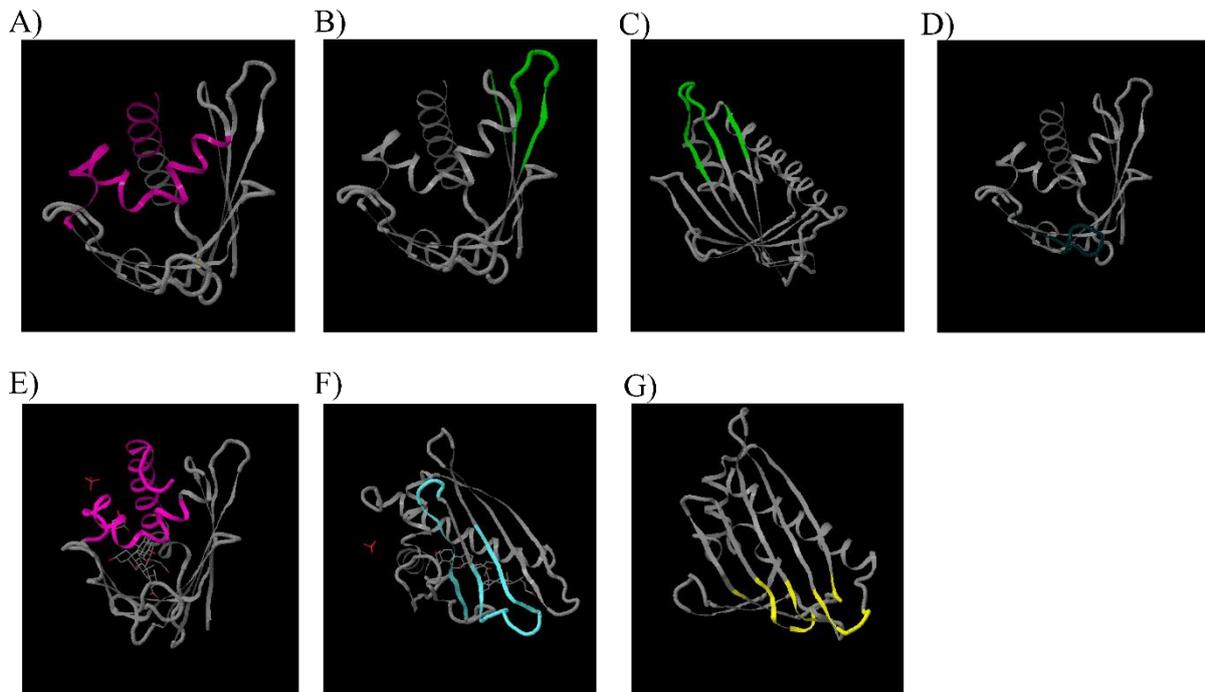


Abbildung 36: Lage der putativen konformatorischen Epitope

A) Api g 1. 0101 AS 16 – 39 und 136 – 153. B) Api g 1.0101 AS 9 – 12 und 103 – 114. C) wie B rotiert zur Veranschaulichung. D) Api g 1.0101 Glycin-reiche Schleife AS 45 – 52. E) Cor a 1.0301-Sequenz auf Bet v 1.0101-Kristallstruktur projiziert AS 19 – 39 und 139 – 160. F) Cor a 1.0301 AS 67 – 79 und 85 – 102. G) Api g 1.0101 AS 2 – 3, 84 – 88, 96 – 98 und 121 – 125 als putatives Epitop entsprechend der Publikation von Schirmer et al. [21]

Zusätzlich konnten IgE-Bindungen an mehrere Peptide von Api g 1.0101, die die Glycin-reiche Schleife beinhalten, nachgewiesen werden (Spots 16 – 19). Im Gegensatz zu den anderen Peptiden korrelierten die Peptide GDGGPGTLKIIT (Spot 16) und IITLPDGGPITT (Spot 19) mit der Schwere der klinischen Symptomatik. Probanden mit einer Bindung zu Spot 16 und 19 hatten meist die Beteiligung des kardiovaskulären Systems und insgesamt hohe Werte im Gesamtscore. Dagegen zeigten Probanden, die nur mit einer Kontakturtikaria der Schleimhaut reagiert hatten, kaum eine Bindung zu diesen beiden Peptiden. Ein Grund dafür könnte der Erhalt der kurzen Sequenz (Glycin-reichen Schleife) beim Kochen oder beim Verdau sein. Deshalb würde diese Sequenz als lineares Epitop schwere systemische Reaktionen auslösen, ähnlich wie bei Speicherproteinen. Bei den anderen Peptiden ließen sich solche allgemeinen Korrelationen nicht ableiten. Die Muster unserer Probanden korrelierten auch nicht mit der Atopie. Jedoch korreliert die Höhe des IgE partiell mit der Signalintensität einzelner Peptide und somit mit der Stärke der Ligandenbindung bei spezifischer Epitoperkennung.

Somit ergeben sich mehrere Peptide, die für einen diagnostischen Test ausgewählt werden können (Tabelle 17).

Tabelle 17: Potentielle diagnostische Peptide von Api g 1 und Cor a 1

Spezifität für Sellerie	Spezifität für Haselnuss
VLVPTADGGSIC	LFKSYVLDGDKL
GDGGPGTLKIIT	DKLIPKVAPQAI
IITLPGGPITT	ERVDEVDNTNFT
GGPGTIKKICFD*	YIKQKVEEIDQA
GTIKKICFDEGS*	TPSVISAARLFK
GSILKSISKYHT*	SVIEGDALSDKL
AEKIFQGFVIDV	IKMAAAPHGGGS
IFQGFVIDVDTV	AAAPHGGGSILK
ANEQNTALFKAL	EMAEKLLRAVET

