



UPPSALA  
UNIVERSITET

# Kan typ I-allergier botas

Marcus Danielsson

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2010  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Immunförsvaret skyddar kroppen på olika sätt mot olika slags infektioner. Vissa parasitiska maskar inducerar en specifik typ av immunsvaret vilket även är den bakomliggande mekanismen till hur immunförsvaret reagerar mot främmande ämnen hos allergiker.

Det närmaste ett botemedel vi nu har tillgängligt är specifik immunoterapi då allergiker utsätts för allergenet i stora doser under lång tid för att på det viset styra om immunförsvaret och därmed bli av med allergin. Trots att behandlingen har varierande resultat samt risk för allvarliga allergiska sidoeffekter har behandlingsmetoden visats stort intresse av allergiforskare.

För att lindra symptomen vid behandling genom specifik immunoterapi har antikroppar utformats för att blockera de allergispecifika IgE-antikropparna och därmed minska eller förhindra det allergiska förloppet. Även allergenet har modifierats i samma syfte då epitopena för IgE tagits bort.

Den senaste tidens allergiforskning har utnyttjat DNA-vaccin för att låta kroppsegna celler producera de främmande allergenerna eftersom denna metod visat sig kunna stimulera immunförsvaret på ett terapeutiskt vis. DNA-vaccin kan förutom att vara ett potentiellt framtida botemedel mot existerande allergier även kunna fungera i profylaktiska samband för att begränsa ökningen av antalet allergiker. Den senaste forskningen utreder ifall allergenet kodat i form av ett mRNA kan fungera som ett säkrare alternativ än DNA-vaccinet i framtida profylaktiska behandlingar.

## Inledning

Allergier är ett växande samhällsproblem med allt från lindriga till livshotande symptom. Av Sveriges befolkning var ca 30 % allergiska 2004-2005 men mörkertalet kan vara stort (Persson 2006). Ämnen som orsakar allergiska symptom kan vara ämnen (allergen) som existerar i stora mängder i miljön såsom björk och gräspollen men även sällan påträffade ämnen såsom giftet i ett bistic. Symptomen hos allergiker kan vara så pass lindriga som en lätt snuva men i värsta fall kan det inducera en anafylaktisk chock och slutligen hjärtstopp. Typ I allergier medieras främst av IgE-antikroppar vilka binder till allergenet och aktiverar inflammatoriska celler och processer i kroppen.

I den industrialiserade västvärlden är allergier mycket vanligare än i U-länder (van den Biggelaar *et al.* 2000). Många teorier om orsaken till allergier har framförts, bland annat har Samuelson *et al.* (2008) utrett hypoteser om att trärök, dieselavgaser och partiklar från biltrafik skulle öka sannolikheten att utveckla allergier, men detta gick inte att fastställa. Även användning av antibiotika har framförts som en möjlig orsak till allergier men har inte gått att bevisa (Foliaki *et al.* 2004). En teori som bättre reflekterar ett samband är ”hygienhypotesen” där antagandet att exponering till bakterier, virus och vissa parasiter tränar immunförsvaret till att aktivera en viss typ av T-hjälparceller (Th1), den delen av immunsvaret är inte aktiv vid allergier men desto viktigare vid vanliga infektioner. Hygienteorin har uppstått då barn vilka växt upp med många infektioner uppvisat lägre förekomst av allergier. Kopplingen mellan infektioner och lägre förekomst av allergier utreddes vidare av van den Biggelaar *et al.* (2000) vilka studerade barn i Gabon och påvisat lägre förekomst av allergier kopplat till infektion av parasitiska maskar vilket innebär aktivering av en annan typ av T-hjälparceller (Th2), vilka även är den typ av celler som är aktiva vid allergier.

Vid behandling genom specifik immunoterapi (SIT) är fortfarande mekanismen vilken lindrar och även botar allergier fortfarande delvis okänd. Liksom hygienhypotesen tros SIT-behandlingen framhäva en Th1-respons och därmed styra immunförsvaret från Th2 till Th1-svar. I enlighet med teorin om att maskparasitinfektioner kan skydda mot allergier, kan komponenter i Th2-svaret tros vara viktiga för att kunna dämpa Th2-svaret och därmed slutligen kunna aktivera endast ett Th1-svar. Med anledning av detta kan det därför vara viktigt att känna till mekanismen bakom normala immunreaktioner för att förstå hur den allergiska reaktionen särskiljer sig för att kunna använda detta i behandling mot allergier.

Detta arbete kommer att belysa immunologiska mekanismer för att presentera allergier i syfte för att kunna bota dessa genom SIT. Dessutom presenteras modifieringar av dels immunsvaret men även allergener med syfte att antingen lindra symptomen under SIT-behandling eller att erbjuda möjlighet för profylaktisk behandling för framtiden.

# Immunologiska mekanismer

## Ospecifika immunförsvaret avslöjar mikrobtypen via cytokiner

Immunförsvaret delas in i två typer (Abbas *et al.* 2007): det ospecifika och det specifika. Det ospecifika immunförsvaret består av fysiska barriärer såsom slemhinnor och epitelceller, inflammationsbildande proteiner i blodet, NK-celler (cytotoxiska lymfocyter), fagocytiska celler (makrofager och neutrofiler). Stimulerade NK-celler, fagocytiska celler och till viss del även epitelceller producerar cytokiner som vidare kommunicerar med celler i det specifika immunförsvaret. Det ospecifika immunförsvaret känner främst igen karakteristiska strukturer vilka ofta förekommer hos sjukdomsalstrande mikrober och producerar lämpliga cytokiner för att vidare stimulera immunförsvaret så att mikroben elimineras (Abbas *et al.* 2007). Det ospecifika immunförsvaret kan inte själv skapa en allergi, men däremot kan de producerade cytokinerna påverka uppkomsten av allergier genom att styra immunförsvaret i fel riktning.

