

Mimotope und ihre Bedeutung für die Allergologie

ISABELLA SCHÖLL, GEORGE BOLTZ-NITULESCU, ERIKA JENSEN-JAROLIM

Institut für Pathophysiologie, AKH Wien, Österreich

Mimotopes and their impact on allergology

Schlüsselwörter

Mimotope – Allergie – Therapie – Bakteriophagen – Biopanning – Peptid-Display

Key words

Mimotopes – allergy – therapy – bacteriophage – biopanning – peptide-display

Zusammenfassung

Hintergrund: Antiallergen- und Anti-IgE-Antikörper können die allergische Symptomatik inhibieren oder verstärken. Diese Effekte sind von der Epitopspezifität abhängig.

Methodik: Rekombinante Phagen-Display-Peptid-Bibliotheken enthalten Hunderte Millionen von Zufallspeptiden. Mit der Biopanning-Technik werden durch Antikörper daraus Peptide selektiert, die das natürliche Epitop nachahmen und daher Mimotope genannt werden. Vergleiche der Mimotope mit dem natürlichen Antigen (Allergen) erlauben die Lokalisation des Epitops und ge-

ben somit Aufschluss über antigene Strukturen. Mimotope können des Weiteren für Immunisierungen zur Induktion einer aktiven epitopspezifischen Immunantwort herangezogen werden.

Schlussfolgerung: Die Ambivalenz der natürlichen IgG-Antikörper (Blockierung oder Verstärkung der allergischen Reaktionen), welche bei der spezifischen Immuntherapie induziert werden, erfordert den Zuschnitt der Impfstoffe für Typ-I-Allergien auf epitopspezifische Vakzinen. Mimotope sind geeignete Kandidaten für die Realisierung dieses epitopspezifischen Impfkonzpts.

Summary

Background: Anti-allergen and anti-IgE antibodies may enhance or inhibit allergic reactions. These effects do critically depend on their epitope specificity.

Methods: Recombinant phage-display peptide libraries contain hundreds of millions of random peptides. Biopanning is a procedure suitable to select specifically binding peptides from these libraries, which mimic the natural antigen and, therefore, are called mimotopes. Alignments of the mimotopes with the three-dimensional structure of the antigen or allergen allow to localize the epitope

and give remarkable insights into antigenic and allergenic determinants. Moreover, mimotopes may be applied therapeutically for the precise induction of epitope-specific antibody responses.

Conclusion: Natural IgG antibodies induced through hyposensitization therapy harbor diverse biological effects (inhibiting or enhancing allergic responses). Therefore, vaccines applied for the treatment of type I allergy should be tailored in an epitope-specific way. Mimotopes are suitable candidates for realizing this concept of epitope-specific immunotherapy.

Einleitung

Die Bindungsstelle eines Antikörpers an einem Allergen, das Epitop, ist eine dreidimensionale oberflächliche Molekülstruktur. Wenn das Epitop

aus diskontinuierlichen Abschnitten der Proteinkette gebildet wird, ist es praktisch unmöglich, ein komplettes B-Zell-Epitop isoliert rekombinant zu exprimieren. Durch den Einsatz linearer Peptide konnten bereits wertvolle Hinweise zu B-Zell-Epitopen erlangt werden [12, 34, 40, 41, 45, 46]. Genauere Auskunft über Epitope gibt die Kristallisation [6, 11, 26, 43] oder Kokristallisation [28, 36] von Allergen und Antikörper; allerdings sind dazu ultrareine Ausgangssubstanzen erforderlich, und manche Moleküle lassen sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften nicht kristallisieren. Die

Korrespondenzanschrift/Correspondence to

Prof. Dr. Erika Jensen-Jarolim
Institut für Pathophysiologie
AKH Wien, Ebene 3Q
Währinger Gürtel 18–20
1090 Wien
Österreich
E-Mail: erika.jensen-jarolim@akh-wien.ac.at