* Sequenz stammt vom Cor a 1.0301

Um die Relevanz der identifizierten Peptide im zellulären Testsystem zu untersuchen, wurde ein Probeversuch durchgeführt. Dabei verwendeten wir das Peptid AEKIFQGFVIDV als Bruchstück des konformationalen Epitops zur Aktivierung basophiler Granulozyten (Daten hier nicht dargestellt). Tatsächlich ließen sich die Basophilen von Sellerieallergikern bis zu 38,5 % der maximalen Degranulation damit stimulieren. Diese Stimulation war nur mit Zellen von Probanden möglich, bei denen auch eine IgE-Bindung auf der Membran an dieses Peptid nachgewiesen wurde. Dieser Vorversuch scheint die klinische Relevanz dieses Peptides als Bruchstück des Gesamtepitops zu bestätigen, wobei epitopspezifisches rezeptorgebundenes IgE das Peptid erkannt und zur Degranulation der Basophilen geführt hat. Weitere Untersuchungen mit den identifizierten Peptiden und mit Peptidkombinationen zu einem Gesamtepitop sind notwendig. Durch Substitution einzelner Aminosäuren in solchen Epitopen oder Epitopbruchstücken, können Peptide mit starker Bindung zu diagnostischen Zwecken (Microarray, Biochip) und Peptide mit abgeschwächter IgE-Bindung und dennoch guter T-Zell-Reaktivität zu therapeutischen Zwecken (Hyposensibilisierung, Immunmodulation) eingesetzt werden. In einem weiteren Vorversuch konnte gezeigt werden, dass sich dafür die Substitutionsanalyse mittels SPOT-Synthese sehr gut eignet. Innerhalb der Glycin-reichen Schleife (Api g 1.0101 AS 46 – 57) und eines „Teilepitops“ (Api g 1.0101 AS 17 – 30) konnten kritische Bereiche mit gesteigerter Bindung oder dem vollständigen Verlust der IgE-Bindung nachgewiesen werden. Interessanterweise führten natürliche Mutationen in den kritischen Positionen (Api g 1.0101 und Cor a 1.01 – 1.04) zu einer gleich starken oder gesteigerten IgE-Bindung im Vergleich zur Bet v 1-Sequenz. Dagegen waren die kritischen Bereiche, dessen Mutation zum Verlust der Bindung führte, über die Sequenzen konserviert. So wie in unserem Vorversuch zur IgE-Bindung konnte auch Ma et al. anhand einer rekombinant hergestellten fünf-

Punkt-Mutante von Mal d 1 zeigen, dass einzelne Aminosäureaustausche die IgE-Bindung und Reaktivität *in vivo* wesentlich beeinflussen [123].

Die Muster der Epitoperkennung innerhalb allergischer Probanden sind nicht uniform und können stark variieren (siehe Ergebnisse Kapitel 4.4). Das Serum einzelner Allergiker zeigt eine IgE-Reaktivität gegenüber mehreren Peptiden einer Sequenz, wobei die Seren anderer Allergiker nur einzelne Regionen erkannten. Der Epitoperkennung scheint eine polyklonale Immunantwort zugrunde zu liegen. Genau wie die Ergebnisse der unterschiedlichen IgE-Bindung innerhalb der Patienten konnten bereits viele Studien auch auf der T-Zell-Ebene variable Epitoperkennungsmuster zeigen [106, 118, 121, 124, 125]. Dabei wurde diese Variabilität für Epitope von Bet v 1 [112, 118], Mal d 1 [121], Api g 1 [121] und Dau c 1 [121], Ara h 1 [125], Gliadinen [106, 126] und vielen anderen Allergenen beschrieben. Somit wird es schwierig, einzelne Peptide für ein diagnostisches Tool auszuwählen. Vielmehr werden mehrere definierte Peptide benötigt, um die diagnostische Sicherheit zu erhöhen.

Neben der polyklonalen Epitoperkennung der Allergiker kann die unspezifische Epitoperkennung der Gesunden die diagnostische Sicherheit verringern. Im Serum der gesunden Probanden wurde das Gesamt-IgE bestimmt und es konnte auch IgE-Bindung zu Peptiden nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Kapitel 4.4). Dabei war das Bindungsmuster von Seren einiger gesunder Probanden teilweise sehr ähnlich zu dem Bindungsmuster der Seren von Allergikern.

Ebner et al. haben die IgE-Erkennungsmuster der Seren von Gesunden und Allergikern untersucht und eine interessante Beobachtung gemacht [127]. Nach Injektion eines Birkenpollenextraktes bei fünf gesunden Probanden zur Induktion einer Immunantwort wurde die Epitoperkennung der darauf gebildeten Bet v 1-spezifischen T-Zell-Klone untersucht. Als Vergleich wurden Seren von atopischen Birkenpollenallergikern analysiert. Gesunde und Allergiker zeigten identische T-Zell-Epitope mit Produktion von IL-4 und Interferon- γ (IFN- γ). Der Unterschied lag jedoch darin, dass die Allergiker vermehrt IL-4 produzierten und es zur Produktion von Bet v 1 spezifischem IgE kam. Bei den Gesunden induzierte die Stimulation trotz identischer Epitop-Repertoires die Produktion von IgG statt IgE [127]. Ein ähnliches Phänomen stellten Blaser und Mitarbeiter bei der Untersuchung von Bienengiftallergikern und Gesunden fest [128]. Dabei war das Verhältnis der gebildeten Zytokine IL-4 und IFN- γ von der Allergenkonzentration und der Bindungsstärke des MHC-II-Antigenkomplexes mit dem korrespondierenden TCR abhängig [128]. Diese Versuche sind ganz wesentlich, um die

