

» T-Zellreaktivität und HLA-DR-Bindung des Latexallergens Hev b 1

Zusammenfassung: Hev b 1 ist das erste molekularbiologisch charakterisierte Latexallergen. Es hat sowohl für Patienten mit Spina bifida als auch für Beschäftigte im Gesundheitswesen allergenes Potenzial. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verglichen wir die zellulären Antworten in den zwei Kollektiven latexallergischer Patienten (Spina bifida-Patienten versus Beschäftigte im Gesundheitswesen) gegenüber dem nativen Hev b 1 und überprüften die Reaktivität von rekombinant hergestelltem Hev b 1. Letzteres ist ein Fusionsprotein bestehend aus Maltosebindeprotein und rHev b 1 (MBP-rHev b 1). Hev b 1 induzierte dosisabhängig in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von mehr als 50% der Latexallergiker (n = 20) aus dem Gesundheitswesen und von 92% der latexallergischen Patienten mit Spina bifida (n = 13) eine signifikante Proliferationsantwort unabhängig von der Höhe des Hev b 1-spezifischen IgEs im Serum. MBP-rHev b 1 erwies sich ebenso wie natives Hev b 1 in den meisten Fällen als guter Induktor der Proliferationsantwort. Das T-Zellepitop-Mapping mit neun überlappenden Peptiden ergab, dass die gesamte Proteinsequenz immunogen ist, allerdings mit unterschiedlichen Intensitäten. 75% der PBMC reagierten mit dem Peptid 91–109. Unter Verwendung stringenter Bedingungen für die Aminosäurezusammensetzung der Ankerpositionen P1, P4, P6 und P9 wurde ein HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv in der Region 102–110 im Hev b 1 vorhergesagt. Die Region 102–110 stellt eine Teilsequenz des experimentell ermittelten T-Zellepitops 91–109 dar. Durch Bindungsstudien der Hev b 1-Peptide an das isolierte HLA-DRB1*0401 konnte gezeigt werden, dass das Peptid 91–109 zu den drei Hev b 1-Peptiden gehört, die sehr gut an HLA-DRB1*0401 binden. Die Vorinkubation mit anti-HLA-DR inhibierte in PBMC von neun der zehn Patienten die rHev b 1-induzierte Proliferation. Anti-HLA-DQ bzw. -HLA-DP-Vorinkubationen führten ebenfalls zu einer Inhibition der Proliferationsantwort, so dass für die Antigenpräsentation der meisten untersuchten Latexallergiker auch HLA-DQ bzw. -DP von Bedeutung sind. Die Untersuchungen belegten, dass das Hev b 1-Peptid 91–109 ein T-Zellepitop mit guter Bindung an isoliertes HLA-DRB1*0401 ist. Da die Hev b 1-Antwort auch HLA-DR abhängig ist, spielt dieses Epitop bei der Allergieauslösung möglicherweise eine entscheidende Rolle. Für zukünftige immuntherapeutische Ansätze könnten diese Befunde von praktischer Bedeutung sein.

M. Raulf-Heimsoth¹, Z. Chen¹, H-P. Rihs¹, B. Maillere², S. Moratille-Pouvelle², R. Cremer³, V. Liebers¹, X. Baur¹

¹ Berufsgenossenschaftliches Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin (BGFA) (Direktor: Prof. Dr. med. X. Baur), Institut an der Ruhr-Universität Bochum, Bochum

² Departement D'Ingénierie et D'Études des Protéines, Gif-sur-Yvette Cedex, Frankreich

³ Kinderkrankenhaus Köln (Prof. Dr. F. Bläker), Köln

T-cell reactivity and HLA-DR binding of the latex allergen Hev b 1:

Hev b 1 is the first molecular-biochemically well-characterized allergen in natural rubber latex. It has a high allergenic potential not only for patients with spina bifida (Sb), but also for health care workers (HCWs). In this study we investigated the cellular proliferation responses induced by both native and recombinantly produced Hev b 1 in two groups of subjects (spina bifida patients and HCWs). The recombinant Hev b 1 (MBP-rHev b 1) was produced as a fusion protein with a maltose-binding-protein (MBP). Our results demonstrate that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of more than 50% of latex-allergic HCWs (n = 20) and of about 92% of Sb-patients with latex allergy (n = 13) responded to purified native Hev b 1 and to MBP-rHev b 1 as well. The proliferation responses were independent of their Hev b 1-specific IgE levels in sera. By using synthetic peptides covering the whole Hev b 1-sequence, we also defined regions in the Hev b 1-molecule which were able to induce PBMC proliferation responses in the majority of latex-allergic individuals. The peptide with the amino acid sequence 91–109 was found to be an immunodominant region containing a predicted HLA-DR4Dw4(DRB1*0401) binding motif. The peptide with the sequence of the region 91–109 showed a strong binding reactivity to the isolated HLA-DRB1*0401-molecule and could induce proliferation PBMC responses in 75% of the patients' PBMC (n = 20). Inhibition experiments with anti-HLA-DR showed that in 90% of the cases the MBP-rHev b 1-induced proliferation responses could be inhibited by the anti-HLA-DR antibodies with inhibition rates from 45% to 75%. In addition, using anti-HLA-DQ and -DP antibodies, the proliferation responses could also be inhibited in 80% and 60% of the cases respectively, indicating that these HLA proteins may also be involved in the antigen presentation process. Our data indicate that the Hev b 1-peptide 91–109 is a T-cell epitope and is able to bind to the isolated HLA-DRB1*0401-molecule according to the predicted HLA-DR4Dw4(DRB1*0401) binding motif in this amino acid sequence (102–110). The ability to define "immunodominant" and "disease-related" T-cell-reactive regions could be of practical value in the future for designing of immunotherapeutics.

Einleitung

Die Proteine der Latexmilch sind Auslöser der IgE-vermittelten Latexallergie [Übersichten 1,2]. Ein erhöhtes Risiko, an einer Allergie zu erkranken, haben Personen, die häufig und lang andauernd Kontakt zu Gegenständen aus Naturlatex haben, wie es bei den beruflich Exponierten des medizinisch-

pflegerischen Bereichs, Spina-bifida-Patienten [3] und Mehrfachoperierten der Fall ist. Bis zu 17% der im Gesundheitswesen Beschäftigten weisen eine Typ I-Sensibilisierung gegenüber Naturlatex auf [4]. In der Studie von Cremer et al. [5] konnten unter 40,5% der untersuchten Kinder mit Spina bifida latexspezifische IgE-Antikörper ($\geq 0,7$ kU/l) nachgewiesen werden.

