

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ

Departamentul III – Științe funcționale

GRIJINCU, MANUELA



TEZĂ DE DOCTORAT

**CARACTERIZAREA IMUNOPROTEOMICĂ A ENOLAZEI ȘI NSLTP
DIN POLENUL DE AMBROZIA RECOMBinate ȘI RELEVANȚA
CLINICĂ A ACESTORA**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR, PANAITESCU, CARMEN

Timișoara

2024

REZUMAT

Bolile alergice sunt probleme de sănătate cu prevalență în creștere la nivel mondial, în special în țările cu stil de viață occidental. Aceste boli sunt caracterizate printr-un răspuns imun exagerat la stimuli inofensivi din mediu, cel mai adesea la proteine. În vestul și sudul României, polenul de ambrozia a devenit o problemă majoră de sănătate datorită răspândirii rapide a plantei, a încărcăturii polinice mari și a alergenității crescute a polenului. Obiectivele acestui studiu au fost să evalueze rolul a două alergene minore din polenul de ambrozia în alergia la polenul ambroziei, enolaza recent descoperită, Amb a 12 și proteina de transfer lipid nespecific, Amb a 6. Caracterizarea a necesitat producerea de molecule alergene pure, cuantificabile. Aceste proteine au fost apoi evaluate în ceea ce privește proprietățile lor fizico-chimice, adică determinarea masei moleculare prin spectrometrie de masă, cuantificarea conținutului structurii secundare, formarea agregatelor. În plus, a fost evaluată frecvența de legare de IgE, precum și alergenitatea la 150 de pacienți alergici la polen de ambrozie. Anticorpi specifici alergenelor au fost generați prin imunizarea de iepure pentru a cuantifica alergenele din extractul de polen de ambrozia. Anticorpii au fost utilizați, de asemenea, pentru a verifica prezența unor proteine similare în diverse surse de alergene inhalatorii și alimentare, care ar putea induce răspunsuri IgE încrucișate. În cazul alergenelor cu relevanță clinică crescută, peptide care acoperă secvența alergenei au fost construite pentru a identifica epitopi comuni între alergenele aparținând aceleiași familii. Aceste peptide au fost folosite și pentru cartarea epitopilor IgE și ca bază pentru dezvoltarea ulterioară a unor imunoterapiilor alergen-specifice.

Partea generală

Răspunsul imun este împărțit în trei răspunsuri celulare care acționează împotriva diferiților agenți patogeni, răspunsurile de tip I sunt direcționate împotriva agenților patogeni intracelulari, răspunsurile de tip II împotriva paraziților și răspunsurile de tip III împotriva agenților patogeni extracelulari. Limfocitele T și diferențierea acestora sunt principalii factori care reglează acest răspuns imun. Defecțiuni ale acestor răspunsuri celulare conduc la dezvoltarea bolilor alergice și autoimune. Distincția dintre diferitele fenotipuri ale acestor tulburări a condus la definirea a nouă tipuri de răspunsuri de hipersensibilitate. Pe baza

principalelor mecanisme care răspund la antigen, hipersensibilitățile de tip I-III sunt definite ca răspunsuri pe bază de anticorpi, tipurile IV_{a-c} sunt definite drept răspunsurile celulare, tipul V și VI sunt răspunsuri tisulare la antigene, în timp ce tipul VII rezultă din contactul direct cu antigenul. Mecanismele implicate în diferitele tipuri de hipersensibilitate induc manifestărilor bolilor alergice. Cu toate acestea, reacția imună crescută față de proteine inofensive din mediu este adesea rezultatul interacțiunii dintre răspunsul de hipersensibilitate de tip II mediat de anticorpii de imunoglobulină E (IgE) și răspunsul de tip IV_b prin diferențierea limfocitelor T în de celulele T helper de tip 2 (Th2). Răspunsul alergic este împărțit în două faze, faza de sensibilizare și faza efectoare. În faza de sensibilizare antigenul este preluat de celulele prezentatoare de antigen (APC) și prezentat celulelor T. Sub stimulare cu citokine de tip 2, adică IL-4, limfocitele T se diferențiază în celule T helper de tip 2. Acestea la rândul lor prezintă antigenul celulelor B și, sub stimularea cu IL-4 și IL-13, induc o schimbare de clasă a celulelor B. Această schimbare de clasă induce diferențierea celulelor B în plasmocite producătoare de anticorpi IgE. Anticorpii IgE se pot lega de receptorul de mare afinitate pentru IgE (FcεRI) de pe suprafața celulelor efectoare – bazofile și mastocite – rezultând în sensibilizarea lor față de antigen. A doua fază a răspunsului alergic este faza efectoare. În această fază, antigenul este acum recunoscut de către celulele efectoare ca un alergen. Odată ce alergenul se este recunoscut de IgE de pe suprafața bazofilelor și a mastocitelor, acesta declanșează cross-linking-ul FcεRI și eliberarea de mediatori inflamatori care induc simptomele asociate cu boala alergică. Receptorul de IgE cu afinitate scăzută (CD23) joacă un rol important în reglarea răspunsului alergic, în special în alergiile alimentare, prin prezența sa la suprafața celulelor epiteliale intestinale. Receptorul poate transporta complexe formate din anticorpi IgE și alergene prin bariera epitelială, unde se poate lega de bazofile și mastocite sensibilizate care declanșează un răspuns inflamator.