Ergebnisse von T-Zell-Epitop-Studien zu interpretieren. Es reicht nicht der Nachweis einer Stimulation, sondern es ist immer notwendig, auch den Nachweis einer IgE-Antwort zu führen. Da jedoch auch das IgE von Gesunden mit den diagnostischen Peptiden interagiert, müssen weitere Studien mit Substitutionsanalysen der „Kandidatpeptide“ eines diagnostischen Testsystems durchgeführt werden, um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei wichtigen Aspekten der Nahrungsmittelallergie infolge immunologischer Kreuzreaktionen. Im ersten Teil der Arbeit wurden pollensensibilisierte Haselnuss- und Sellerieallergiker identifiziert und der Einfluss der Sortenart und die Anbaubedingungen von Knollensellerie auf die allergische Reaktion untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Seren der Haselnuss- und Sellerieallergikern sowie von gesunden Probanden dazu verwendet, ein optimiertes SPOT-Synthese- und Inkubationsprotokoll zu erarbeiten. Zum einen wurden IgE-bindende Epitope der Hauptallergene Cor a 1 und Api g 1 näher untersucht. Zum anderen wurden lineare IgE-bindende Peptide für die zukünftige Entwicklung eines kostengünstigen peptidbasierten diagnostischen Tests identifiziert. 27 Probanden mit anamnestischer Sellerieallergie wurden mittels Prick-Test, spezifischem IgE und doppel-blinder, Placebo-kontrollierter Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC) untersucht. Bei 21 Probanden konnte eine klinisch relevante Sellerieallergie bestätigt werden. Davon wurden 19 Sellerieallergiker mittels Prick-zu-Prick-Test mit zehn verschiedenen Selleriesorten untersucht. Der Anbau der Sorten Prinz und Monarch erfolgte dabei jeweils unter normalen Bedingungen und unter Trockenstress. Die Sorte Anita löste die kleinste (Median 5 mm) Hautreaktion aus. Von den industriell weit verbreiteten Sorten führten Rex und Prinz zu den größten (Median 7 mm) Reaktionen. Die unter Trockenstress angebauten Sorten zeigten keine signifikanten Unterschiede zum normalen Anbau. Die Sorten Anita und Prinz wurden anschließend für eine DBPCFC bei 16 Sellerieallergikern ausgewählt. Zur Bewertung der klinischen Reaktion wurde ein Score, bestehend aus subjektiven und objektiven Symptomen, eingesetzt. Im Durchschnitt lag der Gesamtscore bei der Sorte Anita geringer als bei der Sorte Prinz. Die Unterschiede im Gesamtscore von Anita waren sowohl gegenüber Sellerie ($p = 0,031$, Wilcoxon-Test) als auch gegenüber Prinz ($p = 0,001$) hoch signifikant. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Sortenart von Knollensellerie einen wesentlichen Einfluss auf die klinische Reaktion ausübt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein optimiertes Protokoll zur Detektion von IgE-Bindung an synthetisch hergestellte Peptide mittels SPOT-Synthese erarbeitet. Dafür wurden die experimentellen Bedingungen in Hinsicht auf den Membrantyp, die Peptidbeladung, Synthesequalität, Peptidlängen, das Detektions- und Visualisierungssystem, die Blockierungsreagenzien und Inkubationsparameter untersucht. Durch die Modifizierung der Herstellungsschritte konnten N-CAPE-Membranen mit sehr hoher und gleichmäßiger Beladung bis zu 800 nmol/cm^2 hergestellt werden. Die besten Ergebnisse wurden auf hoch beladenen N-CAPE-Membranen ($640 - 760 \text{ nmol/cm}^2$) bei einem Sequenzfenster von zwölf Aminosäuren erzielt. Durch definierte Inkubationsbedingungen zur Vermeidung unspezifischer Bindungen und reproduzierbarer Signalauswertung ermöglicht der Assay unter Minimierung der Fehlerquellen im Detektions- und Visualisierungssystem eine sensible Identifikation von IgE-Bindung an membrangebundene Peptide.

Der Assay wurde anschließend zur Untersuchung IgE-bindender Peptide und Epitope von der Api g 1 und Cor a 1 Sequenz verwendet. Hierzu wurden die Sequenzen von Api g 1.0101 und Cor a 1.0101 – 1.0404 in ein Set 12merer überlappender Peptide zerlegt und mit Seren von 26 Haselnuss-, 21 Sellerieallergikern und 17 gesunden Probanden untersucht. Die Ergebnisse liefern starke Hinweise für das Vorliegen mehrerer konformatorischer Epitope der Proteine Api g 1 und Cor a 1. Auf der Api g 1.0101 Sequenz formen die Aminosäuren 9 – 12 und 103 – 114 das erste Epitop. Das zweite Epitop wird durch die Aminosäuren 16 – 30 und 136 – 147 gebildet. Analog dazu wird ein Epitop auf der Cor a 1.0301-Sequenz von den Aminosäuren 19 – 39 und 139 – 150 gebildet. Ein weiteres Epitop bei Cor a 1.0301 befindet sich an den Aminosäurepositionen 67 – 79 und 85 – 102. Zusätzlich konnte eine IgE-Bindung an Peptide der Glycin-reichen Schleife nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den anderen Peptiden korrelierten die sIgE-Bindungen an die Peptide GDGGPGTLKIIT und IITLPDGGPITT mit der Schwere der klinischen Symptomatik. Probanden mit einer Bindung zu diesen Peptiden wiesen meist die Beteiligung des kardiovaskulären Systems und insgesamt hohe Werte im Gesamtscore auf. Dagegen zeigten die Seren von Probanden mit isoliertem oralen Allergiesyndrom kaum eine Bindung zu diesen beiden Peptiden. Zusätzlich wurde ein Api g 1-Peptid (VLVPTADGGSIC) identifiziert, welches zur Unterscheidung von Sellerieallergikern gegenüber Gesunden aber auch pollensensibilisierten Haselnussallergikern verwendet werden kann. Darüber hinaus wurden mehrere Peptide mit Spezifität für Api g 1 und Cor a 1 identifiziert. Diese Ergebnisse können als ein erster Schritt zur Entwicklung eines kostengünstigen peptidbasierten diagnostischen Testsystems verwendet werden. Durch Substitution einzelner Aminosäurepositionen können die Peptide mit stärkerer