Mittlerweile wurden zahlreiche Proteine als Allergene identifiziert und charakterisiert [2]. Zu den partikelassoziierten Latexproteinen gehört das Latexallergen Hev b 1 (Rubber Elongation Factor, REF) mit einem Molekulargewicht von 14,6 kDa. Von Czuppon et al. [6] wurde dieses als erstes Latexallergen identifiziert und gemäß der internationalen Allergenomenklatur als Hev b 1 eingeführt. Hev b 1 stellt ein latextypisches Protein dar, da es mit keinem bekannten Protein aus anderen Pflanzenarten homolog ist. Die Bedeutung von Hev b 1 als Allergen belegten nachfolgende Untersuchungen von Chen et al. [7,8]. Darin konnte gezeigt werden, dass Hev b 1 nicht nur allergenes Potenzial für Patienten mit Spina bifida besitzt (81% der latexsensibilisierten Spina bifida Patienten hatten Hev b 1-spezifisches IgE; in 45% der Fälle lag eine Monosensibilisierung gegenüber Hev b 1 vor), sondern dass es auch unter Beschäftigten im Gesundheitswesen ein bedeutsames Allergen darstellt. 52,3% der latexsensibilisierten Personen aus dem Gesundheitswesen besaßen Hev b 1-spezifische IgE-Antikörper [7]. Auch andere Arbeitsgruppen [9,10] beschreiben Hev b 1 (gemeinsam mit Hev b 3 [11]) als wichtiges Allergen für Patienten mit Spina bifida. Mittlerweile konnte Hev b 1 in *E. coli* rekombinant hergestellt werden [12–14].

Die zellulären Wechselwirkungen im Verlauf der allergenspezifischen IgE-Immunantwort werden initiiert nach dem Allergenkontakt mit antigenpräsentierenden Zellen [APC]. Diese Zellen phagozytieren und prozessieren Allergene und präsentieren sie anschließend als Allergenpeptide zusammen mit MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche. T-Helferzellen können MHC-gebundene Peptide erkennen. Dieses führt, unterstützt durch zusätzliche kostimulierende Molekülkontakte, zur T-Zellaktivierung. Die Kenntnis exakter T-Zellepitope (Allergenbereiche, die gemeinsam mit der MHC-II-Struktur der T-Zelle präsentiert werden und diese letztendlich aktivieren) kann bedeutsam für die Behandlung von Allergien im Rahmen einer Immuntherapie sein. In diesem Zusammenhang ist auch unsere Studie der Hev b 1-spezifischen T-Zellantwort bei latexsensibilisierten Patienten aus dem Gesundheitswesen und den Patienten mit Spina bifida zu sehen. In unseren Voruntersuchungen [15,16] konnten wir zeigen,

dass zelluläre Antworten auf unterschiedliche Latexpräparationen, aber auch auf das isolierte und charakterisierte Hev b 1-Molekül in Patienten aus dem Gesundheitswesen nachweisbar waren. Im Rahmen der vorliegenden erweiterten Untersuchungen verglichen wir die zellulären Antworten in den beiden unterschiedlichen Kollektiven (Spina bifida-Patienten versus Beschäftigte im Gesundheitswesen) auf das native Hev b 1 und überprüften die Reaktivität von rekombinant hergestelltem Hev b 1 (MBP-rHev b 1). Diejenigen Regionen im Allergenmolekül, die zellstimulierend wirken (T-Zell-epitope) sowie die Bedeutung der HLA-DR-Region für die Bindung von bestimmten Allergenfragmenten bzw. für die Proliferationsantwort standen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Material und Methoden

Patientenkollektiv

Von insgesamt 53 Probanden mit latexbezogenen Beschwerden wie Rhinitis, Konjunktivitis, Urtikaria und Asthma verwendeten wir Blutlymphozyten. Davon waren 40 Personen Beschäftigte aus dem ärztlich-pflegerischen Bereich des Gesundheitswesens und 13 Patienten mit Spina bifida (Tab. 1). Der Nachweis der Latexsensibilisierung erfolgte einerseits durch einen Pricktest und andererseits durch die Bestimmung der latexspezifischen IgE-Antikörper. Die serologische Untersuchungen zur Bestimmung von Gesamt-IgE bzw. latexspezifischem IgE erfolgten mittels CAP-System von Pharmacia bzw. zum Nachweis von Hev b 1-spezifischem IgE mit an EAST-Scheiben gekoppeltem Allergen. Bei der Mehrzahl der beruflich latexsensibilisierten Personen wurde ein arbeitsplatzbezogener Expositionstest mit gepuderten Latexhandschuhen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden von acht nicht beruflich latexexponierten Personen (ohne Sensibilisierung gegenüber Latex) Blutlymphozyten gewonnen.

Lymphozytenstimulationstest (LST)

Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und bis zur Durchführung der Experimente kryokonserviert. Für die Untersuchung wurden PBMC (5×10^5 /ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen des isolierten, gereinigten Hev b 1 oder mit den Hev b 1-Peptiden fünf Tage lang inkubiert, wobei die letzten 16 Stunden dieser Inkubation in Gegenwart von [3 H]-Thymidin erfolgten. Phytohämagglutinin (PHA 7,5 μ g/ml; Sigma) diente als Positivkontrolle zum Nachweis der Proliferationsfähigkeit der Zellen. Als Maß einer allergenspezifischen

Tab. 1 IgE-Konzentrationen im Serum der beiden untersuchten Patientengruppen.

Kollektiv	Latex-spezifisches IgE	Hev b 6.02-spezifisches IgE	Hev b 1-spezifisches IgE	Gesamt-IgE
Spina bifida Patienten (n = 13)	(> 0,35 kU/l): n = 13 (100%) Median: 10,2 kU/l Bereich: 0,75–> 100 kU/l	(> 0,35 kU/l): n = 3 (von 13; 23%) Median: < 0,35 kU/l Bereich: < 0,35–20,9 kU/l	(> 0,35 kU/l): n = 9 (von 13; 69%) Median: 1,48 kU/l Bereich: < 0,35 kU/l–22,71 kU/l	Median: 236 kU/l Bereich: 4,1–> 2000 kU/l
Beschäftigte aus dem Gesundheitswesen (n = 40)	(> 0,35 kU/l): n = 40 (100%) Median: 11,1 kU/l Bereich: 0,47–> 100 kU/l	(> 0,35 kU/l): n = 29 (von 30; 96%) Median: 4,0 kU/l Bereich: < 0,35–18,4 kU/l	(> 0,35 kU/l): n = 15 (von 30; 50%) Median: 0,64 kU/l Bereich: < 0,35–12,58 kU/l	Median: 160 kU/l Bereich: 12,4–> 2000 kU/l

Stimulation wurde der $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau bestimmt, der Mittelwert aus den sechs parallelen Kulturansätzen berechnet und als Stimulationsindex (SI) ausgewertet. Der Stimulationsindex (SI-Wert) stellt das Verhältnis der eingebauten Radioaktivitätsmenge in einem Ansatz mit Allergen zu einem Zellansatz ohne Allergen in Gegenwart von Medium dar. Ein SI-Wert von 1 entspricht also keiner Stimulation. Als positive Antwort wurde bei dem Allergen ein Stimulationsindex $\geq 2,5$ und bei den Peptiden $\geq 1,5$ gewertet [16]. Diese Werte ergaben sich aus den Stimulationsuntersuchungen nicht latexsensibilisierter Kontrollpersonen (SI-Mittelwert plus 2 SD).