Eingang/Reviewed

26. Februar 2003

Annahme/Accepted

4. August 2003

vielleicht wichtigste Erkenntnis aus kristallographischen Studien von Antigen-Antikörper-Komplexen war, dass die Erkennung eines Antigens auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien beruht (z. B. Anziehung durch unterschiedliche Ladungen, Hydrophobizität etc.) und nicht von einem Muster aus bestimmten Aminosäuren abhängt [31]. Das bedeutet, dass strukturelle Oberflächeneigenschaften für die Komplementarität zwischen Paratop am Immunglobulin und Epitop auf dem Antigen/Allergen den Ausschlag geben. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde 1986 von Geyzen et al. der Begriff Mimotope eingeführt [16]. Dabei handelt es sich um Moleküle, die fähig sind, an die antigenbindende Stelle eines Antikörpers zu binden. Sie sind nicht notwendigerweise identisch mit dem Epitop, welches den Antikörper induziert, ahmen aber in akzeptabler Weise die essenziellen Eigenschaften des Epitops nach.

Mimotopeselektionierung aus Phagenbanken mittels Biopannings

Die Mimotopetechnologie basiert auf dem Prinzip der Ähnlichkeiten (griechisch $\mu\mu\sigma\sigma$ – die Ähnlichkeit) und stellt heute eine wichtige komplementäre Technik zur Erforschung molekularer Interaktionen dar [27]. Sie basiert auf der Verwendung von Peptid-Display-Systemen, zumeist Bakteriophagenbibliotheken, die ein sehr großes Repertoire rekombinanter Zufallspeptide als Fusionsproteine mit ihren Oberflächenproteinen, insbesondere pIII [10] oder pVIII [10, 30, 35], exprimieren (Abb. 1). Die Peptide können linear sein oder durch Disulfidbrücken flankierender Cysteine in eine zirkuläre Form gebracht werden. Aus dieser Vielfalt von Peptiden können in sog. Biopannings die zum Antikörper komplementären Peptide gefischt und angereichert werden (Abb. 2). Durch Inhibitionsstudien unter Anwesenheit des Antigens oder Allergens wird kontrolliert, ob diese Peptide tatsächlich das natürliche Epitop nachahmen und daher die Kriterien für ein Mimotop erfüllen (Abb. 3). Nach diesen Überprüfungsschritten werden geeignete Phagenklone ausgewählt und deren exprimierte Peptide über DNA-Sequenzierung charakterisiert. Mimotope können dann für direkte Vergleiche mit der linearen Sequenz oder der Struktur des Allergens herangezogen werden, oder sie dienen zu Immunisierungen.

Allergologische Analyse von IgE- und IgG-Epitopen mit Hilfe von Mimotopen

Die Mimotopetechnologie hat in den letzten Jahren in der Allergologie hauptsächlich zur Charakterisierung von B-Zell-Epitopen auf den wichtigsten Allergenen Eingang gefunden.

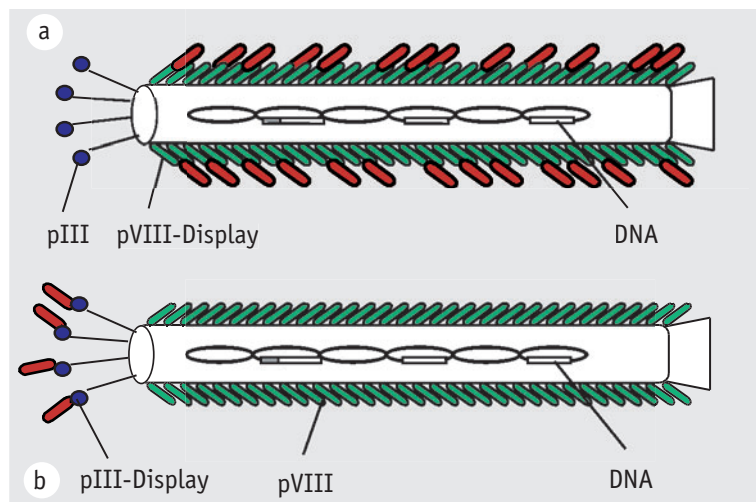


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines filamentösen Bakteriophagenpartikels. Die rekombinanten Peptide werden als Fusionsproteine (rote Symbole) mit den Oberflächenproteinen des Phagen exprimiert. a: Expression mit pVIII (~ 1.000 Kopien pro Phage); b: Expression mit pIII (3–5 Kopien pro Phage).