Tabell 1. Cytokinernas effekt inom de olika undertyperna av T-cellrespons. Baserad på Abbas *et al.* 2007.

Cytokin	Effekt
<b>Cytokiner vid Th1-respons</b>	
IL-2	Stimulerar tillväxt av Th1-celler
INF- $\gamma$	Stimulerar Th1- och inhiberar Th2-respons
IL-12	Th1 differentiering & INF-g-produktion
IL-18	Förstärker effekt av IL-12
<b>Cytokiner vid Th2-respons</b>	
IL-10	Inhiberar Th1-respons samt T-cellaktivering
TGF- $\beta$	Inhiberar lymfocytillväxt & stimulerar IgA produktion hos B-celler
IL-4	Stimulerar Th2- och inhiberar Th1-respons
IL-5	Aktiverar eosinofiler
IL-13	Slembildning hos epitelceller och IgE-produktion hos B-celler

## Specifika immunförsvaret styr reaktionen via CD4<sup>+</sup> T-celler

Det specifika immunförsvaret består av T- och B-lymfocyter (T- och B-celler) vilka bildas i thymus (T) respektive i benmärgen (B) och har var för sig särskilda funktioner (Abbas *et al.* 2007). T-cellerna delas primärt upp i två kategorier: CD4<sup>+</sup> och CD8<sup>+</sup> T-celler (Abbas *et al.* 2007). CD4<sup>+</sup> T-celler har till uppgift att styra immunförsvaret genom att utsöndra cytokiner beroende på vilket slags antigen de presenteras för av antigenpresenterande celler (APC) eller beroende på vilka cytokiner det ospecifika immunförsvaret utsöndrat. Antigen vilka presenteras via APC denatureras och delas upp i korta peptider för att sedan presenteras utanför cellen kopplade till MHC II-molekyler (Valenta *et al.* 2010). Genom CD8<sup>+</sup> T-celler induceras apoptos i kroppsegna celler där mikrober infekterat (Abbas *et al.* 2007). B-celler aktiveras av CD4<sup>+</sup> T-celler varvid B-cellen differentieras till en antikroppsproducerande plasmacell. Bildade cytokiner från såväl ospecifika som specifika immunförsvaret avgör sedan typen av immunrespons mot antigenet, tabell 1.

### **Th1-respons ger ett brett skydd mot mikrober**

Flera olika varianter av cytokinuttryck kan utvecklas av CD4<sup>+</sup> T-celler men vanligen uppstår endast två typer: Th1- eller Th2-respons (Abbas *et al.* 2007). Th1-respons uppstår vid infektion av bakterier, virus och parasiter som aktiverar makrofager eller NK-celler vilka producerar IL-12 respektive IFN- $\gamma$  (Abbas *et al.* 2007). Individer med försämrat uttryck av IFN- $\gamma$  på grund av mutationer i generna för IFN $\gamma$ :s receptor studerades av Wood *et al.* (2005) vilka iakttog högre förekomst av allergier och högre IgE-nivåer hos dessa individer jämfört med övrig befolkning. Detta indikerar att okänslighet för IFN- $\gamma$  styr immunsvaret mot Th2 då IgE produceras vid Th2-respons (Wood *et al.* 2005).

### **Th2-respons viktigt försvar mot parasitiska maskar**

Else *et al.* (1994) påvisade att Th2-svar vid infektion av *Trichuris muris* (en parasitisk nematod) hos möss var nödvändigt för att eliminera parasiten. Detta fastställdes genom studier på två olika typer av möss med antingen Th1- eller Th2-dominerade immunsystem. De Th1-dominerande mössen uppvisade kronisk infektion fram till dess att anti-IFN $\gamma$ -antikroppar introducerades varvid Th2-respons kunde uppstå och parasiten eliminerades. De Th2-dominerande mössen klarade av att eliminera infektionen fram till dess att Th2 aktiviteten hämmades genom att blockera IL-4-receptorn via administration av anti-IL-4-receptor-antikroppar. Dessutom visade Else *et al.* (1994) att Th1-dominerande möss kunde eliminera parasiten ifall IL-4 tillfördes. Generellt brukar Th2-respons därför förklaras som ett naturligt skydd mot parasitiska maskar och till viss del är detta korrekt. Mainzel & Yazdanbakhsh (2003) menar i en översiktartikel att detta är en övergeneralisering men förnekar inte att Th2-respons är en mycket viktig del i kroppens naturliga försvar mot vissa parasitiska nematoder och plattmaskar. Vidare poängteras att ett renodlat Th2-immunsvaret hos möss endast kunnat påvisas vid just nematodinfektioner i tarmen, i övrigt återfinns alltid inslag av Th1 i delar av försvaret.

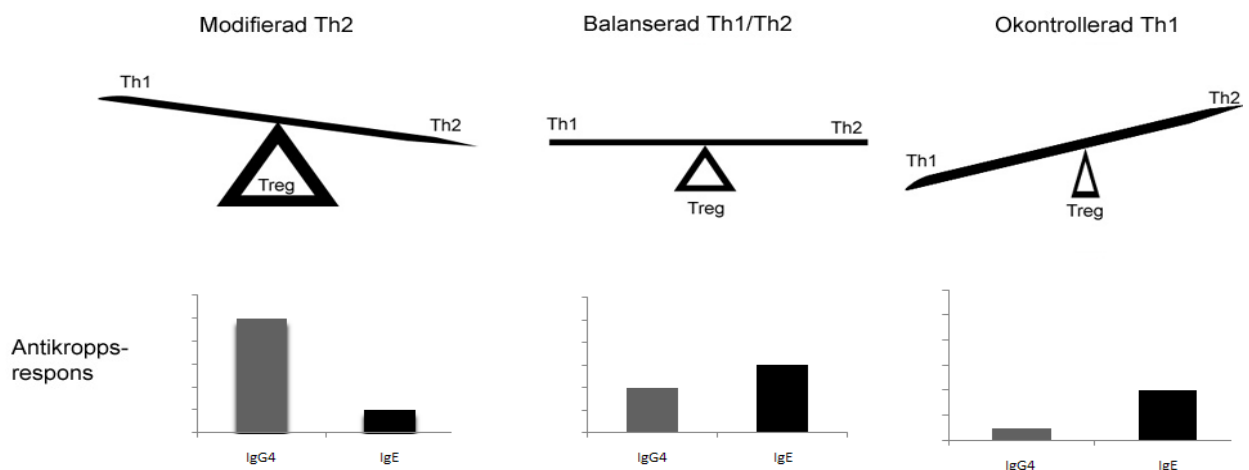
### **Reglerande T-celler dämpar immunförsvaret**