Um den Einfluss der HLA-D-kodierenden Oberflächenproteine auf die Hev b 1-induzierte Proliferationsantwort zu überprüfen, wurden die monoklonalen Antikörper gegen HLA-DR, HLA-DQ und -HLA-DP (Becton Dickinson, Heidelberg) im Lymphozytenstimulationstest (LST) eingesetzt. Um die Inhibitionswirkung der oben genannten Antikörper zu ermitteln, wurden PBMC ($5 \times 10^5/\text{ml}$) eine Stunde lang bei 37°C mit den monoklonalen Antikörpern (Endkonzentration 200 ng/ml) inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit Medium wurde der LST wie oben beschrieben durchgeführt.

Gewinnung von Hev b 1 (nativ) und Herstellung der Hev b 1-Peptiden

Natives Hev b 1 wurde aus Naturlatex (gesammelt von Gummibäumen des *Hevea brasiliensis* Klones RRIM 600, Bezugsquelle Rubber Research Institute of Malaysia) gewonnen [7,8]. Zu diesem Zweck wurde Rohlatex sofort nach der Sammlung mit Ammoniak (Endkonzentration 0,7%) versetzt, mit gleichem Volumen Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,05% Triton X-100) verdünnt und zentrifugiert (41.000 xg, 10°C). Durch Zugabe einer 2%-igen SDS-Lösung (mit 0,02% NaN_3) konnte Hev b 1 von den Gummipartikeln gelöst werden. Zur Entfernung des überschüssigen SDS aus dem Extrakt wurde das lyophilisierte Protein in Tris-Puffer resuspendiert und über eine Säule mit Detergentien-Absorber-Gel gegeben. Zur präparativen Reinigung des Hev b 1 wurde die SDS-freie Lösung mittels reverse-phase HPLC getrennt, entweder lyophilisiert oder konzentriert. Die Reinheit des Hev b 1 wurde durch einen analytischen HPLC-Lauf überprüft. Die Massenbestimmung erfolgte mittels Elektrospray-Massenspektrometer (Finnigan TSQ 7000).

Die Herstellung von Hev b 1-Peptiden [8] erfolgte als schrittweises Festphasenverfahren unter Benutzung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie auf einem „Applied Biosystems 432 A“ Peptidsynthesizer. Es wurden insgesamt neun synthetische Peptide mit 19 Aminosäuren hergestellt, wobei jeweils vier Aminosäuren C- und N-terminal überlappen. Die synthetisierten Peptide wurden durch reverse-phase HPLC gereinigt (95% Reinheitsgrad) und mittels Elektrospray-Massenspektrometrie charakterisiert.

Herstellung von rekombinantem Hev b 1 (MBP-rHev b 1)

Als Ausgangsmaterial für die rekombinante Herstellung von Hev b 1 diente Gesamt-RNA, die aus den Blättern von *Hevea brasiliensis* isoliert wurde. Die mit einem Anteil von ca. 5% darin enthaltene mRNA konnte mittels eines Oligo-dT-Primers unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden [14]. Ein Aliquot dieser cDNA

wurde dann in Gegenwart Hev b 1-spezifischer Primer, die entsprechend aus der von Attanyaka [12] publizierte Nukleotidsequenz des Hev b 1 abgeleitet wurden, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde schließlich in das pMAL-c2-System subkloniert, via Sequenzierung charakterisiert und als Fusionsprotein mit dem Maltosebindprotein (MBP) in *E. coli* exprimiert. Mittels Histaminfreisetzungstest und Immunoblotverfahren konnte die hohe Allergenität des MBP-rHev b 1 Fusionsprotein v.a. in latexallergischen Spina bifida-Patienten ermittelt werden. Es besitzt eine mit nativem Hev b 1 vergleichbare IgE-Bindungsfähigkeit.

T-Zellepitopvorhersagen und HLA-DR-Bindungsstudien

Das Computerprogramm EPILOT [17] wurde verwendet, um T-Zellepitope basierend auf unterschiedlichen Algorithmen vorherzusagen. Potenzielle HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-restringierte T-Zellepitope wurden mit Hilfe des Computerprogramms PROTSHELL (von Prof. Dr. Claude Muller; Laboratoire National de Santé; Boîte Postale 1102, L-1011 Luxemburg) gemäß den publizierten HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindungsmotiven vorhergesagt.

HLA-DR4-Bindungsstudien wurden im Labor von B. Maillere [18] durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Kompetitionstest, in dem das Testpeptid (in unserem Fall die unterschiedlichen Hev b 1-Peptide in unterschiedlichen Verdünnungen) mit einem biotinylierten Standardpeptid (Peptid 306–318 des Hämagglutinins (HA)) um die Bindung an gereinigtem HLA DRB1*0401 konkurriert (Inkubationszeit 24 Std.). Anschließend wurde die Probe in eine 96-Napf-Maxisorp-ELISA-Platte, die mit einem HLA DRB1*0401 spezifischen Antikörper beladen war, überführt. Die Quantifizierung erfolgte durch den Nachweis des gebundenen biotinylierten Peptids nach Inkubation von Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase mit dem Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat. Die maximale Bindung wurde durch Inkubation des biotinylierten Peptids mit dem MHC-Klasse-II-Molekül in Abwesenheit des zu überprüfenden Kompeptitorpeptids ermittelt. Die Überprüfung der Bindungsspezifität erfolgte durch Zugabe eines Überschusses an Standardpeptid. Die Ergebnisse wurden als IC_{50} (M) ausgedrückt und stellten die Peptidkonzentration dar, die 50%-Bindung des biotinylierten Standardpeptids erlaubt. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und aus den Ergebnissen der Mittelwert bestimmt.

Ergebnisse

Lymphozytenstimulationstest (LST) mit Hev b 1

Im Untersuchungskollektiv von 20 latexallergischen Personen aus dem Gesundheitswesen und von dreizehn latexallergischen Patienten mit Spina bifida induzierte Hev b 1 eine spezifische Proliferation ($\text{SI} > 2,5$) in 75% der untersuchten PBMC (13 der 20 latexallergischen Beschäftigten aus dem Gesundheitswesen (65%) und 12 der 13 (92%) latexallergischen Spina bifida-Patienten) (Abb.1). PBMC von Kontrollpersonen zeigten keine signifikante Proliferationsantwort.

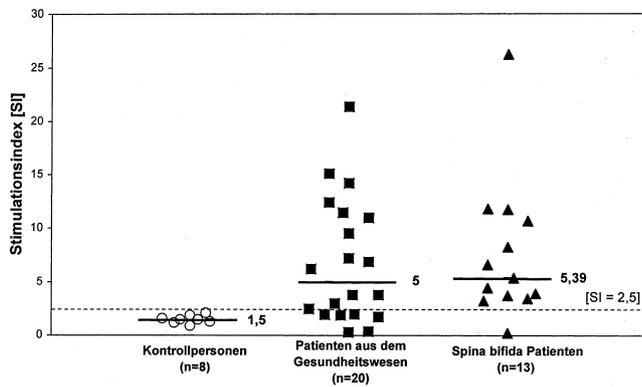


Abb. 1 Vergleich der Hev b 1-induzierten Proliferationsantworten (individuelle SI-Werte) der PBMC von nicht latexsensibilisierten Erwachsenen ohne beruflichen Latexkontakt (n = 8), latexallergischen Patienten aus dem Gesundheitswesen (n = 20) und latexallergischen Patienten mit Spina bifida (n = 13). Die horizontalen Linien markieren jeweils den Medianwert.