Bolile alergice sunt adesea un răspuns la proteinele din mediu, spre exemplu acarieni de praful de casă, polenuri și veninurile de insecte. Manifestările clinice ale alergiei includ dermatita atopică, eczemă, rino-conjunctivită alergică și astm alergic, dar și anafilaxia ca răspuns la anumite alergene alimentare sau veninuri de insecte. Adesea, un istoric familial de alergii duce la dezvoltarea acestor afecțiuni la copii, mai ales dacă mama are boala. Acest efect familial a condus la concluzia că bolile alergice sunt o interacțiune între factorii genetici și cei de mediu. Contribuitori importanți în dezvoltarea bolilor alergice includ disfuncții ale barierei epiteliale, diferențierea celulelor T spre celulele Th2 și producerea de anticorpi IgE. Factorii genetici care predispun la boli alergice includ polimorfismul unui singur nucleotid în gene care codifică proteinele implicate în funcția de barieră a epiteliului sau moleculele cu rol în

prezentarea de antigen, spre exemplu mutații care induc o pierdere a funcției filagrinei. S-a constatat că mutația menționată anterior predispune la dezvoltarea dermatitei atopice. În plus, anumite alele ale moleculelor prezentatoare de antigen din complexul major de histocompatibilitate de clasa a II-a au fost predispuse la prezentarea anumitor molecule alergice, favorizând sensibilizarea față de alergen. Factorii de mediu au fost, de asemenea, asociați cu boli alergice, fie prin influențarea directă a componentelor cheie, inducerea producerii de citokine inflamatorii de tip 2, fie prin distrugerea barierei epiteliale. Indirect, factorii de mediu pot induce modificări epigenetice care reglează expresia genelor implicate în bariera epitelială și diferențierea celulelor T. Aceste modificări epigenetice sunt compuse din metilări ale ADN-ului, metilare, acetilare sau ubiquitinare a proteinelor histonice sau microARN (miARN) care fie cresc sau scad expresia genelor implicate în diferențierea celulelor T prin apariția lor în regiunile promotore. În plus, s-a descoperit că acestea cresc activarea celulelor implicate în răspunsul imun alergen, de exemplu eozinofile și celule natural killer. Aceste metilări de ADN au fost asociate cu dezvoltarea astmului. S-a constatat, de asemenea, că mediul matern contribuie la dezvoltarea bolilor alergice la copii. Astmul necontrolat și fumatul au fost identificați ca factori care predispun la dezvoltarea astmului. Bolile alergice materne ar crea apoi micromediul imunologic, stimulând răspunsul imun al fătului. Un factor important de mediu aici a fost alergia maternă, în special IgE-ul matern. S-a constatat că acești anticorpi sunt transferați la făt prin intermediul cordonului ombilical, traversând bariera placentară. Pe mastocitele fetale, receptorul fetal de IgE cu afinitate scăzută este capabil să lege IgE, sau complexe formate din IgE și alergen, inducând astfel sensibilizare la alergen, similar cu sensibilizarea în alergiile alimentare. Factorii protectori în dezvoltarea bolilor alergice s-au dovedit a fi infecții microbiene sub-patogene care ar putea induce diferențierea celulelor T spre celule T helper de tip 1 (Th1). În mod similar, imunizarea prenatală cu imunoterapie alergenică a fost considerată a avea un rol protector împotriva dezvoltării alergiilor. În plus, s-a constatat că nutriția maternă poate avea un efect protector, incluzând un consumul de fructe și legume proaspete și iaurt, precum și suplimentarea cu vitamina D și acizi grași omega-3 în timpul sarcinii.