Okontrollerade Th1 eller Th2-reaktioner orsakar efter en tid inte sällan tumörer eller potentiellt dödliga inflammationer och är båda lika farliga för kroppen (Mainzel & Yazdanbakhsh 2003). Reglerande T-celler (Treg) har till uppgift att dämpa immunsvaret, upprätthålla en lagom populationsnivå av immunceller och undvika att immunförsvaret reagerar mot kroppsegna antigen. Tregs finns i olika typer med olika proteinuttryck på dess cellyta: naturliga Treg (nTreg), IL-10 producerande Treg (iTreg) och adaptiva Treg (Tr1), tabell 2 (Wang *et al.* 2010). Stimulering av IL-10 vid ett Th2-svar stimulerar B-celler att istället för IgE, producera IgG4 (Mainzel & Yazdanbakhsh 2003).

Tabell 2. Olika reglerande T-celler med deras respektive celluttryck där CD25 är en aktiveringsmarkör för lymfocyter och FOXP3 är en markör för vissa Treg. Baserad på Wang *et al.* 2010.

	Celluttryck	Immunosuppression
nTreg	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup>	Cell-cell kontakt
iTreg	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup>	Produktion av IL-10
Tr1	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>-</sup> IL-10 <sup>+</sup>	Produktion av IL-10 & TGF- $\beta$

Vid infektion av *Shistosoma mansoni* och *Brugia malayi* hos människor menar Mainzel & Yazdanbakhsh (2003) att tre olika resultat kan observeras beroende på aktiviteten hos Th1, Th2 och Treg-celler, figur 1. Ena gruppen drabbas av tysta infektioner vilka de inte klarar av att eliminera. Dessa har dominerande Th2-respons men även höga nivåer av IL-10 vilket indikerar på att immunsvaret modifierats av Treg-celler. Andra gruppen individer uppvisar okontrollerad Th1-respons mot äggen vilka *S. mansoni* lagt i vävnader vilket bland annat kan leda till granulom medan okontrollerad Th1-respons vid infektion av *B. malayi* orsakar elefantiasis genom inflammation av lymfvävnad. Den okontrollerade Th1-responsen menar Mainzel & Yazdanbakhsh (2003) troligtvis beror på låg aktivitet hos Treg-cellerna. Den sista gruppen individer förefaller resistenta mot båda infektionerna vilket troligtvis är en följd av en balanserad Th1/Th2-respons vilket skapats genom Treg-cellaktivitet.



Figur 1. Schematisk översikt för Ig-svaret vid olika aktivitetsnivåer av Treg-celler vid infektion av *Shistosoma mansoni* och *Brugia malayi* vilka kan observeras hos människor. Storleken på triangeln motsvarar grad av aktivitet hos Treg-celler medan vågen tynger ner på den sidan med den dominerande Th-celltypen. Modifierad Th2 innebär hög Treg-aktivitet och höga nivåer av IgG4 vilket leder till känslighet mot båda infektioner. Okontrollerad Th1 beror troligtvis på låg Treg-aktivitet vilket de låga IgG4 nivåerna indikerar på. Detta leder till sjukdom vid båda infektionerna. Ett balanserat Th1/Th2 förhållande ger resistans mot båda infektionerna. Antikropsresponsen uppvisar relativt jämn fördelning mellan IgE och IgG4 vilket tyder på att immunsvaret balanseras genom Treg-aktivitet.

### Allergier är en Th2-respons

Dock uppstår enligt Romagnani (1994) typ I allergier när en  $CD4^+$  T-cell differentieras till en Th2-cell i respons till ett allergen vilket kännetecknas av att cytokinerna IL-4, IL-5 och IL-13 produceras. Eosinofiler aktiveras av IL-5 medan IL-13 stimulerar slembildning hos epitelceller. För att B-celler ska producera IgE krävs IL-4, även positiv feedback för Th2-differentiering och samtidigt inhibering av Th1-responsen. Dessa svar förmedlas av IL-4 (Abbas *et al.* 2007). På cellytan hos mastceller och basofiler binds IgE till receptorn FcεRI. När antigen binds till IgE bundet till FcεRI skickas signalen vidare i cellen och stimulerar

tömning av granula vilka innehåller flera inflammatoriska ämnen, bland andra histaminer (Mainzel & Yazdanbakhsh 2003).

### **Immunologiskt minne kommer ihåg allergin**

T- och B-celler kan efter en immunreaktion differentieras till nedtystade celler vilka vid antigenstimulering kan differentieras tillbaks till sin aktiva form (Abbas *et al.* 2007). Särskilt B-cellernas minnesceller har visat sig vara ett en tuff utmaning vid behandling av allergier då dessa celler kan gömma sig i kroppen för att senare möjliggöra IgE-produktion (Roesler *et al.* 2009).