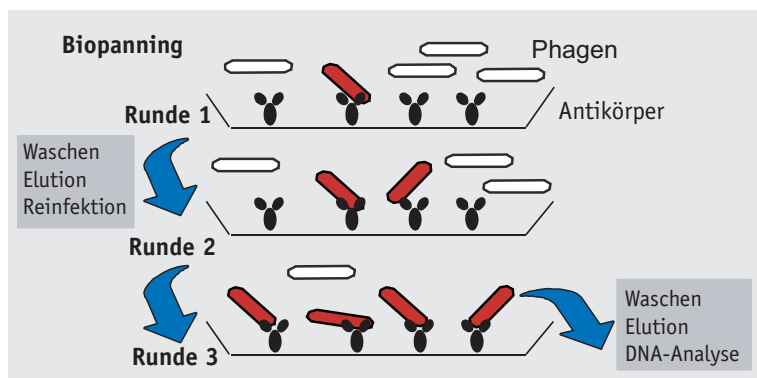


Abbildung 2. Flussdiagramm für das Screening einer Phagenbibliothek mit einem Antikörper zur Selektion von Mimotopen (Biopanning). Die immobilisierten Antikörper binden aus einer Zufallsbibliothek nur jene Phagen, welche ein passendes Peptid exprimieren (rot). Die restlichen Phagen (weiß) werden nicht gebunden und im Anschluss gewaschen. Dann folgt ein Elutionsschritt der gebundenen Phagen, welche in ihrem Bakterienwirt vermehrt werden können und dann für eine neue Runde der Selektion zur Verfügung stehen. Im Rahmen des Biopanning führt man mehrere (3–4) solcher Runden durch und erzielt damit Selektion und Amplifikation der passenden Peptidliganden.

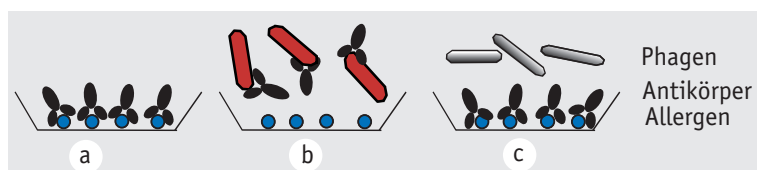


Abbildung 3. Überprüfung der Mimikry des Phagenpeptids in einem Inhibitionsansatz mit dem natürlichen Epitop. a: IgE bindet spezifisch an sein Allergen. b: Vorinkubation mit passenden Mimotop-Phagen inhibiert IgE-Allergen-Interaktion. c: Nicht relevante Kontrollphagen können die Bindung nicht inhibieren.

Das kreuzreaktive Profilin ist in Tier- und Pflanzenspezies durch seine Bedeutung als Zytoskelettprotein hochkonserviert und wurde deshalb auch als Panallergen definiert [42]. Es lag nahe, die Kreuzreaktivität unterschiedlicher Profiline auf molekularer Ebene zu studieren. Da in Biopannings sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet werden können, war es hier möglich, Serum-IgE von Patienten mit Birken-Beifuß-Sellerie-Syndrom durch Affinitätschromatographie zu isolieren und für die Selektion der Mimotope einzusetzen. Die gereinigte IgE-Fraktion enthielt IgE-Antikörper, die mit Sellerie-, Beifußpollen- und Birkenpollenprofilinen kreuzreagierten [25]. Die damit isolierten Mimotope zeigten die Sequenz CAISGGYPVC (1,10-cyclo) und waren in der Lage, die Bindung von polyklonalem humanem IgE an Profiline aus unterschiedlichen Allergenquellen zu inhibieren. Sie repräsentierten damit ein wichtiges kreuzreaktives Epitop dieses Panallergens. Allerdings gelang es nicht, das Epitop durch Vergleiche mit der Kristallstruktur von Birkenprofilin [9] zu lokalisieren.