Bolile alergice prezintă o progresie de la simptome cutanate, cum ar fi dermatita atopică sau eczema în copilărie, spre simptome respiratorii, cum ar fi rinita alergică sau astmul în adolescență. Acestea sunt însoțite de sensibilizarea IgE față de alergene alimentare în copilărie și alergene respiratorii la adolescență și la vârsta adultă. Această progresie este cunoscută ca marș atopic. Cu toate acestea, au fost identificate șapte traiectorii diferite luând în considerare debutul, severitatea, persistența și co-apariției simptomelor cutanate și

respiratorii și a sensibilizării IgE. Se consideră că sensibilizările apar în ordinea întâlnirii cu alergenii. Prin urmare, în copilărie, sensibilizarea apar ca răspuns la proteine din oul de găină și laptele de vacă. Sensibilizările alimentare încep să scadă în la vârsta școlarizării, fiind înlocuite cu sensibilizări la alergeni respiratorii. Sensibilizarea la acarienii din praful este printre primele sensibilizări respiratorii care apar în copilărie. La vârsta școlarizării încep să apară sensibilizările la polen, care duc la simptome de rinită alergică și astm bronșic în adolescență. Sensibilizările multiple sunt adesea asociate cu simptome mai severe sau mai persistente. Sensibilizarea timpurie la anumite molecule de risc, precum Fel d 1 din scuame de pisică sau Phl p 4 din polenul de timofică, acționează ca indicatori ai alergiei respiratorii în adolescență.

Alergia la polenul ambroziei a devenit o problemă de sănătate din ce în ce mai mare în arealul de răspândire a acestei plante. Utilizarea redusă a suprafețelor agricole, pe lângă schimbările climatice și urbanizarea, au contribuit la o mai mare dispersie și o disponibilitate mai mare de habitate pentru această specie invazivă. În plus, creșterea temperaturilor și poluarea contribuie la o producție mai mare de polen cu alergenitate crescută. Diferite scenarii de schimbări climatice prevăd extinderea speciei mai la nord și spre altitudini mai mari, rezultând într-o expunere prelungită la acest polen, creșterea sensibilizării IgE și simptome mai persistente și severe în rândul pacienților deja sensibilizați. În plus, s-a descoperit că poluarea acționează ca un depozit și purtător de alergeni. Un nivel crescut de NO₂ poate induce și expresia crescută a unor alergeni. În polenul de ambrozie, au fost identificați până în prezent unsprezece alergeni. Amb a 1 și Amb a 11 sunt considerate alergeni majore prin rata lor de legare a IgE. Printre alergenii minor, polcalcinele Amb a 9 și Amb a 10, profilina Amb a 8 și proteina de transfer lipid nespecific Amb a 6 sunt considerate pan-alergeni, datorită prevalenței lor în multiple țesuturi și specii de plante. Prin urmare, aceste proteine prezintă grade diferite de reactivitate încrucișată, în special cu omologii din polenul de artemisia. Deși studiile anterioare au considerat că Amb a 1 ar fi suficient pentru diagnosticul și tratamentul precis al alergiei la polenul ambrozie, descoperirile recente evidențiază că până la 10% dintre pacienții alergici la ambrozia nu prezintă IgE specific față de acest alergen. Pacienții alergici la ambrozia prezintă diferite pattern-uri de sensibilizare IgE, în care un număr mai mare de simptome sau simptome mai severe (astm bronșic) sunt asociate cu sensibilizarea la Amb a 1 împreună cu alte alergeni. Investigarea profilurilor de sensibilizare IgE în alergia la polenul de ambrozia prin intermediul diagnosticului molecular ar oferi mai multe informații asupra rolului alergenilor individuale. Diagnosticul molecular ar oferi posibilitatea de a identifica sensibilizarea la posibilele molecule de risc în bolile alergice, care ar putea anticipa progresia

bolii. Testarea reactivității IgE față de componente individuale ar putea facilita distincția între sensibilizare genuină și cea datorată reactivității încrucișate indusă de pan-alergene. Un alt beneficiu include posibilitatea unui tratament personalizat al alergiei pe baza profilurilor de sensibilizare, a indicațiilor de prescriere a imunoterapiei alergice și a monitorizării producției de anticorpi protectori în urma administrării imunoterapiei alergice.

Expunerea plantei la niveluri crescute de NO₂ a indus la expresia crescută a unui nou alergen cu identitate de secvență mare cu enolaza din arborele de cauciuc, Hev b 9. Enolaza este o enzimă implicată în glicoliză, indicând importanța conservării secvenței acesteia pentru a-și menține funcția. Identitatea de secvență între diferite enolaze alergene a fost relativ mare, 60% între enolaze de plante, animale și enolaze fungice. S-a constatat că domeniul enolazei este conservat între Amb a 12 și omologii din arborele de cauciuc, tonul galben și gândacul de bucătărie. Aceste identități s-au reflectat în filogenie, enolazele vegetale și animale formând o cladă separată de enolazele fungice. Astfel, enolazele au fost găsite ca alergene cu reactivitate încrucișată crescută în alergiile la mușegai, cu Alt a 6 din *Alternaria alternata* și Asp f 22 din *Aspergillus fumigatus* ca alergene importante. Enolaze alergice au fost găsite și în ton Thu a 2, în gândacul de bucătărie Per a și în arborele de cauciuc, Hev b 9. Rata de sensibilizare IgE la enolaze a fost scăzută în aceste surse de alergene fiind între 14% și 30%. Au fost detectate rate mai mari de sensibilizare în anumite grupuri de pacienți, spre exemplu 30% sensibilizare IgE la Pen c 2 în rândul pacienților astmatici. În plus, anticorpii împotriva enolazelor au fost implicați în dezvoltarea bolilor autoimune.