Lymphozytenstimulationstest (LST) mit Hev b 1-Peptiden

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde mit den PBMC von neun ausgewählten Patienten mit beruflich erworbener Latexallergie sowie von elf Patienten mit Spina bifida eine detaillierte Untersuchung zur Bestimmung der T-Zell-reaktiven Region im Hev b 1-Molekül durchgeführt. Neun überlappende Peptide, bestehend aus 19 bzw. 17 Aminosäuren, die die gesamte Sequenz von Hev b 1 repräsentieren, wurden für das T-Zellepitop-Mapping eingesetzt. PBMC der latexsensibilisierten Patienten wurden zu diesem Zweck mit den genannten synthetischen Peptiden fünf Tage lang stimuliert und anschließend die Proliferationsantwort über den ³H-Thymidineinbau nachgewiesen (Abb. 2). Positive Proliferationsantworten (SI ≥ 1,5), induziert durch ein bzw. mehrere Peptide, konnten für alle untersuchten PBMC bestimmt werden. Die individuellen Proliferationsantworten nach Stimulation mit den Hev b 1-Peptiden zeigten, dass diesbezüglich keine

signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven existieren (Abb. 2).

Fasst man die individuellen Ergebnisse der peptidinduzierten Proliferationsantworten zusammen und kalkuliert den prozentualen Anteil der reaktiven Probanden (n = 20) bezogen auf das einzelne Peptid, so zeigt sich, dass die gesamte Proteinsequenz immunogen ist (Abb. 3). Allerdings unterscheidet sich die Intensität der Proliferationsantworten, die durch die einzelnen Peptide induziert wurden, deutlich. Die Mehrzahl der PBMC, mehr als 70%, reagierten auf die Peptide 31–49 und 91–109, wobei letzteres in 75% der getesteten Fälle eine positive Proliferationsantwort induzierte. Im Gegensatz dazu induzierte das Peptid 1–19 nur in den PBMC von acht Probanden (40%) eine positive Proliferationsantwort.

T-Zellepitop- und HLADR4Dw4(DRB1*0401)-Vorhersagen

Mit Hilfe des Computerprogramms EPILOT wurde eine T-Zellepitopvorhersage durchgeführt. Fünf Aminosäuresequenzen (38–56, 45–63, 56–74, 82–100 und 104–122) konnten als T-Zellepitope im Hev b 1-Molekül mittels Peptidselektion auf Grund des Algorithmus nach Stille et al. [19] vorhergesagt werden. Diese vorhergesagten Epitope beinhalten Regionen im Hev b 1-Allergen, die auch zu einer gesteigerten zellulären Proliferationsantwort (mehr als 50% der Patienten-PBMC reagierten auf diese Regionen) führten. Dabei handelte es sich um die Regionen 31–49, 71–79 und 91–109. Entsprechend den Kriterien von Sinigaglia und Hammer [20] lassen sich potenzielle HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-restringierte T-Zellepitope nach publizierten HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Peptidbindemotiven mit Hilfe des Computerprogramms PROTSHELL vorhersagen. Unter Verwendung von stringenten Bedingungen der Aminosäurezusammensetzung für die Ankerpositionen P1, P4, P6 und P9 wurde nur ein HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv im Hev b 1-Molekül gefunden. Dabei handelt es sich um die Region 102–110. Legt man weniger stringente Bedingungen zu Grunde (z.B. P4 ist variabel), findet man weitere DR4Dw4-Bindemotive in den

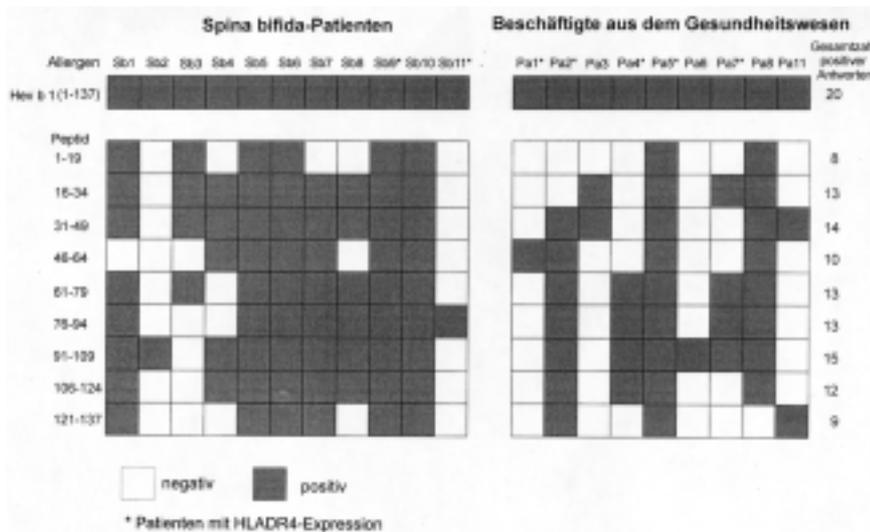


Abb. 2 Zusammenfassung der Proliferationsantworten der 20 untersuchten latexallergischen Patienten auf Hev b 1 und auf die neun Hev b 1-Peptide (für Peptide wurden SI-Werte ≥ 1,5 als positiv betrachtet).

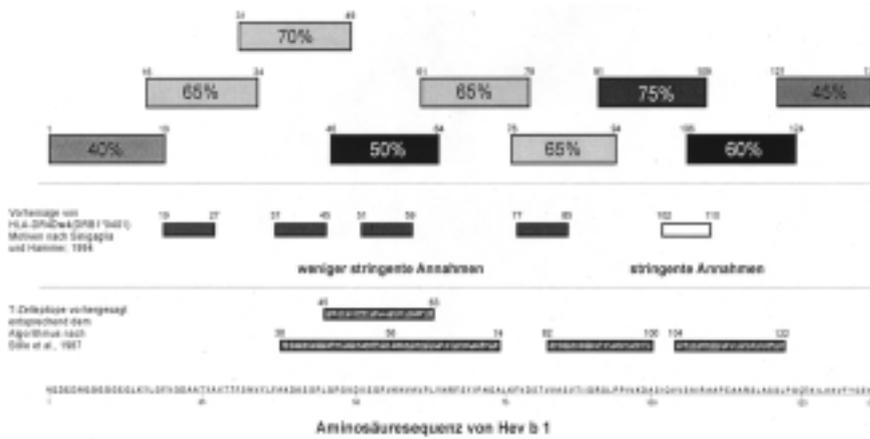


Abb. 3 T-Zellepitope von Hev b 1. Sowohl die aufgrund von experimentell ermittelten Untersuchungsdaten (von 20 Patienten, % der reagierenden Patienten) und die nach dem Algorithmus von Stille et al. [19] vorhergesagten T-Zellepitope sind eingezeichnet. Weiterhin sind die aufgrund der Vorhersage nach Sinigaglia und Hammer [20] ermittelten HLA DRB1*0401-Motive dargestellt.