Bindung zu diagnostischen und schwächerer Bindung zu therapeutischen Zwecken weiterentwickelt werden.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A, Allergy EF, Anaphylaxis Guidelines G. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014; 69(8): 992-1007.
- 2 Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(3): 638-46.
- 3 Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, Dubois A, duToit G, Eigenmann P, Fernandez Rivas M, Halken S, Hickstein L, Host A, Knol E, Lack G, Marchisotto MJ, Niggemann B, Nwaru BI, Papadopoulos NG, Poulsen LK, Santos AF, Skypala I, Schoepfer A, Van Ree R, Venter C, Worm M, Vlieg-Boerstra B, Panesar S, de Silva D, Soares-Weiser K, Sheikh A, Ballmer-Weber BK, Nilsson C, de Jong NW, Akdis CA, Allergy EF, Anaphylaxis Guidelines G. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* 2014; 69(8): 1008-25.
- 4 Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, Sodergren E, Dahlstrom J, Lindner T, Sigurdardottir ST, McBride D, Keil T. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(5): 1210-8 e4.
- 5 Worm M, Kleine-Tebbe J, Schäfer C, Reese I, Saloga J, Treudler R, Zuberbier T, Wassmann A, Fuchs T, Dölle S, Raithel M, Ballmer-Weber B, Niggemann B, Werfel T. Food allergies resulting from immunological cross-reactivity with inhalant allergens. *Allergo J Int* 2014; 23: 1-16.
- 6 Kleine-Tebbe J, Herold DA. Kreuzreaktive Allergenkluster bei pollenassoziierter Nahrungsmittelallergie. *Hautarzt* 2003; 54: 130-7.
- 7 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Allergie und Hypersensibilität. Immunologie*. 5. Heidelberg Berlin: Spektrum, 2002: 505 - 33.
- 8 Saloga JK, L.; Buhl, R.; Mann, WJ.; Knop, J.; Grabbe, S., *Allergologie-Handbuch. Grundlagen und klinische Praxis*. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Vol. Kapitel 1, 8 und 9. 2011, Stuttgart: Schattauer.
- 9 Radauer C, Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(3): 518-25.
- 10 Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* 2004; 14(8): 461-9.
- 11 Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(7): 920-9.

- 12 Fotisch K, Vieths S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj J* 2001; 18(5): 373-90.
- 13 Jappe U, Petersen A, Raulf-Heimsoth M. Allergische Soforttypreaktionen und kreuzreaktive Kohlenhydratepitope (CCD). *Allergo J* 2013; 22(1): 25-32.
- 14 Mari A, Ooievaar-de Heer P, Scala E, Giani M, Pirrotta L, Zuidmeer L, Bethell D, van Ree R. Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans. *Allergy* 2008; 63(7): 891-6.
- 15 van der Veen MJ, van Ree R, Aalberse RC, Akkerdaas J, Koppelman SJ, Jansen HM, van der Zee JS. Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(3): 327-34.
- 16 Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, Mari A, Muraro A, Ollert M, Poulsen LK, Vieths S, Worm M, Hoffmann-Sommergruber K. Position paper of the EAACI: Food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015.
- 17 Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(10): 1599-606.
- 18 Worm M, Hompes S, Fiedler EM, Illner AK, Zuberbier T, Vieths S. Impact of native, heat-processed and encapsulated hazelnuts on the allergic response in hazelnut-allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(1): 159-66.
- 19 Jankiewicz A, Aulepp H, Baltes W, Bogl KW, Dehne LI, Zuberbier T, Vieths S. Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen-sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111(3): 268-78.
- 20 Paschke A. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53(8): 959-62.
- 21 Schirmer T, Hoffmann-Sommergrube K, Susani M, Breiteneder H, Markovic-Housley Z. Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity. *J Mol Biol* 2005; 351(5): 1101-9.
- 22 Scheurer S, Metzner K, Haustein D, Vieths S. Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol* 1997; 34(8-9): 619-29.
- 23 Hurlburt BK, Offermann LR, McBride JK, Majorek KA, Maleki SJ, Chruszcz M. Structure and function of the peanut panallergen Ara h 8. *J Biol Chem* 2013; 288(52): 36890-901.
- 24 Berkner H, Neudecker P, Mittag D, Ballmer-Weber BK, Schweimer K, Vieths S, Rosch P. Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins. *Biosci Rep* 2009; 29(3): 183-92.
- 25 Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8(1): 82-6.

- 26 Welter S, Lehmann K, Dolle S, Schwarz D, Weckwerth W, Scheler C, Worm M, Franken P. Identification of putative new tomato allergens and differential interaction with IgEs of tomato allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 2013; 43(12): 1419-27.
- 27 Dolle S, Schwarz D, Lehmann K, Weckwerth W, George E, Worm M, Franken P. Tomato allergy: impact of genotype and environmental factors on the biological response. *J Sci Food Agric* 2011; 91(12): 2234-40.
- 28 Zuidmeer L, van Leeuwen WA, Kleine Budde I, Breiteneder H, Ma Y, Mills C, Sancho AI, Meulenbroek EJ, van de Weg E, Gilissen L, Ferreira F, Hoffmann-Sommergruber K, van Ree R. Allergenicity assessment of apple cultivars: hurdles in quantifying labile fruit allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141(3): 230-40.
- 29 Nybom H, Cervin-Hoberg C, Andersson M. Oral challenges with four apple cultivars result in significant differences in oral allergy symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 161(3): 258-64.
- 30 Gao Z, van de Weg EW, Matos CI, Arens P, Bolhaar ST, Knulst AC, Li Y, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biol* 2008; 8: 116.
- 31 Tada Y, Nakase M, Adachi T, Nakamura R, Shimada H, Takahashi M, Fujimura T, Matsuda T. Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett* 1996; 391(3): 341-5.
- 32 Datema MR, Zuidmeer-Jongejan L, Asero R, Barreales L, Belohlavkova S, de Blay F, Bures P, Clausen M, Dubakiene R, Gislason D, Jedrzejczak-Czechowicz M, Kowalski ML, Knulst AC, Kralimarkova T, Le TM, Lovegrove A, Marsh J, Papadopoulos NG, Popov T, Del Prado N, Purohit A, Reese G, Reig I, Seneviratne SL, Sinaniotis A, Versteeg SA, Vieths S, Zwinderman AH, Mills C, Lidholm J, Hoffmann-Sommergruber K, Fernandez-Rivas M, Ballmer-Weber B, van Ree R. Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: A EuroPrevall outpatient clinic survey. *J Allergy Clin Immunol* 2015.
- 33 www.allergome.org.
- 34 Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, Luttkopf D, Calamari M, Ansaloni R, Scibilia J, Ballmer-Weber BK, Poulsen LK, Wutrich B, Hansen KS, Robino AM, Ortolani C, Conti A. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(3): 563-70.
- 35 Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, Ferreira F, Sperr WR, Valent P, Rohac M, Rumpold H, Scheiner O, Kraft D. 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): 927-36.
- 36 Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, Lang R, Fernandez-Rivas M, Cardona V, Kowalski ML, Jutel M, Poziomkowska-Gesicka I, Papadopoulos NG, Beyer K, Mustakov T, Christoff G, Bilo MB, Muraro A, Hourihane JO, Grabenhenrich LB. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy* 2014; 69(10): 1397-404.