## **Specifik Immunterapi**

Målsättningen för specifik immunterapi (SIT) är att skapa tolerans specifikt mot det allergen patienten är allergisk mot genom gradvis ökande doser av allergenet (Frew 2010). Vanligtvis startas behandlingen genom injektioner under huden med en veckas intervall tills en specifik koncentration av injicerat allergen uppnåts, därefter underhålls behandlingen med injiceringar av denna mängd var fjärde till sjätte vecka under en period av tre till fem år (Frew 2010). Administration av allergenet, menar Bublin *et al.* (2007), kan även ske via de nasala slemhinnorna eller oralt, då vanligen under tungan. Vidare menar Bublin *et al.* (2007) dock att det krävs högre doser av allergen vid denna typ av administration jämfört med intravenös dosering. Alternativa doseringsmetoder varierar doseringsintervallerna i starten av behandlingen tills rätt koncentration uppnåts, exempelvis klusterdoseringar med flera injektioner upprepade veckovis (Massanari *et al.* 2010), eller påskyndade doseringar där hela upptrappningen till rätt koncentration som kortast kan avklaras på en dag (Frew 2010). Den påskyndade doseringsmetoden används dock sällan eftersom den medför större risk för allergiska sidoeffekter (Frew 2010).

### **Mekanismen hos SIT**

Den exakta immunologiska mekanismen till hur SIT fungerar är i nuläget inte fullständigt klarlagt men studier av antikroppsrespons och cytokinproduktion har framfört två möjliga mekanismer.

En delförklaring är att SIT påverkar reglerande T-celler ( $T_{reg}$ ) (Frew 2010). Efter lyckad SIT behandling sjunker förekomsten av IgE och förekomsten av IgG4 höjs vilket åstadkoms av IL-10 (Wang *et al.* 2010). I en försöksgrupp med 27 kvalsterallergiker påvisades genom flödescytometri en dubbling av Tr1-celler samt 60 % ökning av iTreg och  $CD4^+IL-10^+$   $T_{reg}$ -celler efter SIT-behandling (Wang *et al.* 2010). Dessutom sker en omdirigering från Th2 till Th1-respons, varvid en ofarlig respons förekommande hos icke-allergiker i stället uppkommer (Schmidt-Weber & Blaser 2004).

### **IL-10 indikator för lyckad SIT**

Eftersom IL-10 producerande Treg-celler har en central roll som immundämpare vid Th2-respons och IL-18 är ett viktigt cytokin i en Th1-respons är dessa av intresse att studera för att förstå hur SIT fungerar. SIT försök genomfördes således med 40 allergiker (björkpollen och/eller timotej) varvid lymfocyternas mRNA-nivåer av IL-10 och IL-18 analyserades via

TaqMan RT-PCR före SIT samt ett år efter SIT-behandling (Savolainen *et al.* 2004). SIT-behandlingen resulterade i höjda men varierande IL-10 och IL-18 mRNA-nivåer. Allergikerna delades in i tre kategorier beroende på hur effektivt SIT-behandlingen lindrade deras symptom (god, måttlig och ingen lindring). Ett år efter SIT uppvisade de med ingen lindring högst IL-10-värden, gruppen med måttlig lindring visade förhöjda värden av IL-10 medan de med god lindring uppvisade lägst IL-10-värden (Savolainen *et al.* 2004). Däremot mättes nivåerna av IL-10 och IL-18 när underhållsdosen i behandlingen uppnåts, där påvisades högst nivå hos gruppen som uppvisade god lindring av symptom ett år efter behandlingen (Savolainen *et al.* 2004). Nivåerna av IL-10 syftar på att Treg celler dämpar Th2-responsen relativt tidigt och IL-18 nivåerna tyder på att immunsvaret styrs mot en Th1-respons vilka båda är viktiga för att uppnå tolerans.

### **SIT styr immunresponsen från Th2 till Th1**

En studie jämförde 10 pollenallergiker, vilka med gott resultat genomgått fyra års SIT-behandling, med 10 pollenallergiker utan tidigare behandling, med avseende på produktion av IL-12-, IL-4- och INF- $\gamma$ -mRNA i huden där allergenet injicerats (Hamid *et al.* 1997). SIT-behandlade allergiker hade fler IL-12- och INF- $\gamma$ -mRNA-producerande celler jämför med icke-SIT-behandlade vilka istället hade fler IL-4-mRNA-producerande celler vilket bevisar att SIT kan omdirigera immunförsvaret från en Th2-respons till Th1-respons (Hamid *et al.* 1997).

### **Anti-IgE lindrar SIT-behandlingen**

Omalizumab är ett kommersiellt preparat med monoklonala anti-IgE-antikroppar producerade från möss och sedan humaniserade med människo-IgG, endast epitopen och därmed även specificiteten härstammar från möss (Hamelmann 2003). Försök med omalizumab i samband med SIT visade sig ge färre allergiska bieffekter jämfört med behandling med endast placebo i samband med SIT (Massanari *et al.* 2010) vilket även setts i liknande försök (Schmidt-Weber & Blaser 2004).

Genom att binda till IgE specifikt vid bindningsstället för Fc $\epsilon$ RI kan omalizumab hindra IgE att aktivera mastceller och basofiler (Hamelmann 2003). Behandling med enbart omalizumab i låga doser hos patienter med atopiskt eksem och mycket höga IgE-värden resulterade i lägre uttryck av IgE och högre uttryck av IgG hos plasmaceller i blodet, vilket i sin tur betyder att omalizumab även medför en reglerande funktion (Belloni *et al.* 2007).