Regionen 19–27, 77–85, 37–45 und 51–60. Das beste vorhergesagte HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv (102–110) ist Teil der Peptidsequenz, die in 75% der reaktiven PBMC eine positive Proliferationsantwort induzierte, also das Peptid mit der Sequenz 91–109. Während die weiteren vier Bindemotive in Peptiden vorhergesagt wurden, die Proliferationsantworten in 50–70% der PBMC hervorriefen. Mit Hilfe von Bindungsuntersuchungen der Hev b 1-Peptide an das isolierte HLA-DRB1*0401 zeigte sich deutlich, dass das Peptid 91–109 zu den drei Hev b 1-Peptiden gehört (Tab. 2), die sehr gut an HLA-DRB1*0401 binden. Hingegen erwies sich im Bindungs-test das Peptid 1–19 als inaktiv.

Tab. 2 Bindungsstudie mit Hev b 1-Peptiden und HLA-DRB1*0401.

Peptide	IC ₅₀	Bewertung	Proliferations- ergebnis
P 91–109	55 nM	} sehr aktiv (bis 100 nM)	75% ¹
P 16–34	55 nM		65%
P 61–79	50 nM		65%
P 31–49	950 nM	} mittlere Aktivität	70%
P 76–94	1.750 nM		65%
P 121–137	6.500 nM		45%
P 106–124	15.000 nM		60%
P 1–19	≥ 100.000 nM	} inaktiv	40%
P 46–64	≥ 100.000 nM		50%

¹ prozentualer Anteil der Patienten (n = 20), die eine signifikante Proliferationsantwort auf dieses Peptid zeigten

Lymphozytenstimulationstest mit MBP-rHev b 1

Außerdem überprüften wir mit PBMC von weiteren 20 latexsensibilisierten Patienten aus dem Gesundheitswesen parallel die Stimulationswirkung von nativem Hev b 1 und rekombinantem MBP-rHev b 1 (hergestellt entsprechend Rihs et al. [14]). Maltosebindeprotein (MBP), der Trägeranteil des Fusionsproteins MBP-rHev b 1, wurde in gleichen Konzentrationen in allen Experimenten zur Kontrolle eingesetzt (Abb. 4). MBP-rHev b 1 erwies sich im Vergleich zum nativen Hev b 1 in den meisten untersuchten Fällen als besserer Induktor der Proliferationsantwort in den Latexallergiker-PBMC. MBP sti-

mulierte in keinem Fall die PBMC zu einer signifikanten Proliferationsantwort.

Inhibition der antigenspezifischen Proliferation durch anti-HLA-DR/DQ/DP

In einem Kollektiv von zehn latexallergischen Personen des Gesundheitswesens, von denen der HLA-DR/DQ-Typ bekannt war, überprüften wir die Bedeutung von verschiedenen Oberflächenmolekülen, die in der Region HLA-DR/DQ/DP kodiert sind, für die rHev b 1-induzierte Proliferationsantwort. Während genetische Untersuchungen zur Assoziation einer Erkrankung mit einem bestimmten HLA-Typ sich auf statistische Berechnungen stützen lassen, erlaubt der Einsatz der genannten Antikörper im Lymphozytenstimulationstest eine direkte Beeinflussung der Antigenpräsentation und damit der Erkennung von beteiligten Strukturen. Da im Vergleich zum nativen Hev b 1 das rekombinant hergestellte MBP-rHev b 1-Fusionsprotein besser löslich war und sich damit als besserer Induktor der Proliferationsantwort erwies (d.h. die SI-Werte waren in der Regel höher als beim nativen Hev b 1), verwendeten wir für die folgenden Inhibitionsuntersuchungen MBP-rHev b 1 als Stimulus. PBMC von zehn Latexsensibilisierten ließen sich gegenüber MBP-rHev b 1 stimulieren (SI > 2,5). Jeweils zur Kontrolle mitgeführte Inkubationsansätze mit MBP führten in keinem Fall zu einer signifikanten Proliferationsantwort (s. Abb. 4). Abb. 5 zeigt eine signifikante Inhibition der MBP-rHev b 1-induzierten Proliferationsantwort mit anti-HLA-DR in PBMCs von neun der zehn Patienten. Die Inhibitionen liegen zwischen 75 und 49%. Acht dieser Patienten waren hinsichtlich HLA-DR4 positiv. Der Patient, dessen MBP-rHev b 1-induzierte Proliferationsantwort nicht durch anti-HLA-DR inhibierbar war, war HLA-DR4-negativ. Die Inhibition mit anti-HLA-DQ bzw. -DP war in acht bzw. sechs (80% bzw. 60%) Fällen signifikant. Dieses deutet darauf hin, dass für die meisten untersuchten Latexsensibilisierten auch in diesem Bereich kodierende Proteine für die Antigenpräsentation eine Rolle spielen.

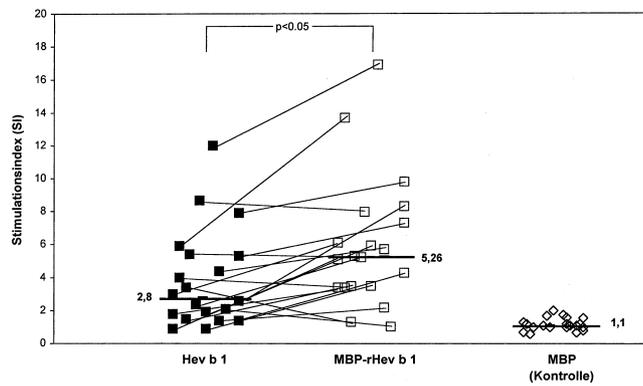


Abb. 4 Proliferationsantworten induziert durch natives (Hev b 1) und rekombinantes (MBP-rHev b 1) Hev b 1. Dargestellt sind die individuellen SI-Werte der PBMC-Stimulationen von 20 latexallergischen Personen aus dem Gesundheitswesen. Ausgetestet wurden für jeden Probanden unterschiedliche Konzentrationen (20–0,5 µg/ml) und der jeweils höchste SI-Wert ist dargestellt. Zur Kontrolle wurde MBP (= Maltosebindeprotein) in vergleichbaren Konzentrationen eingesetzt. Die horizontalen Linien markieren jeweils den Medianwert. Entsprechend dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Stimulation mit Hev b 1 und MBP-rHev b 1.