- 37 Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, Lluch-Bernal M, Ostling J, Mattsson L, Schocker F, Vieths S, Poulsen LK. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(5): 1134-41, 41 e1-3.
- 38 Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Beyer K, Defernez M, Sperrin M, Mackie AR, Salt LJ, Hourihane JO, Asero R, Belohlavkova S, Kowalski M, de Blay F, Papadopoulos NG, Clausen M, Knulst AC, Roberts G, Popov T, Sprickelman AB, Dubakiene R, Vieths S, van Ree R, Crevel R, Mills EN. How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(4): 964-71.
- 39 Taylor SL, Baumert JL, Kruizinga AG, Remington BC, Crevel RW, Brooke-Taylor S, Allen KJ, Allergen Bureau of A, New Z, Houben G. Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: report of the VITAL Expert Panel. *Food Chem Toxicol* 2014; 63: 9-17.
- 40 Wuthrich B, Stager J, Johansson SG. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990; 45(8): 566-71.
- 41 Vieths S, Jankiewicz A, Wuthrich B, Baltes W. Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75(1): 48-55.
- 42 Bohle B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy* 2007; 62(1): 3-10.
- 43 Ballmer-Weber BK, Vieths S, Luttkopf D, Heuschmann P, Wuthrich B. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2): 373-8.
- 44 Hompes S, Dolle S, Grunhagen J, Grabenhenrich L, Worm M. Elicitors and co-factors in food-induced anaphylaxis in adults. *Clin Transl Allergy* 2013; 3(1): 38.
- 45 Worm M. Nahrungsmittelallergie als Systemreaktion bei einer Anaphylaxie. *Allergo J* 2015; 24(3): 16-7.
- 46 Ballmer-Weber BK, Hoffmann A, Wuthrich B, Luttkopf D, Pompei C, Wangorsch A, Kastner M, Vieths S. Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Allergy* 2002; 57(3): 228-35.
- 47 Henzgen M, Ballmer-Weber BK, Erdmann S, Fuchs T, Kleine-Tebbe J, Lepp U, Niggemann B, Raithel M, Reese I, Saloga J, Vieths S, Zuberbier T, Werfel T, German Society of A, Clinical I, Physicians' Association of German A, Society of Pediatric A, Swiss Society of A. Skin testing with food allergens. Guideline of the German Society of Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Physicians' Association of German Allergologists (ADA) and the Society of Pediatric Allergology (GPA) together with the Swiss Society of Allergology. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6(11): 983-8.
- 48 Galindo-Pacheco LV, O'Farrill-Romanillos PM, Amaya-Mejia AS, Almeraya-Garcia P, Lopez-Rocha E. [Anaphylaxis secondary to prick-to-prick tests to foods and its risk factors]. *Rev Alerg Mex* 2014; 61(1): 24-31.

- 49 Masthoff LJ, Mattsson L, Zuidmeer-Jongejan L, Lidholm J, Andersson K, Akkerdaas JH, Versteeg SA, Garino C, Meijer Y, Kentie P, Versluis A, den Hartog Jager CF, Buijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, van Ree R, van Hoffen E, Pasmans SG. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132(2): 393-9.
- 50 Niggemann B, Beyer K, Erdmann S, Fuchs T, Kleine-Tebbe J, Lepp U, Raithel M, Reese I, Saloga J, Schäfer C, Szepfalusi Z, Vieths S, Zuberbier T, Werfel T, Worm M. Standardisierung von oralen Provokationstests bei Verdacht auf Nahrungsmittelallergie. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) sowie der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA). *Allergo J* 2011; 20: 149-60.
- 51 Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 1992; 48: 9217-32.
- 52 Volkmer R. Synthesis and application of peptide arrays: quo vadis SPOT technology. *Chembiochem* 2009; 10(9): 1431-42.
- 53 Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 1990; 35(3): 161-214.
- 54 Hilpert K, Winkler DF, Hancock RE. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc* 2007; 2(6): 1333-49.
- 55 Reineke U, Kramer A, Schneider-Mergener J. Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 243: 23-36.
- 56 Wenschuh H, Gausepohl H, Germeroth L, Ulbricht M, Matuschewski H, Kramer A, Volkmer-Engert R, Heine N, Ast T, Scharn D, Schneider-Mergener J. Combinatorial Chemistry: A Practical Approach. In: Fenniri H, Editor. Oxford: Oxford University Press, 2000: 95-116.
- 57 Bannon GA, Ogawa T. Evaluation of available IgE-binding epitope data and its utility in bioinformatics. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50(7): 638-44.
- 58 Bolhaar ST, van de Weg WE, van Ree R, Gonzalez-Mancebo E, Zuidmeer L, Buijnzeel-Koomen CA, Fernandez-Rivas M, Jansen J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Gilissen LJ. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(5): 1080-6.
- 59 Dolle S, Lehmann K, Schwarz D, Weckwert W, Scheler C, George E, Franken P, Worm M. Allergenic activity of different tomato cultivars in tomato allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(11): 1643-52.
- 60 Van Gasse AL, Mangoldt EA, Faber M, Sabato V, Bridts CH, Ebo DG. Molecular allergy diagnosis: status anno 2015. *Clin Chim Acta* 2015; 444: 54-61.