Proteina de transfer lipid nespecific (nsLTP), Amb a 6 este o proteină implicată în apărarea plantei de patogeni. Această familie de proteine a fost implicată în inducerea de simptome severe în regiunea mediteraneană, în mare parte prin sensibilizarea la Pru p 3 din piersică. Structura proteinei este stabilizată prin punți disulfurice, conferind rezistență la tratament termic și digestie enzimatică. Această stabilitate structurală a fost considerată responsabilă pentru inducerea simptomelor severe în această familie de proteine. nsLTP se găsesc în majoritatea țesuturilor plantelor și sunt considerate responsabile pentru inducerea reacțiilor încrucișate de IgE, în special în rândul diferitelor specii de Rosaceae. Aceste proteine sunt alergene majore atât în alergiile alimentare, cât și în cele respiratorii, Pru p 3 din piersică și Par j 1, Par j 2 în polenul de paracherniță (*Parietaria judaica*). În aceste surse, sensibilizarea a fost asociată cu inducerea de simptome severe, de la anafilaxie la astm. De asemenea, Tri a 14 din făina de grâu a fost asociată cu dezvoltarea unei alergii profesionale, astmul brutarului. Severitatea reacției față de nsLTP poate fi influențată de anumiți cofactori, cum ar fi medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene sau exercițiile fizice. Identitatea de secvență

Între diferitele nsLTP este sub nivelul așteptat pentru a induce reacții IgE încrucișate, între 30% și 50%. Identitatea de secvență este mai mare în rândul speciilor de plante strâns înrudite, precum piersică, măr, cireașă și alună. Într-un studiu de cohortă din Italia, rata de sensibilizare față de nsLTP a fost de aproximativ 28% în rândul pacienților cu alergie alimentară sau respiratorie. nsLTP din piersică a fost cel mai frecvent alergen sensibilizant în alergiile alimentare și Par j 2 la pacienții cu astm alergic. În timp ce Amb a 6, nsLTP din *Helianthus annuus* și paracherniță formează o cladă, Art v 3 din artemisia nu se formează un grup cu celelalte nsLTP de polenul de buruieni. Foarte puține regiuni din secvența proteinelor apar conservate între diferitele nsLTP-uri alergene, reziduurile de cisteină prezentând un grad ridicat de conservare. Atât Amb a 6, cât și Amb a 12 au fost descriși ca alergene din polenul de ambrozia, însă o caracterizare aprofundată a acestor alergene, precum și asocierea sensibilizării față de aceste alergene cu caracteristicile clinice lipsesc.

Răspândirea ambroziei, creșterea alergenității polenului și importanța diagnosticului molecular în diagnosticul și tratamentul personalizat al pacienților alergici evidențiază importanța investigației rolului pe care îl joacă enolaza și nsLTP din ambrozia în alergia la polenul de ambrozia

Parte specială

Caracterizarea fizico-chimică a alergenelor recombinante

O condiție pentru investigarea relevanței alergenelor individuale într-o sursă aerlgenică este disponibilitatea de alergene pure, cuantificabile. Acest lucru poate fi realizat prin producția de alergene recombinat. Prin urmare, enolaza și nsLTP din polenul de ambrozia recombinate au fost produse în diferite sisteme de expresie proteică. Constructul genic pentru ambele proteine a inclus o șase histine la capătul N-terminal pentru a facilita purificarea și identificarea acestora. Amb a 12 a fost produs în celule procariote de *Escherichia coli* (eAmb a 12), precum și în celule eucariote de insecte *Spodoptera frugiperda* Sf9 (iAmb a 12). Amb a 6 a fost produs cu succes într-un sistem de expresie eucariot (drojdii), iar numărul mare de cisteine în secvența proteinei a indicat adecvarea sistemul de expresia eucariot, adică celulele Sf9 (rAmb a 6). Experimete de expresie la scară mică au fost efectuate pentru a determina condițiile optime de producere a proteinelor, eAmb a 12 după expresie peste noapte, iar iAmb a 12 și rAmb a 6 au fost obținute după incubare timp de 96 de ore cu stocul baculoviral. Proteinele au fost izolate și purificate utilizând cromatografia de afinitate. Greutatea moleculară a proteinelor, puritatea lor și formarea de oligomeri au fost verificate pe SDS-PAGE. Ambele proteine au format dimeri pe SDS-PAGE atunci când au fost separate în condiții nereducătoare. Amb a 12

