

Einfluss von Kohlenhydratstrukturen auf die allergische Reaktion am Beispiel der Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense* L.)

Zusammenfassung

Der Einfluss der Kohlenhydratstrukturen aus Lieschgraspollen (*Phleum pratense*, L.) auf die allergische Reaktion sollte bestimmt werden. Zur strukturellen Charakterisierung der Kohlenhydratstrukturen wurde das Majorallergen Phl p 1 mit Trypsin gespalten, die erhaltenen Peptide chromatographisch getrennt und einzeln mittels Neutralzuckeranalyse auf gebundene Glycane untersucht. Nachgewiesen wurden die Monosaccharide N-Acetylglucosamin, Mannose, Fucose, Xylose und Arabinose in nur einem Glycopeptid, welches durch N-terminale Ansequenzierung als das Peptid bestehend aus den Aminosäureresten 4 – 17 identifiziert wurde und welches die einzige N-Glycosylierungsstelle des Phl p 1 enthält. Durch massenspektrometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass dieses Glycopeptid 4-17 in vier Glycoformen vorliegt: Es trägt ein N-Glycan, das in zwei Glycoformen vorkommen kann und immer aus zwei N-Acetylglucosamin- und zwei Mannoseresten sowie je einem Xylose- und einem Fucoserest besteht; darüber hinaus ist in ca. 40 % der Moleküle ein dritter Mannoserest vorhanden. Desweiteren ist an ca. 60 % der Phl p 1 Moleküle ein einzelner Arabinoserest über ein Hydroxyprolin gebunden. Im N-Glycan konnte über Spaltungsversuche mit Glycosidasen sowie Vergleich mit Literaturdaten eine α 1-3 Bindung der Fucose an das erste Kern-N-Acetylglucosamin nachgewiesen, bzw. die Bindung der Xylose β 1-2 an die Kern-Mannose erschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das N-Glycan des Phl p 1 eine IgE-Reaktivität besitzt. Eine IgE-Bindung spezifisch an die gebundene Arabinose konnte nicht nachgewiesen werden. Die Seren einiger Patienten enthalten IgE gegen Lieschgras-Pollenextrakt, das ausschließlich gegen Fucose-haltige Glycane gerichtet ist. Dies führt zu IgE-Kreuzreaktivitäten (wie die in dieser Arbeit gezeigte zwischen Bienengift und Lieschgras-Pollenextrakt), es handelt sich also bei dem N-Glycan des Phl p 1 um eine kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinante (CCD).

Es konnte gezeigt werden, dass das Phl p 1 zu keiner Mediator-Freisetzung (IL-4) aus humanen Basophilen führte, deren $Fc\epsilon$ -Rezeptoren mit Kohlenhydrat-spezifischem IgE

beladen worden waren. Im Lieschgras-Pollenextrakt ist jedoch auch das Majorallergen Phl p 13 enthalten, welches bis zu vier der beschriebenen N-Glycane enthält. Dieses sowie ein Neoglycoallergen aus BSA mit bis zu sechs N-Glycanen führte im beschriebenen Basophilentest zu einer IL-4 Freisetzung. Die mangelnde Fähigkeit der Glycane zur Mediator-Freisetzung kann also nicht der Grund für das Fehlen von allergischen Symptomen bei den meisten Patienten mit IgE-Reaktivität gegen CCD sein.

Ein Faktor für den eine inhibierende Wirkung auf die Mediator-Freisetzung vermutet wird, ist Allergen-spezifisches IgG4. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Seren von zwei Patienten mit Lieschgras-spezifischem IgE ausschließlich gegen die N-Glycane verglichen. Ein Unterschied im Verhältnis IgG4 zu IgE gegen die CCD wurde nicht gefunden. Auch kam es in beiden Fällen im Basophilen-Test zu einer Mediator-Freisetzung, wenn die Rezeptoren der Zellen mit den Antikörpern aus den entsprechenden Seren beladen wurden. Es ist diesen Daten nach unwahrscheinlich, dass der Anstieg von spezifischem IgG4 primär die Ursache für das Ausbleiben von allergischen Symptomen darstellt.

Um zu klären, ob das Phl p 1 in Tabak rekombinant mit seinen natürlichen Glycosylierungen hergestellt werden kann, wurden junge Tabakblätter mittels Genegun mit einem Plasmid beschossen, welches das Gen für Phl p 1 unter Kontrolle des 35s-Promotors enthielt und zu einer transienten Expression des Proteins in den Blättern führen sollte. Obwohl das als Positivkontrolle gewählte GFP Fluoreszenz-mikroskopisch eindeutig nachgewiesen werden konnte, war ein immunologischer Nachweis von Phl p 1 im Extrakt aus den beschossenen Blättern nicht möglich. Die Transformationsrate mit der Genegun war offensichtlich zu niedrig.

Polysaccharide aus Lieschgras-Pollenextrakt wurden mittels tryptischem Abbau der Proteine und anschließender chromatographischer Trennung isoliert. Die strukturelle Bestimmung ergab ein Gemisch aus Galactan und Arabinogalactan. Gräserpollen-Allergiker, Allergiker ohne Gräserpollen-Allergie und Nicht-Allergiker wurden auf Antikörper gegen die Polysaccharide untersucht. Obwohl alle Gruppen in gleichem Maße IgG gegen die Polysaccharide zeigten, konnte in keiner Gruppe spezifisches IgE gegen diese nachgewiesen werden. Als Beteiligte am klassischen Pathomechanismus der Typ I-Allergie können die Polysaccharide daher ausgeschlossen werden.