- 61 Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129(5): 1187-97.
- 62 Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, Durham S, Fokkens W, Gjomarkaj M, Haahtela T, Bom AT, Wohrl S, Maibach H, Lockey R. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy* 2013; 3(1): 3.
- 63 Henzgen M, Ballmer-Weber BK, Erdmann S, Fuchs T, Kleine-Tebbe J, Lepp U, Niggemann B, Raithel M, Reese I, Saloga J, Vieths S, Zuberbier T, Werfel T. Skin testing with food allergens. Guideline of the German Society of Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Physicians' Association of German Allergologists (ADA) and the Society of Pediatric Allergology (GPA) together with the Swiss Society of Allergology. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6(11): 983-8.
- 64 Rueff F, Bergmann KC, Brockow K, Fuchs T, Grubl A, Jung K, Klimek L, Musken H, Pfaar O, Przybilla B, Sitter H, Wehrmann W. [Skin tests for diagnostics of allergic immediate-type reactions. Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology]. *Pneumologie* 2011; 65(8): 484-95.
- 65 Worm M, Kleine-Tebbe J, Schäfer C, Reese I, Saloga J, Treudler R, Zuberbier T, Wassmann A, Fuchs T, Dölle S, Raithel M, Ballmer-Weber B, Niggemann B, Werfel T. Nahrungsmittelallergie infolge immunologischer Kreuzreaktivitäten mit Inhalationsallergenen. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), des Ärzteverbands Deutscher Allergologen (AeDA) und der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA). *Allergo J Int* 2014; 23: 1-16.
- 66 Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. Standardisation of spirometry. *European Respiratory Journal* 2005; 26(2): 319-38.
- 67 Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Atkins FM, Andre C, Brujnzeel-Koomen C, Burks AW, Bush RK, Ebisawa M, Eigenmann PA, Host A, Hourihane JO, Isolauri E, Hill DJ, Knulst A, Lack G, Sampson HA, Moneret-Vautrin DA, Rance F, Vadas PA, Yunginger JW, Zeiger RS, Salminen JW, Madsen C, Abbott P. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin Exp Allergy* 2004; 34(5): 689-95.
- 68 Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993; 186(1): 23-31.
- 69 Oranje AP. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: SCORAD Index, objective SCORAD, patient-oriented SCORAD and Three-Item Severity score. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 149-55.
- 70 Kramer A, Reineke U, Dong L, Hoffmann B, Hoffmuller U, Winkler D, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J. Spot synthesis: observations and optimizations. *J Pept Res* 1999; 54(4): 319-27.
- 71 Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 2002; 267(1): 13-26.

- 72 Kramer A, Schneider-Mergener J. Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods Mol Biol* 1998; 87: 25-39.
- 73 Krchnak V, Vagner J, Lebl M. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid-base indicator. *Int J Pept Protein Res* 1988; 32(5): 415-6.
- 74 Licha K, Bhargava S, Rheinländer C, Becker A, Schneider-Mergener J, Volkmer-Engert R. Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Lett.* 2000; 41(11): 1711-15.
- 75 Boisguerin P, Leben R, Ay B, Radziwill G, Moelling K, Dong L, Volkmer-Engert R. An improved method for the synthesis of cellulose membrane-bound peptides with free C termini is useful for PDZ domain binding studies. *Chem Biol* 2004; 11(4): 449-59.
- 76 Bray AM, Maeji NJ, Jhingran AG, Valerio RM. Gas phase cleavage of peptides from a solid support with ammonia vapour. Application in simultaneous multiple peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1991; 32(43): 6163-66.
- 77 Weiser AA, Or-Guil M, Tapia V, Leichsenring A, Schuchhardt J, Frommel C, Volkmer-Engert R. SPOT synthesis: reliability of array-based measurement of peptide binding affinity. *Anal Biochem* 2005; 342(2): 300-11.
- 78 Wenschuh H, Volkmer-Engert R, Schmidt M, Schulz M, Schneider-Mergener J, Reineke U. Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* 2000; 55(3): 188-206.
- 79 Hudson D. Matrix assisted synthetic transformations: a mosaic of diverse contributions. II. The pattern is completed. *J Comb Chem* 1999; 1(6): 403-57.
- 80 Tapia V, Ay B, Triebus J, Wolter E, Boisguerin P, Volkmer R. Evaluating the coupling efficiency of phosphorylated amino acids for SPOT synthesis. *J Pept Sci* 2008; 14(12): 1309-14.
- 81 Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Hoffmann-Sommergruber K, Fischer GF, Ebner C. Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur J Immunol* 2003; 33(12): 3303-10.
- 82 Muraro A, Agache I, Clark A, Sheikh A, Roberts G, Akdis CA, Borrego LM, Higgs J, Hourihane JO, Jorgensen P, Mazon A, Parmigiani D, Said M, Schnadt S, van Os-Medendorp H, Vlieg-Boerstra BJ, Wickman M. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: managing patients with food allergy in the community. *Allergy* 2014; 69(8): 1046-57.
- 83 Hofmann C, Scheurer S, Rost K, Graulich E, Jamin A, Foetisch K, Saloga J, Vieths S, Steinbrink K, Adler HS. Cor a 1-reactive T cells and IgE are predominantly cross-reactive to Bet v 1 in patients with birch pollen-associated food allergy to hazelnut. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(5): 1384-92 e6.
- 84 Bohle B, Radakovics A, Luttkopf D, Jahn-Schmid B, Vieths S, Ebner C. Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(10): 1392-9.