a migrat aproape de 55 kDa și Amb a 6 în jur de 15 kDa în condiții reducătoare. Structurile identificate drept dimeri prin imunoblotting pentru detectarea histinelor N-terminale au migrat aproape de 130 kDa pentru Amb a 12 și aproape de 28 kDa pentru rAmb a 6. Legarea de IgE a proteinelor produse a fost testată prin imunoblot cu ser de la pacienți reactivi. Forma monomerică a eAmb a 12 și iAmb a 12 au indus legarea IgE pe imunoblot în urma migrării în condiții reducătoare. rAmb a 6 a indus o legare mai puternică a IgE prin separarea în condiții nereducătoare, indicând astfel existența epitopilor conformaționali. Masa moleculară a proteinelor a fost determinată prin spectrometri de masă. Astfel, eAmb a 12 avea 48.8 kDa, iAmb a 12 avea 48,9 kDa iar rAmb a 6 avea 10,9 kDa. Aceste mase corespund masei determinată pe baza secvenței de aminoacizi. Filtrarea pe gel a confirmat formarea de dimeri pentru iAmb a 12 și rAmb a 6. În ceea ce privește conținutul de structuri secundare, proteinele au fost alcătuite în mare parte din structuri alfa-helix, adică 32% pentru iAmb a 12 și 54% pentru rAmb a 6. eAmb a 12. a avut o proporție mai mare de foi beta, care nu a fost în concordanță cu structura enolazei de referință sau a modelului 3D generat pe baza secvenței de aminoacizi. Activitatea enzimatică a fost crescută pentru enolaza de referință, urmată de iAmb a 12, iar cea mai scăzută activitatea enzimatică a fost obținută cu eAmb a 12. Formarea dimerilor a fost identificată ca un factor important în activitatea enzimatică a enolazelor, contribuind rezultatele activității enzimactice obținute cu iAmb a 12.

Frecvența de legare a IgE și posibilele surse de alergen cu reactivitate încrucișată

Legarea de IgE a fost determinată prin metoda ELISA (pentru enolaze) și ImmunoCAP (nsLTP) în rândul a 150 de pacienți alergici la polenul de ambrozia. Frecvența de legare IgE în rândul a 150 de pacienți alergici la polen de ambrozia a fost de 15% pentru eAmb a 12 și 19% pentru iAmb a 12, în timp ce rAmb a 6 a lega IgE la 30% din pacienții alergici la ambrozie. Astfel, ambele alergene pot fi considerate alergene minore pe baza frecvenței lor de legare de IgE. Nivelurile de IgE au fost relativ scăzute față de enolaza de polenul de ambrozia, în timp ce rAmb a 6 a indus niveluri ridicate de sIgE care au fost comparabile cu nivelurile induse de alergenul major Amb a 1 pentru unii dintre pacienți. Imunizare de iepuri cu alergenele recombinante au indus obținerea de anticorpi IgG specifici pentru alergene. Acești anticorpi au fost apoi folosiți pentru identificarea unor proteine similare în extracte alergenice de polen (ambrozia, artemisia, mesteacăn, timofitică, măsline și paracherniță) sau alimente (coajă și pulpă de măr, banană, kiwi, coajă și pulpă de piersică, arahide și făină de grâu). Anticorpii IgG de iepure specifici pentru Amb a 12 au răspuns în imunoblot la majoritatea extractelor alergenice de polen și alimente, cu excepția făinii de grâu. În ELISA răspunsul a fost similar,

inclusiv făina de grâu inducând un răspun IgG, însă răspunsul a fost mai scăzut față de alimente decât față de extractele polinice. Pentru investigarea relevanței clinice a acestor posibile reactivități încrucișate, extractele alergenicice de polen și de alimente au fost testate în ceea ce privește capacitatea lor de a inhiba legarea de IgE față de eAmb a 12 și iAmb a 12 utilizând serul de la cinci pacienți reactivi la enolază prin metoda ELISA. În special extractul de pulpă de piersică și extractul de kiwi au reușit să inhibe între 30% și 44% din legarea IgE față de iAmb a 12 și eAmb a 12. Inhibarea legării IgE față de enolazele din ambrozia folosind extracte de alergen de polen a fost aproape de 0%. Acest lucru ar putea fi atribuit unei concentrații scăzute a enolazelor în extractele de polen. Inhibarea IgE a arătat totuși diferențe individuale între pacienți, la un pacient extractul de arahide reușind să inhibe până la 60% din legarea IgE față de enolaza din ambrozia. Spre deosebire de co-recunoașterea extinsă a enolazelor între diferitele extracte alergenicice, IgG specific pentru rAmb a 6 a fost detectat doar față de rAmb a 6, Par j 2 și extractul de polen de ambrozia. O reactivitate similară a IgG a fost obținută cu serul specific pentru Par j 2 și alergenele anterioare. Acești anticorpi de iepure au reușit să inhibe în medie 72% din legarea IgE față de rAmb a 6 la doisprezece pacienți reactivi la nsLTP, inhibarea IgE variind între 35% și 95%, în funcție de titrul anticorpilor IgE.