Ein weiteres Allergen, zu dessen Charakterisierung die Phagen-Display-Technik eingesetzt wurde, ist Der p 1, das Hauptallergen der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) [13]. In dieser Studie wurde der murine monoklonale Antikörper 2C7 verwendet, der an dasselbe konformationelle Der-p-1-Epitop bindet wie der Großteil von humanem Serum-IgE. Mimotope wurden in diesem Fall aus einer linearen 15mer- und einer zirkulären 9mer-Phagenbibliothek isoliert. Die gefundenen Sequenzen mit dem gemeinsamen Motiv DXXXR/KXXGR korrespondierten mit der β -Faltblatt-Region zwischen Leu147 und Gln160 (linearer Teil des konformationellen Epitops) der Kristallstruktur von Der p 1.

Es war auch bereits möglich, von verschiedenen Gras- und Roggenpollen ein 12mer-Mimotop (SAHGTSTGVRGP) zu identifizieren, das eine Bindung von humanem IgE sowie einem monoklonalen Antikörper gegen Roggenpollen an das native Allergen verhindern konnte [39].

Das Panning von gereinigtem, polyklonalem birkenpollenspezifischem humanem IgE erbrachte sechs verschiedene Sequenzen, von denen vier zyklische Peptide darstellten [15]. Diese verschiedenen Sequenzen wurden für die Lokalisierung der entsprechenden B-Zell-Epitope auf der Bet-v-1-Oberfläche mit Hilfe einer computergestützten dreidimensionalen Epitopsuche herangezogen. Zuerst wurden die C β -Atome der Aminosäuren von Bet v 1 sowie der Mimotope für Distanzrechnungen in einem Koordinatensystem aufgetragen. In einem zweiten Schritt erfolgte ein Ver-

gleich des chemischen Charakters der Aminosäuren von Allergen und Mimotopen. Diese Analyse identifizierte das Epitop als diskontinuierlich, d. h. aus unabhängigen Abschnitten der Molekülkette zusammengesetzt.

Epitopspezifische Hyposensibilisierung

Die einzige kausale Therapieform für Typ-I-Allergien ist die Hyposensibilisierung, die sich seit ihrer Einführung durch Noon 1911 [29] nur unwesentlich verändert hat. Dabei werden wässrige Extrakte aus den Allergenquellen (Hausstaubmilbenkulturen, Pollen aus Pollenfarmen, Tierhaarpulver etc.) gewonnen und in steigender Dosis dem Patienten verabreicht [4]. Schon früh hat man den „Vakzinierungscharakter“ der spezifischen Immuntherapie (SIT) erkannt [1]. Immunologisch beobachtet man die Induktion zellulärer und humoraler Reaktionen gegen das geimpfte Antigen.

Bei der SIT wurden dramatische Anstiege von allergenspezifischen IgG-Antikörpern beobachtet. Enttäuschend war jedoch die Tatsache, dass diese Anstiege sowohl bei Patienten mit als auch solchen ohne Therapieerfolg auftraten [17]. Neuere Arbeiten [23, 24, 44] haben diesbezüglich Aufklärung geliefert: Je nachdem, ob IgG gegen das eine oder andere Epitop eines Allergens gerichtet ist, kann es als blockierender oder anaphylaktogener Antikörper wirken. Messungen des gesamten Antiallergen-IgG beinhalten daher neben IgG-Antikörpern, die als blockierende Antikörper fungieren und eine allergenspezifische Histaminfreisetzung verhindern, auch eine anaphylaktogene Fraktion von IgG-Antikörpern, die das Allergenmolekül vermutlich auffalten, so dass es eine höhere Kapazität für IgE-Bindung erhält. Fast paradoxerweise können daher im Rahmen einer SIT mit Allergenextrakten oder -molekülen auch unerwünschte, anaphylaktogene IgG-Antikörper induziert werden, eine Erklärung für das nicht immer günstige Therapieresultat. Im Umkehrschluss sollte daher ein optimaler SIT-Impfstoff nur aus Epitopen bestehen, die gezielt die „guten“, blockierenden Antikörper erzeugen. Auf dieser Erkenntnis basiert das Konzept der epitopspezifischen Immuntherapie.