## Modifiering av antigen

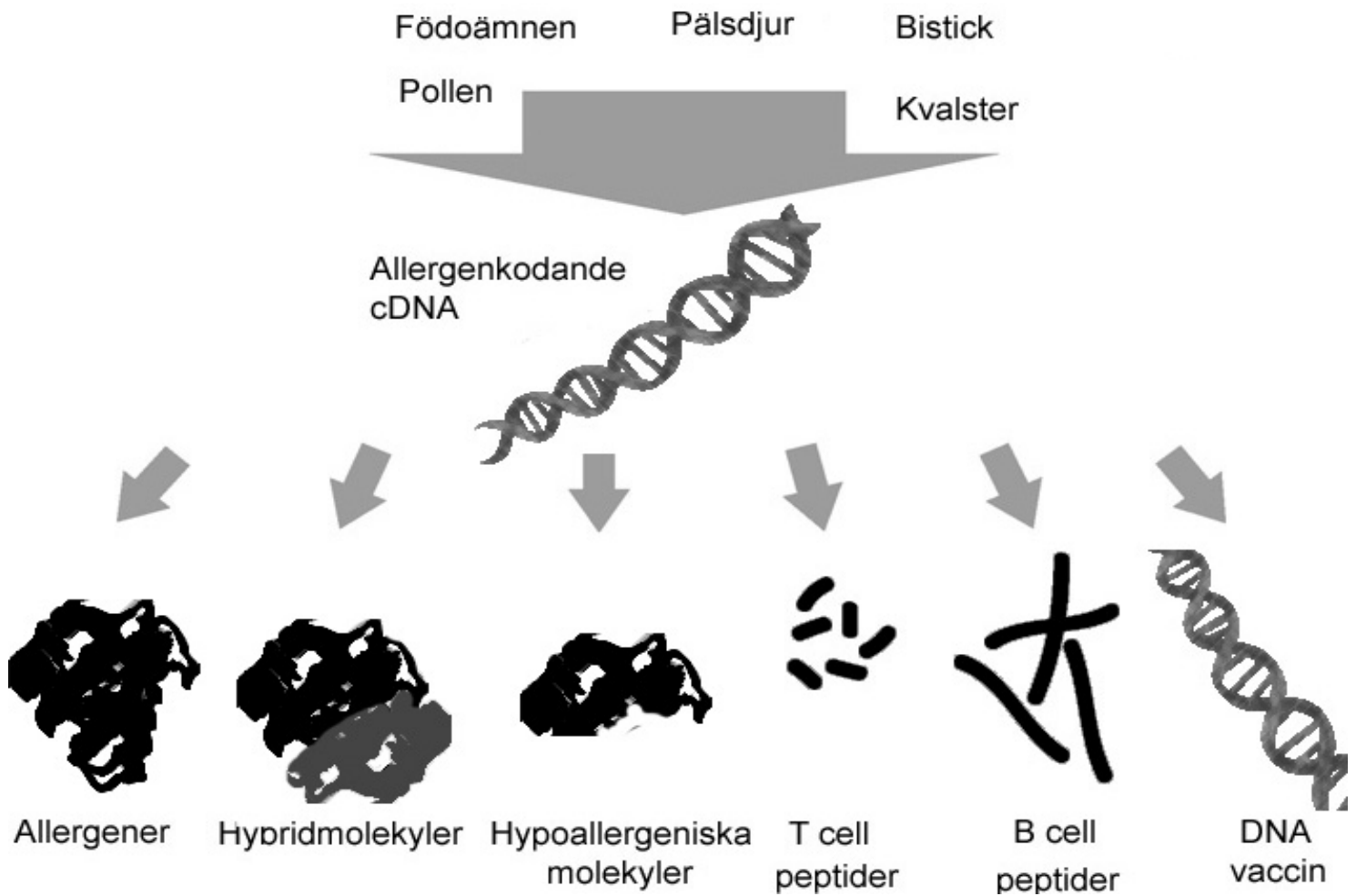
För att ytterligare hindra allergiska sidoeffekter kan allergenet i sig modifieras. Tidigare renades allergenet ut direkt från organismen, på senare tid har generna kodande för de vanligaste förekommande allergener kunnat isoleras (Valenta *et al.* 2010) och användas för framställning och modifiering av allergenet, figur 2. Kvalitén på extraktet av allergen kan ha stor betydelse för utfallet i en SIT-behandling i avseende på doseringsstandardisering och grad av renhet varvid dessa framsteg ger nya möjligheter för forskningen, därför har senare tids allergiforskning visat större intresse för produktion av allergen genom kloning samt manipulering av allergen.

Redan 1970 kunde Marsh *et al.* observera hur allergen behandlade med formaldehyd kunde hindra IgE-antikroppar hos allergiker från att binda till allergenet. Det kemiskt modifierade allergenet kom att kallas allergoid. Fortfarande finns intresse för dessa resultat eftersom allergoider genom deras kemiska modifikationer kan stimulera det ospecifika immunsvaret att producera cytokiner vilka kan propagera en Th1-respons (Perovic *et al.* 2009).

### Profylaktiskt allergivaccin under utveckling

En teknik för att stimulera immunförsvaret på DNA-nivå utvecklades av Tang *et al.* (1992), genom att utforma en plasmid för kloning i *Escherichia coli* med promotor och en kopia av genen för ett mänskligt tillväxthormon (hGH). Introduktion av plasmiden skedde i möss genom partikelbombning, plasmider fästa till guldpartiklar besköts med tryckluft in i hudceller (Tang *et al.* 1992). Mössen producerade efter vaccinering anti-hGH-antikroppar vilket visar på att DNA-vaccin kan stimulera immunförsvaret genom introduktion av gener vilket kan erbjuda terapeutiska möjligheter för allergiker.