Alergenicitate și asociere cu caracteristici clinice

Activitatea alergică a proteinelor recombinante a fost de asemenea testată în ceea ce privește eliberarea de mediatori (β -hexosaminidază) indusă de alergeni în bazofile leucemice de șobolan umanizate (huRBL) încărcate cu ser de pacienți reactivi la enolază sau nsLTP. Celulele au fost stimulate și cu alergenul major, nAmb a 1.01. Stimulare cu Amb a 12 a indus un nivel scăzut de eliberare de β -hexosaminidază, depășind 30% doar la doi dintre cei zece pacienți testați. Nu au fost observate diferențe între eAmb a 12 și iAmb a 12. nAmb a 1.01 a reușit să inducă până la 90% eliberare de β -hexosaminidază la patru dintre pacienții testați. Activitatea alergică a fost evaluată și în urma stimulării cu rAmb a 6 și Par j 2 (ca nsLTP cu potențial de reactivitate încrucișată) a celulelor huRBL încărcate cu serul de la opt pacienți reactivi la nsLTP. rAmb a 6 a reușit să inducă până la 100% eliberare de β -hexozaminidază la unul dintre pacienții reactivi și până la 40% la un pacient care a fost negativ față de nAmb a 1.01. La cinci dintre pacienții testați, eliberarea de β -hexozaminidază ca răspuns la rAmb a 6 a fost mai mare decât cea indusă de stimularea cu alergenul major nAmb a 1,01. Par j 2 nu a indus eliberare de β -hexosaminidază la niciunul dintre pacienții reactivi la rAmb a 6 testați.

De asemenea, a fost investigată asocierea reactivității față de enolaza și față de nsLTP din polenul de ambrozia cu alte caracteristici clinice, precum diagnosticul, simptomele

raportate, numărul de simptome sau alte sensibilizări. Nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește simptomele raportate legate de reactivitatea la Amb a 12 sau Amb a 6, simptome nazale și oculare fiind cel mai frecvent raportate. Simptome cutanate au fost raportate mai frecvent în rândul pacienților reactivi la Amb a 12, diagnosticul de urticarie aparând într-o proporție mai mare a pacienților reactivi la Amb a 12 (10.34% față de 4.13%). Prevalența crescută a simptomelor cutanate în rândul pacienților sensibilizați la Amb a 12 ar putea indica o cale diferită de sensibilizare prin piele, așa cum a fost sugerat pentru Der p 11, considerat un marker pentru dermatita atopică la pacienții alergici la acarienii de praf de casă. Rinoree și wheezing au fost raportate mai frecvent în rândul pacienților reactivi la rAmb a 6. Astfel, pacienții reactivi la rAmb a 6 au avut tendința de a raporta mai frecvent simptome astmatice pe lângă cele nazale și oculare (48.8% față de 35.24%). Diferențele nu au fost semnificative statistic.

Proporția mai mare de simptome cutanate în rândul pacienților reactivi la Amb a 12 ar fi putut rezulta și dintr-o prevalență mai mare a alergiilor alimentare în rândul pacienților reactivi la enolază (patru pacienți din rândul pacienților reactivi la Amb a 12 și doar unul din grupul celor nereactivi la Amb a 12). Cu toate acestea, nu a putut fi identificat un alergen alimentar anume care să fie comun pentru toți cei patru pacienți alergici la alimente, ceea ce îngreunează identificarea unei surse comune de reactivitate încrucișată. În rândul alergenelor inhalatorii, nu a fost identificată o sursă care să inducă reactivitatea încrucișată cu Amb a 12. În ciuda reactivității încrucișate identificate printre nsLTP neînrudite, doar unul dintre pacienții alergici la alimente a prezentat reactivitate la rAmb a 6. Identitatea de secvență scăzută cu alte nsLTP alergice, absența eliberării de β -hexosaminidază indusă de Par j 2, precum și probabilitatea scăzută de inducere a alergiei alimentare în rândul pacienților reactivi la nsLTP, sugerează specificitatea acestui alergen în alergia la polen de ambrozia. De asemenea, nivelurile ridicate de sIgE și eliberarea de β -hexosaminidază în rândul pacienților reactivi la rAmb a 6 subliniază relevanța clinică nsLTP în alergia la polenul de ambrozia.