- 85 Kitzmuller C, Zulehner N, Roulias A, Briza P, Ferreira F, Fae I, Fischer GF, Bohle B. Correlation of sensitizing capacity and T-cell recognition within the Bet v 1 family. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136(1): 151-8.
- 86 D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 2007; 62(9): 976-90.
- 87 Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Halken S, Poulsen L, van Ree R, Vlieg-Boerstra BJ, Sheikh A. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014; 69(1): 76-86.
- 88 Soost S, Leynaert B, Almqvist C, Edenharter G, Zuberbier T, Worm M. Risk factors of adverse reactions to food in German adults. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(7): 1036-44.
- 89 Le TM, Fritsche P, Bublin M, Oberhuber C, Bulley S, van Hoffen E, Ballmer-Weber BK, Knulst AC, Hoffmann-Sommergruber K. Differences in the allergenicity of 6 different kiwifruit cultivars analyzed by prick-to-prick testing, open food challenges, and ELISA. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(3): 677-9 e1-2.
- 90 Kwaasi AA, Harfi HA, Parhar RS, Collison KS, Al-Sedairy ST, Al-Mohanna FA. Cultivar-specific IgE-epitopes in date (*Phoenix dactylifera* L.) fruit allergy. Correlation of skin test reactivity and ige-binding properties in selecting date cultivars for allergen standardization. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(2): 137-44.
- 91 Zander N. New planar substrates for the in situ synthesis of peptide arrays. *Mol Divers* 2004; 8(3): 189-95.
- 92 Tonikian R, Xin X, Toret CP, Gfeller D, Landgraf C, Panni S, Paoluzi S, Castagnoli L, Currell B, Seshagiri S, Yu H, Winsor B, Vidal M, Gerstein MB, Bader GD, Volkmer R, Cesareni G, Drubin DG, Kim PM, Sidhu SS, Boone C. Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol* 2009; 7(10): e1000218.
- 93 Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 1996; 66: 149-69.
- 94 Landgraf C, Panni S, Montecchi-Palazzi L, Castagnoli L, Schneider-Mergener J, Volkmer-Engert R, Cesareni G. Protein interaction networks by proteome peptide scanning. *PLoS Biol* 2004; 2(1): E14.
- 95 Maurer D, Stingl G. Immunoglobulin E-binding structures on antigen-presenting cells present in skin and blood. *J Invest Dermatol* 1995; 104(5): 707-10.
- 96 Kulczycki A, Jr., Metzger H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. *J Exp Med* 1974; 140(6): 1676-95.
- 97 Jackola DR, Pierson-Mullany LK, Liebeler CL, Blumenthal MN, Rosenberg A. Variable binding affinities for allergen suggest a 'selective competition' among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans. *Mol Immunol* 2002; 39(5-6): 367-77.

- 98 Hantusch B, Scholl I, Harwanegg C, Krieger S, Becker WM, Spitzauer S, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E. Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: discrepancy between IgE and IgG binding strength. *Immunol Lett* 2005; 97(1): 81-9.
- 99 Kim KE, Rosenberg A, Roberts S, Blumenthal MN. The affinity of allergen specific IgE and the competition between IgE and IgG for the allergen in Amb a V sensitive individuals. *Mol Immunol* 1996; 33(10): 873-80.
- 100 Daskalow K, Boisguerin P, Jandrig B, Volkmer R, Micheel B, Schenk JA. Epitope mapping of antibodies against S-tagged fusion proteins and molecular weight markers. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72(2): 346-51.
- 101 Kuhne Y, Reese G, Ballmer-Weber BK, Niggemann B, Hanschmann KM, Vieths S, Holzhauser T. A Novel Multi-peptide Microarray for the Specific and Sensitive Mapping of Linear IgE-Binding Epitopes of Food Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2015; 166(3): 213-24.
- 102 Lin J, Bardina L, Shreffler WG, Andrae DA, Ge Y, Wang J, Bruni FM, Fu Z, Han Y, Sampson HA. Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(2): 315-22, 22 e1-3.
- 103 Ay B, Landgraf K, Streitz M, Fuhrmann S, Volkmer R, Boisguerin P. Using hydroxymethylphenoxy derivatives with the SPOT technology to generate peptides with authentic C-termini. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18(14): 4038-43.
- 104 Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(1): 85-96.
- 105 Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353(6345): 622-7.
- 106 Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, Ikezawa Z, Kaneko S, Kohno K, Dekio S. Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12135-40.
- 107 Mine Y, Rupa P. Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein Eng* 2003; 16(10): 747-52.
- 108 Mine Y, Zhang JW. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *J Agric Food Chem* 2002; 50(9): 2679-83.
- 109 Busse PJ, Jarvinen KM, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(1): 93-6.
- 110 Shin DS, Compadre CM, Maleki SJ, Kopper RA, Sampson H, Huang SK, Burks AW, Bannon GA. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem* 1998; 273(22): 13753-9.