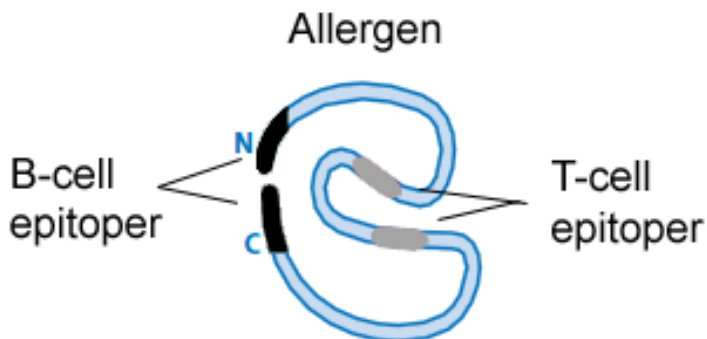
Exempel på en sådan terapeutisk möjlighet är vaccination av individer av låg ålder vilka har en förhöjd risk att drabbas av allergier på grund av genetiska faktorer men ännu inte utvecklat sådana. Ett allergivaccin måste hålla stora säkerhetsmarginaler och därför kan användningen av DNA-vaccin vara tveksamt eftersom det finns en hypotetisk risk att vektorn inkorporeras i kromosomalt DNA eller att antikroppar mot DNA bildas (Weiss *et al.* 2010). För att minska riskerna så långt som möjligt utformade Roesler *et al.* (2009) ett RNA-vaccin endast bestående av mRNA-transkriptet av gräspollenallergen-genen *Phl p 5*. Immuniserade möss uppvisade i 23 fall av 29 en Th1-respons, dock inte lika kraftigt som vid liknande immunisering med motsvarande DNA-vaccin (Roesler *et al.* 2009).



Figur 2. Möjliga modifieringar och användningsområden för genen ansvarig för allergin när den isolerats. Baserad på Linhart & Valenta (2005).

### T-cellen känner igen allergen via specifika epitoper

T- och B-celler har olika epitoper på allergenet, figur 3. Eftersom allergenet presenteras i sin korrekta struktur ligger epitopena för B-cellerna och därmed även IgE-antikropparna på ytan av proteinet medan T-cellerna presenteras det denaturerade allergenet i mindre peptider på MHC II-molekyler (Valenta *et al.* 2010).



Figur 3. Ett exempel på hur B- och T-cellernas epitoper kan vara placerade. Observera att T-cellernas epitoper inte behöver vara exponerade på allergenets yta. Baserad på Valenta *et al.* (2010).

För att identifiera T-cellepitoper delades det ansvariga proteinet för bisticksallergi upp i 62 överlappande peptider vilka saknade reaktivitet med IgE. Dessa peptider introducerades intravenöst till bisticksallergiker varefter lymfocytkoncentrationen i blodet mättes. Med tre peptider kunde en ökning av koncentrationen lymfocyter påvisas vilket innebär att dessa tre peptider bar på T-cellepitoper (Carballido *et al.* 1993).

För att kontrollera effekten av SIT utan B-cellepitoper visade Muller *et al.* (1998) vidare att dessa tre epitopeptider kan styra immunsvaret från Th2 till Th1 vid SIT-behandling hos bisticksallergiker utan att aktivera B-celler.

Allergenet hos trädpollen binds dock av allergikers IgE i strukturellt viktiga områden varvid eliminering av dessa skulle förhindra uttrycket av proteinet men avsaknaden av dessa epitoper skulle samtidigt förhindra bindning mellan IgE och allergenet. Eftersom björk, al och hassel är närbesläktade och samtliga tillhör ordningen *Fagales*, är även genen vilken orsakar allergi likartad hos dessa. För att genom SIT kunna stimulera endast T-celler utan risk för aktivering av B-celler och IgE skapade ett forskarlag hybridmolekyler av allergenerna (Wallner *et al.* 2007). Genom DNA-shuffling kunde generna slumpvis blandas och först genom positiv selektion med polyklonala antikroppar mot trädallergenerna identifierades funktionella proteiner. Därefter genom negativ selektion med IgE från trädpollenallergiker valdes generna vilka inte uppvisade B-cellepitoper. Slutligen valdes två allergener som uppvisade högst aktiveringsgrad hos trädpollenallergikers T-celler (Wallner *et al.* 2007). Dessa allergener introducerades sedan i möss varvid en Th1-respons kunde observeras varvid vildtypen av allergenet gav en Th2-respons (Wallner *et al.* 2007).

Hybridmolekyler med endast T-cellepitoper och inga B-cellepitoper har dessutom visat sig kunna inducera ett starkare immunsvaret än vad dess ingående komponenter kan ge ensamma (Linhart *et al.* 2008). I denna studie användes dock olika gräsallergen vilka i sin naturliga form stimulerar immunförsvaret relativt svagt.

### **B-cellepitoper kan inducera skifte från Th2- till Th1-respons**

Eftersom B-cellen har samma specificitet som de antikroppar de utsöndrar, kan den epitop IgE binder kallas för B-cellepitop. Studier av ett av de ansvariga allergenerna hos timotej (*Phl p 5*) visade enstaka B-cellepitoper med 10 aminosyror långa peptider genom fag-display, en teknik där bakteriofager används som genbibliotek som dessutom uttrycker de ytproteiner vars gener de innehåller och vilka därmed kan selekteras (Hantusch *et al.* 2004). Hela fagproteinet med den introducerade B-cellsepitopen är därmed en hybridmolekyl. Möss immuniserades med de tre selekterade hybridmolekylerna och vildtypen av fagproteinet varvid endast två hybridmolekyler gav immunrespons (Hantusch *et al.* 2004). Detta betyder att ett specifikt immunsvaret för B-cellsepitopen kan induceras.