Antigenität von Mimotopen

Phagenexprimierte Mimotope sind in die hydrophobe Virionenoberfläche eingebettet, wodurch ihre Konformation stabilisiert ist. Phagenmimotope sind daher korrekt gefaltet und können experimentell für Immunisierungen verwendet werden. Für die Anwendung am Patienten sollten jedoch synthetische oder rekombinante Derivate herangezogen werden. NMR-Untersuchungen

haben aber gezeigt, dass synthetisch hergestellte Mimotope in Lösung konformationell nicht stabil sind [19]. Für das Vakzinedesign ist daher wichtig, dass ein geeigneter immunogener Träger oder Fusionspartner für die Mimotoppeptide gewählt wird, der auch beim Menschen Anwendung finden kann.

Obwohl alle unten genannten Beispiele für Mimotope ausschließlich B-Zell-Epitope darstellen, sind sie zur Induktion einer spezifischen Immunantwort fähig, an der auch T-Zellen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang ist der Träger wieder von großer Bedeutung, da er Bystander-T-Zellen rekrutiert, um eine spezifische affine Antikörper-Immunantwort bei Anwendung reiner B-Zell-Epitope für die Immunisierung zu induzieren [33].

Konzept der Allergen-Mimotop-Vakzine

Zur Untersuchung von Wirkungsmechanismen der Hyposensibilisierung eignet sich die Birkenpollenallergie als Modell besonders gut. Hier ist ein einziges Molekül, Bet v 1, als Hauptallergen relevant für die IgE-Bindung von mehr als 90% der Patienten, und etwa 60% sind sogar ausschließlich gegen Bet v 1 sensibilisiert. Vor der Immuntherapie zeigt sich serologisch praktisch kein Bet-v-1-spezifisches IgG [18], während der SIT werden jedoch signifikant spezifische IgG-Antikörper induziert [3]. Zur Überprüfung, ob epitopspezifische Immunisierungen Anti-Bet-v-1-IgG induzieren können, wurden Mimotope aus einer 9mer-Bibliothek herangezogen, die mit Hilfe des monoklonalen Anti-Bet-v-1-Antikörpers BIP1 identifiziert worden waren. Das dominante Mimotop hatte die Sequenz CFPYCYPSESA (1,5-cyclo) und konnte bei Immunisierungen von BALB/c-Mäusen auch tatsächlich eine Bet-v-1-spezifische IgG-Antwort erzielen [19]. Der Selektionsantikörper BIP1 war schon als so genannter anaphylaktogener Antikörper bekannt, da er die Bindung von humanem IgE an das Allergen Bet v 1 im Immunoblot verstärken konnte [23, 24]. In der Tat ergaben Immunisierungen mit dem BIP1-Mimotop IgG-Antikörper, die auch allergische Reaktionen in einem Mausmodell verstärkten [20]. Auch humane allergenspezifische IgG-Antikörper können ähnlich ungünstig wirken [7]. Umgekehrt sollten daher Mimotope für allergenspezifisches IgE gezielt blockierende IgG-Antikörper erzeugen.