Cartarea epitopilor IgE folosind peptide derivate din Amb a 6

Relevanța clinică crescută a alergenului Amb a 6 a determinat aprofundarea investigațiilor privind identificarea situsurilor de legare a IgE. Prin urmare, au fost construite patru peptide care să acopere secvența alergenului Amb a 6, excluzând regiunile hidrofobe. Peptidele au fost conjugate cu KLH pentru a induce anticorpi specifici pentru peptid prin imunizarea a doi iepuri. Capacitatea de legare de IgE a acestor peptide a fost investigată împreună cu capacitatea lor de a induce eliberarea de β -hexosaminidază în huRBL încărcate

cu ser de la pacienți reactivi la Amb a 6. Peptidele nu au arătat legarea de IgE în rândul celor șapte pacienți reactivi la nsLTP testați. Doar cele două peptide de la capătul C-terminal, A6-3 și A6-4, au prezentat o ușoară reactivitate IgE la doi dintre pacienții testați. Această reactivitate a fost mult mai mică decât cea indusă de rAmb a 6. Nici peptidele neconjugate, nici cele conjugate nu au indus eliberare de β -hexozaminidază în rândul celor șase pacienți reactivi la rAmb a 6 testați. Doar peptidul de la capătul N-terminal, A6-1, a indus de β -hexosaminidază la cea mai mare concentrație, însă această se poate datora solubilizării peptidului în acid formic, care să fi indus lizarea celulelor. Reactivitatea IgG al serului specific pentru peptide a fost testat față de rAmb a 6. De asemenea, reactivitatea IgG a acestuia a fost investigat față de două alergene cu potențial de reactivitate încrucișată: Art v 3, nsLTP din artemisia și Par j 1 din polenul paracherniță. Serul specific pentru Amb a 6 a arătat o reactivitate IgG ridicată față de Par j 1 și față de peptidele A6-2 și A6-4. Serul specific pentru peptida A6-1 a arătat reactivitate IgG față de Par j 1 și cel pentru A6-4 față de Art v 3. A fost investigată capacitatea acestor anticorpi specifici pentru peptide de a inhiba legarea IgE în rândul a șaisprezece pacienți reactivi la Amb a 6. Inhibarea legării IgE cu serului specific pentru peptid folosit individual sau în combinații a multor seruri specifice pentru peptid nu a ajuns la nivelul inhibării obținută cu serul specific pentru alergen (inhibarea maximă cu ser specific pentru alergen 90.6% față de cea cu combinație de ser specific pentru peptide 44.4%). Acest lucru ar putea indica prezența unor epitopi conformaționali care nu au fost acoperiți de peptidele secvențiale.

Concluzii

Enolaza și nsLTP de polenul de ambrozia au fost produse ca proteine recombinante. Proteinele purificate au avut structura secundară corespunzătoare și au reușit să lege IgE în rândul pacienților cu diagnostic de alergie la polen de ambrozia. Ambele alergene pot fi considerate alergene minore pe baza frecvenței de recunoaștere a IgE. Cu toate acestea, s-au observat diferențe în ceea ce privește alergenitatea lor. Amb a 12 a avut doar o capacitate redusă de a declanșa eliberarea de mediator în huRBL încărcate cu ser de la pacienții alergici. Identitatea secvenței cu alte enolaze alergene a fost ridicată pentru Amb a 12. Astfel, proteinele cu masă moleculară similară cu Amb a 12 au fost detectate în majoritatea extractelor alergene de alimente și de polen testate, extractele din pulpă de piersici și kiwi prezentând cea mai mare capacitate de inhibare a legării de IgE de Amb a 12. Asocierea cu caracteristicile clinice a relevat faptul că o proporție mare de pacienți cu alergii alimentare au avut reactivitate IgE față de Amb a 12, deși nu a fost identificată nicio sursă comună de alergene alimentare pentru toți pacienții reactivi. Acest lucru ar fi în concordanță cu diferențele