Wallman *et al.* (2009) visade sedan genom utformningen av ett DNA-vaccin med en av de immunostimulerande hybridmolekylerna (BCEh) att B-cellepitopen kan inducera ett skifte från Th2 till Th1. Vaccinet designades för uttryck i däggdjur i fyra varianter med: BCEh, BCEh med tetanustoxin (tetanustoxin inducerar en Th1-respons), en variant med hela *Phl p 5*-genen samt en kontrollplasmid. Introduktion skedde i möss genom injektion i huden eller genom partikelbombning (plasmider fästs till guldpartiklar och beskjuts med tryckluft in i

hudceller) (Wallman *et al.* 2009). Endast vektorn med hela *Phl p 5*-genen resulterade i IFN- $\gamma$  uttryck hos immunceller i mjälten vilket visar att BCEh inte kan aktivera T-celler. Vaccin introducerat genom partikelbombning i huden gav låga nivåer av IgG2a och höga nivåer IgG1 där BCEh vektorn introducerats, vilket visar på en dominerande Th2-respons. Däremot när vaccinet injicerats i huden är IgG1 och IgG2a-nivåer låga och relativt lika med BCEh-vektorerna, dock lite lägre nivå IgG1 hos BCEh och tetanus vektorn (Wallman *et al.* 2009). Detta visar att endast B-celler och inte T-celler kan känna igen BCEh samt att injektion av vaccin med denna B-cellepitop i huden ger lägre Th2-respons än partikelbomb-metoden.

## Diskussion

Trots att specifik immunoterapi är en mycket gammal behandlingsmetod, finns fortfarande många obesvarade frågetecken kring hur detta faktiskt fungerar. Eftersom SIT bygger på att introducera allergenet i stora doser förefaller det så att dosen av antigen påverkar immunsvaret på ett sätt som lindrar allergin, antingen genom att dämpa Th2 eller att påverka uppkomsten av Th1. Studier tyder både på att Th2-responen inhiberas genom IL-10-produktion hos T-reglerande celler (Wang *et al.* 2010) men även att den allergitypiska Th2-responen övergår till en Th1-respons (Savolainen *et al.* 2004).

För att undvika reaktivitet med IgE under SIT har administration av omalizumab presenterats i syfte att reducera IgE-nivåerna (Massanari *et al.* 2010). Trots att B-cellerna vid denna sorts behandling obehindrat kan producera IgE har omalizumab både visat på lindring av IgE-associerade symptom (Massanari *et al.* 2010) och även påverkat antikroppsklassen producerad av B-cellerna oberoende av SIT (Belloni *et al.* 2007). Hur detta omalizumab-inducerade skifte fungerar är okänt men spekulationer om att IgE har en reglerande funktion har framförts.

När en Th1-respons önskas är en kraftig respons är att föredra eftersom det resulterar i höga nivåer av IgE-konkurrerande IgG (Linhart *et al.* 2008). Detta uppnås bland annat genom exkludering av allergenets B-cellepitoper eller presentation av endast T-cellepitoper hos allergen, vilket resulterar i ett immunsvår från endast T-celler. Modifiering av antigenet bygger i det läget på att öka dess immunogenicitet. När sedan det kompletta antigenet påträffas dominerar Th1 trots att B-cellepitoper presenteras, IgE kan fortfarande produceras men blir utkonkurrerad av IgG om bindning till allergenet (Linhart *et al.* 2008).

Dock har det visat sig att B-celler kräver någon form av T-cellaktivering för att tillåta aktivering (Schöll *et al.* 2002). När B-cellepitop kopplat till fagprotein resulterat i B-cellimmunsvar är det troligt att fagproteinet medfört T-cellaktivering. Ifall endast en B-cellepitop introduceras bör således även en T-cellepitop inkluderas för att möjliggöra ett immunsvår (Schöll *et al.* 2002).

DNA-vaccin har relativt nyligen börjat användas som en ny möjlighet för att behandla allergier. Allergiker skulle kunna behandlas med ett modifierat allergen för att undvika sidoeffekter men samtidigt tillåta att en Th1-respons bildas. Hos icke-allergiker kan ett skydd skapas mot allergier i form av lymfocyt-minnesceller av Th1-typ. Den senaste varianten av profylaktisk allergibehandling är RNA-vaccinering vilket erbjuder högre säkerhet mot

oväntade risker vilka kan uppstå med DNA-vektorn men dock är immunsvaret vid RNA-vaccinering relativt lågt (Roesler *et al.* 2009). Om RNA-vaccinering vinner genomslag i profylaktisk behandling får framtidens allergiforskning utvisa.

Benägenheten att utveckla allergier tros vara ärftlig eftersom allergiker ofta har en släkthistoria med allergier. Vilken ärftlig komponent som leder till allergier utreds fortfarande. Två olika MHC II-varianter är kopplade till den autoimmuna sjukdomen typ I diabetes varav en av dessa MHC II-varianter även är kopplad till celiaki (Smyth *et al.* 2008). Dessa molekyler har därför utretts men fortfarande finns inga bevis för att dessa MHC II-varianter orsakar även typ I allergier. Ifall den genetiska kopplingen upptäcks kommer troligtvis nya typer av behandlingsmetoder utvecklas.

## **Tack**

Hjärtliga tack främst till Lage Cerenius för god handledning och personlig rådgivning under arbetets gång men även till Katariina Kiviniemi för vägledande föreläsningar. Tack även till Annica Löfling, Simon Ceder och Tove Bäckström för återkoppling under arbetets gång.