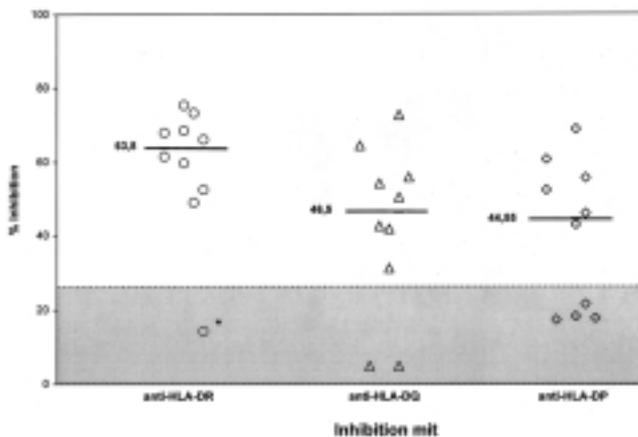


Abb. 5 Inhibition der MBP-rHev b 1-induzierten Proliferationsantwort durch Präinkubation der PBMC von 10 Latexallergikern aus dem Gesundheitswesen mit anti-HLA-DR, anti-HLA-DQ bzw. anti-HLA-DP. Die SI-Werte der Stimulationsansätze ohne anti-HLA-DR, -DP bzw. -DQ wurden als 0% gesetzt und die Standardabweichung – bezogen auf diesen Wert – stellt den Graubereich dar. Die Mediane der prozentualen Inhibition sind als horizontale Linien eingezeichnet (* HLA-DR4 negativer Patient).

Diskussion

Wie unsere Untersuchungen mit dem 14,6 kD Latexallergen Hev b 1 (Rubber Elongation Factor, REF) zeigten, induziert es in 65% der untersuchten Latexallergiker aus dem Gesundheitswesen und in 92% der latexsensibilisierten Patienten mit Spina bifida eine signifikante Lymphozytenproliferation. In fast allen Fällen war die zelluläre Antwort auf Hev b 1 unabhängig von der Serumkonzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen Hev b 1. Hev b 1 ist ein sehr hydrophobes Protein mit einer Länge von 137 Aminosäuren ohne Zystein, Methionin, Histidin und Tryptophan. Der N-Terminus

von Hev b 1 umfasst eine Anhäufung saurer Aminosäuren und ist acetyliert. Die Funktion dieser einzelnen post-translationalen Modifikationen ist unbekannt; eine Schutzfunktion gegenüber Proteolyse wird vermutet [21]. Neben dem nativen Hev b 1 zeigte auch das rekombinant hergestellte Hev b 1 (MBP-rHev b 1), ein Fusionsprotein, bestehend aus einem MBP-Teil und der Aminosäuresequenz von Hev b 1, proliferationsinduzierende Eigenschaften. Dass es sich dabei um einen Hev b 1-spezifischen Effekt handelte, zeigten die mitgeführten MBP-Kontrollen, die in keinem Fall zu einer signifikanten Stimulation führten, während MBP-rHev b 1 stets eine signifikante Reaktivität zeigte. MBP-rHev b 1 erwies sich im Vergleich zum nativen Hev b 1 in den meisten Fällen als besserer Induktor der Proliferationsantwort. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich die bessere Löslichkeit des Fusionsproteins.

Zwei Charakteristika sind für die allergenspezifische T-Zellstimulation entscheidend: Zum einen die Bindung des durch Prozessierung entstehenden Peptids an das sich konstituierende MHC-Molekül intrazellulär in der antigenpräsentierenden Zelle und damit die Stabilisierung des Komplexes unter Verdrängung der invarianten Kette mit der „CLIP-Region“, zum anderen die Präsentation des gebildeten und an der Zelloberfläche befindlichen MHCII-Peptidkomplexes, so dass eine Bindung des MHC-Peptidkomplexes an den T-Zellrezeptor (TCR) auf der T-Zelle möglich wird. Der MHC-Peptidkomplex muss nur eine geringe Affinität zum TCR haben, da durch häufige Kontaktnahme mit unterschiedlichen T-Zellrezeptoren es zu einer stärkeren Aktivierung kommt. Hingegen führt eine starke Bindung des MHC-Peptidkomplexes an T-Zellrezeptoren zu einer niedrigeren Stimulationsfähigkeit.

Die Stimulation von PBMC latexallergischer Patienten sowohl aus dem Gesundheitswesen als auch unter den Patienten mit Spina bifida mit synthetisch überlappenden Peptiden, die die gesamte Sequenz von Hev b 1 erfassen, führte zu einer signifikanten Proliferationsantwort. Im Vergleich zum Gesamtmolekül Hev b 1 induzierten die Peptide eine geringere Stimulationsantwort. Vergleichbare konnte auch für andere T-Zellepitopuntersuchungen nachgewiesen werden [20]. Hinsichtlich einer positiven Peptidproliferationsantwort zeigten unsere Resultate, dass mindestens ein, in der Regel aber mehrere Peptide eine Proliferationsantwort induzierten. Weiterhin ergab die T-Zellepitopanalyse des Hev b 1, dass die Peptidreaktivitätsmuster individuell sehr unterschiedlich sind, aber alle neun Peptide in mindestens einem Individuum stimulatorisch wirkten. Die PBMC eines jeden Probanden reagierten zwar auf bestimmte Peptide, aber je nach Individuum kann es sich dabei um unterschiedliche Sequenzen handeln. Es kann also von einer potenziellen Immunogenität ausgegangen werden, die dann je nach Patient u.a. in Abhängigkeit vom HLA-Typ und der Expositionsintensität, wirksam wird oder nicht. Die Länge von 19 Aminosäuren, wie sie für die synthetischen Peptide zur Ermittlung von MHC-Klasse II-Epitopen gewählt wurde, ist somit ausreichend, um eine Reaktion bei mindestens 40% der Patienten hervorzurufen. Dies zeigt, dass multiple T-Zellepitope in jeder Region von Hev b 1 vorhanden sind und die Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen exponierter Individuen (Allergiker und Nicht-Allergiker) besitzen [15,16].

Die Möglichkeit, dass multiple T-zellreaktive Regionen in einem Allergen wie Hev b 1 vorhanden sind, konnte auch für andere Allergene wie Der p 1 [23], Chi t 1.01 [24], Bet v 1 [25] und für die Phospholipase A₂ [26] beschrieben werden. Obwohl das gesamte Hev b 1-Molekül als immunogen zu bezeichnen ist, zeigten unsere Untersuchungen, dass die Intensität der Zellantwort, induziert durch unterschiedliche Peptide, durchaus unterschiedlich sein kann, so dass hinsichtlich der Peptidstimulation Immundominanzen zu verzeichnen sind. Auf einzelne Peptide wie 31–49 und 91–109 reagierte die Mehrzahl der Patientenzellen (etwa 75%), während andere Peptide nur vereinzelt Proliferationsantworten induzierten (Peptid 1–19 nur in 40% der Fälle). Das Phänomen der Immundominanz ist in der Kartierung von T-Zellepitopen bekannt; während sich für B-Zellepitope IgE-bindende Epitope durchaus von nicht-bindenden abgrenzen lassen, findet man bei den Lymphozytenantworten im allgemeinen nur graduelle Unterschiede zwischen stärkerer und schwächerer Immunogenität. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im Gegensatz zur B-Zellepitopkartierung, bei der T-Zellepitopbestimmung sowohl die MHC-Klasse II-Peptidbindung als auch die Bindung dieses Komplexes wiederum mit dem T-Zellrezeptor zum Tragen kommt.