- 111 Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest* 1999; 103(4): 535-42.
- 112 Jahn-Schmid B, Radakovics A, Luttkopf D, Scheurer S, Vieths S, Ebner C, Bohle B. Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(1): 213-9.
- 113 Durauer A, Kopecky E, Berger E, Seifert M, Hahn R, Jungbauer A. Evaluation of a sensitive detection method for peptide arrays prepared by SPOT synthesis. *J Biochem Biophys Methods* 2006; 66(1-3): 45-57.
- 114 Aalberse RC. Food-derived peptides in a diagnostic context: the fewer the better? *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25(3): 206-7.
- 115 Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J* 1989; 8(7): 1935-8.
- 116 Fristensky B, Horovitz D, Hadwiger LA. cDNA sequences for pea disease resistance response genes. *Plant Mol Biol* 1988; 11(5): 713-5.
- 117 Ganglberger E, Grunberger K, Sponer B, Radauer C, Breiteneder H, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Allergen mimotopes for 3-dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE. *FASEB J* 2000; 14(14): 2177-84.
- 118 Ebner C, Szeffalusi Z, Ferreira F, Jilek A, Valenta R, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S, Scheiner O, Kraft D. Identification of multiple T cell epitopes on Bet v I, the major birch pollen allergen, using specific T cell clones and overlapping peptides. *J Immunol* 1993; 150(3): 1047-54.
- 119 Luttkopf D, Muller U, Skov PS, Ballmer-Weber BK, Wuthrich B, Skamstrup Hansen K, Poulsen LK, Kastner M, Haustein D, Vieths S. 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): 515-25.
- 120 Pinilla C, Appel JR, Houghten RA. Functional importance of amino acid residues making up peptide antigenic determinants. *Mol Immunol* 1993; 30(6): 577-85.
- 121 Bohle B, Zwolfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, Keller W, Zuidmeer L, van Ree R, Werfel T, Ebner C. Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1): 242-9.
- 122 Jensen-jarolim E, Leitner A, Kalchhauser H, Zurcher A, Ganglberger E, Bohle B, Scheiner O, Boltz-nitulescu G, Breiteneder H. Peptide mimotopes displayed by phage inhibit antibody binding to bet v 1, the major birch pollen allergen, and induce specific IgG response in mice. *FASEB J* 1998; 12(15): 1635-42.
- 123 Ma Y, Gadermaier G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, Breiteneder H, Briza P, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F. Mutational analysis of amino

acid positions crucial for IgE-binding epitopes of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139(1): 53-62.

124 Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ, Grimm R, Jahn-Schmid B, Breiteneder H, Kraft D, Breitenbach M, Rheinberger HJ, Scheiner O. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J* 1998; 12(2): 231-42.

125 Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA. 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): 334-9.

126 Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, Bodinier M, Denery-Papini S. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 2005; 60(6): 815-21.

127 Ebner C, Schenk S, Najafian N, Siemann U, Steiner R, Fischer GW, Hoffmann K, Szepfalusi Z, Scheiner O, Kraft D. Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J Immunol* 1995; 154(4): 1932-40.

128 Blaser K. Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production. *Adv Exp Med Biol* 1996; 409: 295-303.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elvira Ruppel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung von Nahrungsmittelallergikern (Sellerie und Haselnuss) und Etablierung neuer Biomarker“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE www.icmje.org kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Die Doktorandin Elvira Ruppel hatte folgenden Anteil an der Publikation:

Ruppel E, Aÿ B, Boisguerin P, Dölle S, Worm M, Volkmer R. Identification of IgE binding to Api g 1-derived peptides. *Chembiochem* 2010 Nov 2; 11(16):2283-93.
Impact-Factor 2014: 3.088

Beitrag im Einzelnen:

Patientenrekrutierung und Durchführung aller klinischen Untersuchungen	95 %
SPOT-Synthese, Protokolloptimierung, Inkubationsstudien	75 %
Datenauswertung, graphische Darstellung und Statistik	100 %
Verfassen, Einreichen und Korrektur des Manuskriptes	70 %
	<u>Gesamtanteil 85 %</u>

Sonstige Publikationen

- 10/2009 **Ruppel E**, Aÿ B, Dölle S, Volkmer R, Worm M. Establishment of peptide-based allergy testing. Vortrag, 20th European Students' Conference, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland. Abstract publiziert in *European Journal of Medical Research* 14 (Supplement II): I-XXII, 54(2009)
- 11/2009 Aÿ B, **Ruppel E**, Dölle S, Kretzschmar I, Worm M, Volkmer R. Perspectives in allergy testing – an approach at the peptide level. Poster, Berlin Immunology Day, RCIS – Research Center Immuno Sciences, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland.
- 03/2012 Dölle S, **Ruppel E**, Welter S, Lehmann K, Schwarz D, Franken P, Worm M. Die klinische Reaktion von Sellerieallergikern unterscheidet sich zwischen verschiedenen Selleriesorten. 24. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, Deutschland.

Datum und Stempel

Prof. Dr. med. M. Worm

Elvira Ruppel

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm für Ihr Vertrauen, Ihre Unterstützung und Ihre Geduld. Ihre Begeisterung, die zahlreichen motivierenden Diskussionen und Ihre kritische Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen haben mich wesentlich beeinflusst. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Margitta Worm für die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Molekulare Bibliotheken von Dr. rer. nat. Rudolf Volkmer sowie dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) Großbeeren, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ferner bin ich Ihnen für die wertvolle Korrektur des Manuskripts dankbar.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. rer. medic. Sabine Dölle für Ihre hervorragende Betreuung während der gesamten Dissertation bedanken. Auch möchte ich mich bei Ihnen für die sehr gute Einarbeitung, Ihre intensive Unterstützung sowie Ihren stetigen wissenschaftlichen und freundschaftlichen Beistand bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm sowie des Allergie-Centrums-Charité für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere Dennis Ernst für die Herstellung von Sellerieextrakten und sowie Dr. med. Hae-Hyuk Lee, Dr. med. Claudia Rasche und Mandana Abdollahnia für die nötige „Rückendeckung“ während der Provokationstestungen.

Herrn Dr. rer. nat. Rudolf Volkmer möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Bibliotheken danken. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Bernhard Ay für die wunderbare Betreuung in der Arbeitsgruppe und intensive Einarbeitung in die SPOT-Synthese. Ich möchte mich auch für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Seine stetige Hilfsbereitschaft bei allen biochemischen Problemen, Seine wertvollen Ideen und Tipps bei der experimentellen Durchführung und Seine fachliche Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) in Großbeeren danke ich für den Anbau und die Bereitstellung der verschiedenen Selleriesorten.

Allen Studienpatientinnen und Studienpatienten möchte ich für Ihren Einsatz und Ihr Durchhaltevermögen bei den zahlreichen klinischen Tests und Provokationstestungen danken.

Auch möchte ich mich bei Dr. med. Thomas Stavermann für sein Interesse an der Fertigstellung dieser Arbeit und bei allen meinen Kolleginnen und Kollegen bedanken.

Nicht zu Letzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern und meinen Freunden für ihre fortwährende moralische und seelische Unterstützung in allen Lebenslagen.