## Referenser

- Abbas A K, Lichtman A H, Pillai S. 2007. Cellular and Molecular Immunology. 6:e uppl. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Belloni B, Andres C, Ollert M, Ring J, Mempel M. 2008. Novel immunological approaches in the treatment of atopic eczema. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **8**:423–427.
- Belloni B, Ziai M, Lim A, Lemercier B, Sbornik M, Weidinger S, Andres C, Schnopp C, Ring J, Hein R, Ollert M, Mempel M. 2007. Low-dose anti-IgE therapy in patients with atopic eczema with high serum IgE levels. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**: 1223-1225.
- Bublin M, Hoflehner E, Wagner B, Radauer C, Wagner S, Hufnagl K, Allwardt D, Kundi M, Scheiner O, Wiedermann U, Breiteneder H. 2007. Use of a genetic cholera toxin B subunit/allergen fusion molecule as mucosal delivery system with immunosuppressive activity against Th2 immune responses. *Vaccine* **25**: 8395-8404.
- Carballido J M, Carballido-Perrig N, Kagi M K, Meloen R H, Wiithrich B, Heuser C H, Blaser K. 1993. T cell epitope specificity in human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2. *The Journal of Immunology*.**150**: 3582-3591.
- Else K J, Finkelman F D, Maliszewski C R, Grecis R K. 1994. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine* **179**: 347-351.
- Foliaki S, Kildegaard Nielsen S, Björkstén B, von Mutius E, Cheng S, Pearce N. 2004. Antibiotic sales and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *International Journal of Epidemiology* **33**: 558–563.
- Frew A. 2010. Allergen immunotherapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: 306 –313.
- Hamid QA, Schotman E, Jacobson MR, Walker SM, Durham SR. 1997. Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **99**: 254-260.
- Hammelman E, Rolinck-Weringhaus C, Wahn U. 2003. Is there a role for anti-IgE in combination with specific allergen immunotherapy? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **3**: 501-510.
- Hantusch B, Krieger S, Untersmayr E, Schöll I, Knittelfelder R, Flicker S, Spitzauer S, Valenta R, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. 2004. Mapping of

- conformational IgE epitopes on *Phl p 5a* by using mimotopes from a phage display library. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**: 1294-1300.
- Linhart B, Mothes-Luksch N, Vrtala S, Kneidinger M, Valent P, Valenta R. 2008. A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, *Phl p 2* and *Phl p 6*. *Biological Chemistry* **389**: 925-933.
- Linhart B, Valenta R. 2005. Molecular design of allergy vaccines. *Current Opinion in Immunology* **17**: 646–655.
- Mainzel R, Yazdanbakhsh M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology* **3**: 733-744.
- Marsh D G, Lichtenstein L M, Campbell D H. 1970. Studies on 'allergoids' prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* **18**: 705-722.
- Massanari M, Nelson H, Casale T, Busse W, Kianifard F, Geba GP, Zeldin RK. 2010. Effect of pretreatment with omalizumab on the tolerability of specific immunotherapy in allergic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: 383 –389.
- Perovic I, Milovanovic M, Stanicz D, Burazer L, Petrovic D, Milcic-Maticz N, Gafvelink G, van Hagek M, Jankov R, Cirkovic Velickovic T. 2009. Allergenicity and immunogenicity of the major mugwort pollen allergen Art v 1 chemically modified by acetylation. *Clinical and Experimental Allergy* **39**: 435–446.
- Persson J. 2006. Värk, allergier och psykisk ohälsa allt vanligare. WWW-dokument: [http://www.scb.se/statistik/publikationer/BE0801\\_2006K04\\_TI\\_07\\_A05ST0604.pdf](http://www.scb.se/statistik/publikationer/BE0801_2006K04_TI_07_A05ST0604.pdf)  
Hämtad 2010-10-31.
- Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, Fruehwirth A, Stoecklinger A, Mostböck S, Ferreira F, Thalhamer J, Scheibelhofer S. 2009. Immunize and disappear—Safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124**: 1070-1077.
- Romagnani S. 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Current Opinion in Immunology*. **6**: 838-846.
- Samuelsen M, Nygaard UC, Løvik M. 2008. Allergy adjuvant effect of particles from wood smoke and road traffic. *Toxicology* **246**: 124–131.
- Savolainen J, Laaksonen K, Rantio-Lehtimäki A, Terho E O. 2004. Increased expression of allergen-induced *in vitro* interleukin-10 and interleukin-18 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients after specific immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy* **34**: 413-419.

- Schmidt-Weber CB, Blaser K. 2004. Immunological mechanism in specific immunotherapy. *Springer Seminars in Immunopathology* **25**: 377-390.
- Schöll I, Wiedermann U, Förster-Wlad E, Gnglberger E, Baier K, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Ebner C, Jensen-Jarolim E. 2002. Phage-displayed Bet mim 1, a mimotope of the major birch pollen allergen Bet v 1, induces B cell responses to the natural antigen using bystander T cell help. *Clinical and Experimental allergy* **32**: 1583-1588.
- Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JMH, Howson JMM, Stevens H, McManus R, Wijmenga C, Heap GA, Dubois PC, Clayton DG, Hunt KA, van Heel DA, Todd JA. 2008. Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *The New England Journal of Medicine* **359**: 2767-2777.
- Tang D, DeVit M, Johnson SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**: 152-154.
- Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart M, Niederberger V, Swoboda I, Vrtala S. 2010. From Allergen Genes to Allergy Vaccines. *Annual Review of Immunology* **28**: 211–241.
- van den Biggelaar AHJ, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. 2000. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *The Lancet* **356**: 1723-1727.
- Wallner M, Stocklinger A, Thalhamer T, Bohle B, Vogel L, Briza P, Breiteneder H, Vieths S, Hartl A, Mari A, Ebner C, Lackner P, Hammerl P, Thalhamer J, Ferreira F. 2007 Allergy multivaccines created by DNA shuffling of tree pollen allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**: 374-380.
- Wang W, Xiang L, Liu Y, Wang Y, Sheen K. 2010. Effect of house dustmite immunotherapy on interleukin-10-secreting regulatory T cells in asthmatic children. *Chinese Medical Journal* **123**: 2099-2104.
- Weiss R, Scheiblhofer S, Roesler E, Ferreira F, Thalhamer J. 2010. Prophylactic mRNA vaccination against allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **10**: 567–574.
- Wood P, Fieschi C, Picard C, Ottenhoff THM, Casanova JL, Kumararatne D S. 2005. Inherited defects in the interferon-gamma receptor or interleukin-12 signalling pathways are not sufficient to cause allergic disease in children. *European Journal of Pediatrics* **164**: 741-747.