individuale găsite în inhibarea legării IgE folosind extracte alergenicice. Pacienții reactivi la Amb a 12 au fost mai des diagnosticați cu urticarie, ceea ce s-ar putea datora prevalenței mai mari a alergiei alimentare la acești pacienți. Amb a 6 produs în celule de insecte a fost o proteina cu conținut crescut de foi alfa-helix. Proteina separată în condiții nereducătoare a arătat o legare mai bună de IgE decât în condiții reducătoare, indicând prezența unor epitopi IgE conformaționali. Acest lucru a fost susținut de rezultatele obținute cu serurile specifice pentru peptide. Frecvența de legare a IgE a confirmat că Amb a 6 este un alergen minor, totuși testul de alergenicitate și nivelurile de sIgE comparabile cu cele pentru alergenul major Amb a 1 în rândul câtorva pacienți sensibilizați au susținut relevanța clinică a alergenului Amb a 6 în alerggia la polenul de ambrozia. Serul de iepure specific pentru Amb a 6 a avut reactivitate IgG scăzută față de alte extracte alergenicice, având totuși un răspuns față de alergenul din paracherniță. Reactivitatea față de nsLTP din paracherniță nu a fost detectată în testul funcțional, celulele încărcate cu ser de la pacienții reactivi la Amb a 6 nu degranulat după stimulare cu Par j 2. Spre deosebire de alte studii, care au raportat reactivitate încrucișată între nsLTP-uri alimentare și din polen, doar un pacient reactiv la Amb a 6 a fost alergic la alimente. De asemenea, reactivitatea IgG față de Art v 3 din polenul de artemisia a fost scăzută. Peptidele derivate din Amb a 6 nu au indus eliberarea de β -hexosaminidază în huRBL și nici legare de IgE. Astfel, Amb a 6 pare a fi un nsLTP specific polenului din ambrozia, prezentând reactivitate IgE ridicată, capabil să inducă eliberarea de mediatori. Inhibarea legării de IgE cu ser specific pentru peptide nu a depășit jumătate din cea obținută al ser specific pentru Amb a 6 indicând prezența epitopilor conformaționali.

Rolul Amb a 12 ca alergen minor la polenul ambroziei a fost confirmat în acest studiu, precum și potențialul său de reactivitate încrucișată cu mai multe proteine alimentare. Deși Amb a 6 a fost identificat ca un alergen important în cadrul acestei cohorte de pacienți alergici la polen de ambrozia, testarea reactivității între diferite populații ar oferi informații suplimentare privind relevanța clinică a acestui alergen. Studiul ar fi putut beneficia, de o caracterizare structurală mai detaliată a alergenilor, spre exemplu prin măsurarea spectrului UV apropiat pentru a obține informații despre structura lanțurilor aromatice și structura terțiară și cuaternară a proteinei. În plus, studiile de cristalografie ar putea oferi o caracterizare structurală precisă a proteinei. Construirea unor noi peptide, să acopere și epitopii conformaționali, ar putea oferi informații suplimentare despre regiunile de legare a IgE. Identificarea altor alergene relevante din polenul de ambrozia și a situsurilor de legare IgE ale acestor alergene ar putea constitui baza pentru dezvoltarea unor AIT-uri de nouă generație bazate pe peptide alergenicice. Dezvoltarea de imunoterapii ar necesita însă testarea suplimentară a siguranței și eficacității

peptidelor derivate din Amb a 6 incluse în acest studiu, spre exemplu prin teste de proliferare a celulelor T. Alegerea ulterioară a tuturor peptidelor relevante din punct de vedere clinic care urmează să fie incluse în dezvoltarea AIT-urilor pe bază de peptide ar necesita, de asemenea, testarea reactivității IgE, a alergenității și a capacității de proliferare a celulelor T a constructelor peptidice.

CONTRIBUȚII PERSONALE

- Revizuirea literaturii privind mecanisme de hipersensibilitate și factorii prenatali în dezvoltarea bolilor alergice
- Căutarea secvențelor de alergene, Blast de proteine similare și construcția de matrici de identitate și a arborelui filogenetic pentru alergenele din ambrozia analizate
- Cultivarea de celule *Escherichia coli*, *Spodoptera frugiperda* (Sf9) și a bazofilelor leucemice din șobolan umanizate (huRBL)
- Design de secvență genică pentru producția de alergene recombinante
- Experimente de exprimare la scară mică pentru a determina condiții optime de exprimare
- Transformarea, transfecția, izolarea și purificarea proteinelor recombinante
- Prepararea extractelor alergenicice din polen și alimente
- Cuantificarea alergenelor recombinante în extractele alergenicice
- Immunoblot cu alergenele recombinante
- Testarea activității enzimice a alergenelor recombinante Amb a 12
- Testarea reactivității IgE în ELISA, biotinilarea alergenelor recombinante și cuantificarea sIgE în ImmunoCAP
- Evaluarea alergenității alergenelor recombinante
- Evaluarea asocierii dintre reactivitatea IgE și caracteristicile clinice
- Determinarea prevalenței relative a alergenelor în extractele alergenicice
- Evaluarea proteinelor cu potențial de reactivitate încrucișată din extractele alergenicice de polen și de alimente
- Cuplarea cu KLH a peptidelor care acoperă secvența alergenului Amb a 6
- Evaluarea reactivității IgE și a alergenității peptidelor
- Testarea reactivității încrucișate a serului specific pentru peptide cu proteine de transfer lipidic nespecific alergenicice din artemisia și paracherniță
- Evaluarea inhibării legării de IgE a serului specific pentru peptide individuale și combinate