In Immunisierungen mit dem Bet-v-1-Mimotop CQQTLSVRALC gelang an Mäusen der Nachweis, dass induzierte IgG-Antikörper erfolgreich die Interaktion von IgE und Allergen verhindern. In diesen Versuchen wurden phagenexprimierte Peptide appliziert, was im Menschen nicht möglich wäre: Bakteriophagen sind endotoxinkontaminiert und können möglicherweise die

Bakterienflora des Empfängers infizieren. Außerdem sind an pVIII bis zu 1.000 Kopien des Mimotops exprimiert. Dies stellt besonders im Fall von IgE-Mimotopen ein potenzielles Risiko für die IgE-Kreuzvernetzung dar. Auf der Suche nach einem monovalenten Träger schien albuminbindendes Protein (ABP) aus Streptokokken [2] ein idealer Kandidat zu sein. Ein monovalentes Fusionsprotein aus Mimotop CQQTLSVRALC mit ABP induzierte blockierende IgG-Antikörper [14], im Hauttest zeigten sich jedoch keine positiven Reaktionen auf dieses Fusionsprotein. Das bedeutet, dass Mimotope keine Kreuzvernetzung von IgE und damit keine allergische Reaktion auslösen können, wenn sie monovalent appliziert werden.

Konzept der Anti-IgE-Mimotop-Vakzine

Für humane Autoantikörper gegen IgE gilt ebenfalls, dass sie abhängig von ihrer Epitopspezifität anaphylaktogen oder blockierend wirken können [37]. Auch hier wurde dieses Prinzip durch Studien mit murinen monoklonalen Antikörpern erkannt. Als eine Art passive Immuntherapie können dem Patienten Anti-IgE-Antikörper appliziert werden [5, 8]. Diese binden an die konstante Region von IgE, interferieren mit der Bindung von IgE an den FcεRI-Rezeptor und hemmen allergische Reaktionen. Allerdings sind dazu hohe Konzentrationen von Anti-IgE-Antikörpern erforderlich, welche nur durch wiederholte Verabreichung erhalten werden können. Auch hier stellt die aktive epitopspezifische Vakzinierung eine gute Alternative dar [38]. Der besondere Vorteil liegt darin, dass natürliche Anti-IgE-Antikörper induziert und andauernd aktiv nachgebildet werden. Sowohl Mimotope [32] als auch anti-idiotypische Fab-Fragmente [38], die ebenfalls das Epitop imitieren, wurden für den blockierenden murinen monoklonalen Anti-IgE-Antikörper BSW17 [21] generiert und erbrachten im Tiermodell bereits die gewünschte Anti-IgE-Antikörper-Antwort [22, 32].

Schlussfolgerung

Das Auffinden von Mimotopen durch die Anwendung von Zufalls-Peptid-Phagenbibliotheken hat deutlich zum Verständnis von strukturellen Motiven und Epitopen an Allergenen beigetragen. Die bisher mit Hilfe dieser Technik identifizierten IgE- und IgG-Epitope an Allergenen entsprechen durchwegs diskontinuierlichen Konformationsepitopen und hätten mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden nicht dargestellt werden können.

Viel wichtiger noch stellen diese Mimotope Kandidaten für aktive Immunisierungen zur ge-

zielten Induktion einer epitopspezifischen Antikörperantwort dar und sind somit ein weiterer wichtiger Entwicklungsschritt in der Optimierung der SIT der Soforttypallergie.