Die Anwendung von T-Zellepitopvorhersagen nach den Algorithmen von Stille et al. [19] auf das Hev b 1 erlaubte den Vergleich von experimentell ermittelten Daten mit den vorhergesagten Hev b 1-Epitopen. Dieser Algorithmus, der auf der Vorhersage eines „Strip-Off-Helix-Hydrophobicity“ beruht, stellt laut Deavin et al. [27] die einzige signifikante Vorhersage bezogen auf einen Humandatensatz dar. Unsere Anwendung des „Stille-Algorithmus“ auf das Hev b 1-Molekül führte zur Vorhersage von T-Zellepitopen, die auch Teile der Sequenzen darstellen, die eine signifikante Proliferationsantwort in der Mehrzahl der getesteten Individuen hervorriefen. Damit unterstützt unser Vergleich zwischen vorhergesagten und experimentell ermittelten T-Zellepitopen im Hev b 1-Molekül die Arbeitshypothese von Deavin et al. [27], die besagt, dass der Algorithmus nach Stille besser als „zufällig“ sei.

Neben der Erkenntnis, welche Aminosäuren an der T-Zellepitopbindung beteiligt sind, erhebt sich auch die Frage, welche Peptide im Rahmen der Antigenprozessierung *in vivo* tatsächlich entstehen und präsentiert werden. Unsere Untersuchungen geben darüber keinen direkten Aufschluss. Der Einsatz von Peptiden in unseren *In-vitro*-Experimenten überspringt gewissermaßen den Schritt der Prozessierung und ermöglicht sogleich die Präsentation, schließt aber natürlich auch einen weiteren enzymatischen Abbau nicht aus. Alle Peptide, die eine Lymphozytenantwort induzieren, sind korrekterweise daher zunächst als potenzielle T-Zellepitope zu bezeichnen.

Fortschritte in der Erforschung der Antigenpräsentation führten zu der generellen Meinung, dass T-Zellepitop-Vorhersagen auf dem molekularen Verständnis der Ereignisse basieren sollten, die die T-Zellpräsentation bestimmen, d.h. der Antigenprozessierung und der MHC-Bindung [28]. Diese Kenntnisse sind wertvoll für eine präzisere Vorhersage von T-Zellepitopen. Sowohl Pool-Sequenzierung als auch das „Screening“ von Phagenbibliotheken wurden verwendet, um verschiedene allelspezifische MHC-Klasse II-bindende Motive zu identifizieren. Ein typischer MHC-Klasse II-Ligand besteht aus

12–25 Aminosäuren mit einer in etwa der Mitte der Furche platzierten gestreckten Ausrichtung [29]. Röntgenkristallographische Daten des HLA-DR1 [30,31] und detaillierte Studien von Hammer [31,32] und Sinigaglia [20] konnten zeigen, dass insbesondere im HLA-Liganden die relativen Positionen P1, P4, P6 und P9 als Ankerpositionen für HLA-DR1- und HLA-DR4Dw4-Motive von Bedeutung sind. Wir bestimmten mit Hilfe des Algorithmus nach Rammensee [29] das HLADR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv im Hev b 1-Molekül. Unter Verwendung stringenter Bedingungen für die Aminosäurezusammensetzung der vier Ankerpositionen konnte nur in der Region 102–110 ein HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv vorhergesagt werden (die Region 102–110 wurde für die experimentellen Untersuchungen durch das Peptid 91–109 erfasst). Entsprechend unseren experimentellen Daten, die dokumentieren, dass das Peptid 91–109 von 75% der Patientenzellen als guter Induktor einer Lymphozytenproliferation wirkte, zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen dem vorhergesagten HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv und den experimentell ermittelten potenziellen T-Zellepitop. Einen weiteren Hinweis darauf, dass das Peptid 91–109 mit der Region 102–110 eine wichtige Bedeutung für die T-Zellstimulation hat, lieferten die Bindungsstudien der Hev b 1-Peptide an das isolierte HLA-DRB1*0401. Hier zeigte sich ebenfalls, dass das Peptid 91–109 zu den drei Hev b 1-Peptiden gehört, die sehr gut an HLA-DRB1*0401 binden konnten.

HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotive, die unter weniger stringenter Kriterien bestimmt wurden, fanden sich auch in weiteren Regionen des Hev b 1-Moleküls; Peptide mit entsprechender Aminosäurezusammensetzung induzierten in PBMC von 60% der getesteten Personen eine verstärkte Proliferationsantwort. Demgegenüber induzierte das Peptid 1–19 nur in 40% der untersuchten Patienten-PBMC eine signifikante Proliferationsantwort, beinhaltete kein vorhergesagtes HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv und erwies sich im Bindungstest an HLA-DRB1*0401 als inaktiv. Die Inhibitionsexperimente mit anti-HLA-DR, -DQ und -DP untermauern einerseits die Bedeutung von HLA-DR für die Hev b 1-induzierte Proliferationsantwort (insbesondere dadurch, dass der Patient, dessen MBP-rHev b 1-induzierte Proliferationsantwort sich nicht durch anti-HLA-DR inhibieren ließen, HLA-DR4 negativ war), zeigten andererseits aber auch, dass für die Proliferationsantwort der meisten untersuchten Latexallergiker auch HLA-DP und HLA-DQ von Bedeutung sind.

Trotz der guten Übereinstimmung von vorhergesagten HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiven, HLA-DRB1*0401-Bindungsuntersuchungen und den im Proliferationsstest ermittelten potenziellen T-Zellepitopen stellen diese Faktoren nur eine notwendige Voraussetzung für eine positive T-Zellstimulation dar. Andere beeinflussende Parameter sind z.B. die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zellrezeptor und die Beteiligung von kostimulatorischen Signalen.

Wie die Untersuchungen von Rihs et al. [33,34] zur HLA-D-Assoziation mit spezifischen Latexallergenen zeigen konnten, existiert keine signifikante Assoziation zwischen der Hev b 1-spezifischen IgE-Antwort und den MHC-II-Allelen der HLA-Gene DRB1, 3, 4, 5 und DQB1 [34]. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Hev b 6.02-spezifischen IgE-Antwort und den HLA-Klasse II-Antigenen DR4 und

DQ8, die sich untereinander in einem Kopplungsungleichgewicht befinden, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass Hev b 1 ebenso wie das rekombinant hergestellte MBP-rHev b 1 unabhängig von der serologisch messbaren spezifischen IgE-Konzentration sowohl unter Latexallergikern aus dem Gesundheitswesen als auch unter Spina bifida-Patienten eine signifikante Proliferationsantwort induzieren können. Im Rahmen eines „T-Zellepitop-Mapping“ konnten innerhalb des Hev b 1-Moleküls Regionen definiert werden, die in der Lage waren, in der Mehrzahl der untersuchten PBMC Proliferationsantworten zu induzieren. Darüber hinaus beinhaltet das Hev b 1-Molekül ein unter stringenteren Bedingungen vorhergesagtes HLA-DR4Dw4(DRB1*0401)-Bindemotiv (Region 102–110), welches sich in der Region befindet, die auch von der Mehrzahl der PBMC als potenzielles T-Zellepitop erkannt wurde (91–109). Auch Bindungsstudien an HLA-DRB1*0401 bestätigten die Bedeutung dieser Sequenz für die MHC-Bindung. Die Fähigkeit, immundominante und möglicherweise krankheitsbezogene T-zellreaktive Regionen in Allergenen nachzuweisen, kann für Planung und Design einer zukünftigen Immuntherapie (z. B. MHC-Klasse II-basierte T-zell-desensibilisierende Vakzine) von praktischem Nutzen sein.

Danksagung

Die Arbeit wurde unterstützt durch den HVBG.

Literatur

- ¹ Breiteneder H, Scheiner O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116: 83–92
- ² Posch A, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Latex allergens. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 134–140
- ³ Niggemann B, Dietke B, Michael T, Wahn U. Latex provocation tests in patients with spina bifida: Who is at risk of becoming symptomatic? *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 665–670
- ⁴ Yassin MS, Lierl MB, Fischer TJ, O'Brien K, Cross J, Steinmetz C. Latex allergy in hospital employees. *Ann Allergy* 1994; 72: 245–249
- ⁵ Cremer R, Hoppe A, Korsch E, Kleine-Diepenbruck U, Bläker F. Natural rubber latex allergy: prevalence and risk factors in patients with spina bifida compared with atopic children and controls. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 13–16
- ⁶ Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 690–697
- ⁷ Chen Z, Cremer R, Posch A, Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Baur X. On the allergenicity of Hev b 1 among health care workers and patients with spina bifida allergic to natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 684–693
- ⁸ Chen Z, van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Allergenic and antigenic peptide determinants of latex allergen Hev b 1: peptide mapping of epitopes recognized by human, murine and rabbit antibodies. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 406–415
- ⁹ Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Fink J. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102: 61–66
- ¹⁰ Alenius H, Kalkkinen N, Yip E, Hasmin H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. Significance of rubber elongation factor as a latex allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 362–368
- ¹¹ Scheiner O, Wagner B, Wagner S, Krebitz M, Cramer R, Niggemann B, Yeang HY, Ebner C, Breiteneder H. Cloning and molecular characterization of Hev b 3, a spina-bifida-associated allergen from *Hevea brasiliensis* latex. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 311–312
- ¹² Attanyaka DP, Kekwick RG, Franklin FC. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 1991; 16: 1079–1081
- ¹³ Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardoso MJ. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 628–639
- ¹⁴ Rihs HP, Chen Z, Schuhmacher S, Rozynek P, Cremer R, Lundberg M, Raulf-Heimsoth M, Petersen A, Baur X. Recombinant Hev b 1: Large-scale production and immunological characterization. *Clin Exp Allergy*, 2000. in press
- ¹⁵ Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Liebers V, Allmers H, Baur X. Lymphocyte proliferation response to extracts from different latex materials and to the purified latex allergen Hev b 1 (rubber elongation factor). *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 640–651
- ¹⁶ Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Rihs HP, Kalbacher H, Liebers V, Baur X. Analysis of T-cell reactive regions and HLA-DR4 binding motifs on the latex allergen Hev b 1 (rubber elongation factor). *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 339–348
- ¹⁷ Menendez-Arias L, Rodríguez R. A basic microcomputer program for prediction of B and T-cell epitopes in proteins. *Cabios* 1990; 6: 101–105
- ¹⁸ Texier C, Hervé M, Pouvelle S, Ménez A, Maillère B. On the diversity and heterogeneity of H-2^d-restricted determinants and T cell epitopes from the major bee venom allergen. *International Immunology* 1999; 11: 1313–1325
- ¹⁹ Stille CJ, Thomas LJ, Reyes VE, Humphreys RE. Hydrophobic strip-of-helix algorithm for selection of T cell-presented peptides. *Cell Immunol* 1987; 24: 1021–1027
- ²⁰ Sinigaglia F, Hammer J. Defining rules for the peptide-MHC class II interaction. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 52–56
- ²¹ Dennis MS, Henzel WJ, Bell J, Kohr W, Light DR. Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea* latex. *J Biol Chem* 1989; 264: 18618–18626
- ²² O'Brien RM, Thomas WR, Tait BD. An immunogenetic analysis of T-cell reactive regions on the major allergen from the house dust mite, *Der p I* with recombinant truncated fragments. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 628–634
- ²³ van Neerven JR, van t'Hof W, Ringrose JH, Jansen HM, Aalberse RC, Wierenga EA, Kaspenberg ML. T-cell epitopes of house dust mite major allergen *Der p II*. *J Immunol* 1993; 151: 2326–2335
- ²⁴ Liebers V, Raulf M, Mazur G, Modrow S, Baur X. Epitope mapping with peptides of Chi t I component III and immunomodulation of the Chi t I immune response. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 334–339
- ²⁵ Ebner C, Szépfalusi 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: 1047–1054
- ²⁶ Dhillon M, Roberts C, Nunn T, Kuo M. Mapping human T-cell epitopes on phospholipase A2: the major bee-venom allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 42–51

- ²⁷ Deavin AJ, Auton TR, Greaney PJ. Statistical comparison of established T-celle epitope predictors against a large database of human and murine antigens. *Mol Immunol* 1996; 33: 145 – 155
- ²⁸ Hammer J. New methods to predict MHC-binding sequences within protein antigens. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 263 – 269
- ²⁹ Rammensee HG. Antigen presentation-recent developments. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 299 – 307
- ³⁰ Brown J, Jardetzky T, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33 – 39
- ³¹ Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J Exp Med* 1992; 176: 1007 – 1013
- ³² Hammer J, Valsasnini P, Tolba K, Bolin D, Higelin J, Takaes B, Sinigaglia F. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 1993; 74: 197 – 203
- ³³ Rihs HP, Chen Z, Cremer R, Baur X. HLA class II antigens DR4 and DQ8 are associated with allergy to hevein, a major allergen of *Hevea latex*. *Tissue Antigens* 1997; 49: 92 – 95
- ³⁴ Rihs HP, Cremer R, Chen Z, Baur X. Molecular analysis of DRB and DQB1 alleles in German spina bifida patients with and without IgE responsiveness to the latex major allergen Hev b 1. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 175 – 180

Dr. rer. nat. Raulf-Heimsoth, Monika

Bereich Allergieforschung
Berufsgenossenschaftliches Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin (BGFA), Institut an der Ruhr-Universität Bochum
Bürkle-de-la-Camp-Platz 1
44789 Bochum
E-mail: raulf@bgfa.ruhr-uni-bochum.de

ERRATUM

X. Baur, W. D. Schneider: Februar 2000; 54: 80 – 91: „Nicht-allergische obstruktive Atemwegserkrankungen in der Landwirtschaft“.

In den Tabellen 3c und 3e muss es in den Überschriften der jeweils drei letzten Säulen in der Klammer heißen: EU/m³ (anstelle von mg/m³).

In Tabelle 5, in der Überschrift der letzten beiden Spalten, muss es heißen: Δ FEV₁/(ml) (anstelle P).