Literatur

1. Aalberse RC, Gaag R van der, Leeuwen J van. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 1983; 130: 722–6
2. Baumann S, Grob P, Stuart F, Pertlik D, Ackermann M, Suter M. Indirect immobilization of recombinant proteins to a solid phase using the albumin binding domain of streptococcal protein G and immobilized albumin. *J Immunol Methods* 1998; 221: 95–106
3. Birkner T, Rumpold H, Jarolim E, Ebner H, Breitenbach M, Skvaril F, Scheiner O, Kraft D. Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy* 1990; 45: 418–26
4. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 558–62
5. Corne J, Djukanovic R, Thomas L, Warner J, Botta L, Grandordy B, Gygax D, Heusser C, Patalano F, Richardson W, Kilchherr E, Staehelin T, Davis F, Gordon W, Sun L, Liou R, Wang G, Chang TW, Holgate S. The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *J Clin Invest* 1997; 99: 879–87
6. Derewenda U, Li J, Derewenda Z, Dauter Z, Mueller GA, Rule GS, Benjamin DC. The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. *J Mol Biol* 2002; 318: 189–97
7. Eibensteiner P, Denepoux S, Steinberger P, Kraft D, Visco V, Banchereau J, Lebecque S, Valenta R. Expression of a human IgG4 antibody, BAB2, with specificity for the major birch pollen allergen, Bet v 1 in *Escherichia coli*: recombinant BAB2 Fabs enhance the allergic reaction. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 190–2
8. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J, Fick RB Jr, Boushey HA. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1828–34.
9. Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 1997; 5: 33–45
10. Felici F, Luzzago A, Folgori A, Cortese R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene* 1993; 128: 21–7
11. Fluckiger S, Mittl PR, Scapozza L, Fijten H, Folkers G, Grutter MG, Blaser K, Cramer R. Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. *J Immunol* 2002; 168: 1267–72
12. Focke M, Mahler V, Ball T, Sperr WR, Majlesi Y, Valent P, Kraft D, Valenta R. Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB J* 2001; 15: 2042–4

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Fond für wissenschaftliche Förderung (FWF), Sonderforschungsbereich SFB F018, Projekt #8, unterstützt.

13. Furmonaviciene R, Tighe PJ, Clark MR, Sewell HF, Shakib F. The use of phage-peptide libraries to define the epitope specificity of a mouse monoclonal anti-Der p 1 antibody representative of a major component of the human immunoglobulin E anti-Der p 1 response. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1563–71
14. Ganglberger E, Barbara S, Scholl I, Wiedermann U, Baumann S, Hafner C, Breiteneder H, Suter M, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Monovalent fusion proteins of IgE mimotopes are safe for therapy of type I allergy. *FASEB J* 2001; 15: 2524–6
15. Ganglberger E, Grunberger K, Sponer B, Radauer C, Breiteneder H, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Allergen mimotopes for 3-dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE. *FASEB J* 2000; 14: 2177–84
16. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 1986; 23: 709–15
17. Jarolim E, Poulsen LK, Stadler BM, Mosbech H, Oesterballe O, Kraft D, Weeke B. A long-term follow-up study of hyposensitization with immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 996–1004
18. Jarolim E, Rumpold H, Endler AT, Ebner H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D. IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 1989; 44: 385–95
19. Jensen-Jarolim E, Leitner A, Kalchhauser H, Zurcher A, Ganglberger E, Bohle B, Scheiner O, Boltz-Nitulescu G, Breiteneder H. Peptide mimotopes displayed by phage inhibit antibody binding to Bet v 1, the major birch pollen allergen, and induce specific IgG response in mice. *FASEB J* 1998; 12: 1635–42
20. Jensen-Jarolim E, Wiedermann U, Ganglberger E, Zurcher A, Stadler BM, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Breiteneder H. Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB J* 1999; 13: 1586–92
21. Knutti-Muller JM, Stadler BM, Magnusson CM, Weck L de. Human IgE synthesis in vitro. Detection with monoclonal antibodies. *Allergy* 1986; 41: 457–67
22. Kricek F, Ruf C, Rudolf MP, Effenberger F, Mayer P, Stadler BM. IgE-related peptide mimotopes. Basic structures for anti-allergy vaccine development. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 222–3
23. Laffer S, Vangelista L, Steinberger P, Kraft D, Pastore A, Valenta R. Molecular characterization of Bip 1, a monoclonal antibody that modulates IgE binding to birch pollen allergen, Bet v 1. *J Immunol* 1996; 157: 4953–62
24. Lebecque S, Dolecek C, Laffer S, Visco V, Denepoux S, Pin JJ, Guret C, Boltz-Nitulescu G, Weyer A, Valenta R. Immunologic characterization of monoclonal antibodies that modulate human IgE binding to the major birch pollen allergen Bet v 1. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 374–84
25. Leitner A, Vogel M, Radauer C, Breiteneder H, Stadler BM, Scheiner O, Kraft D, Jensen-Jarolim E. A mimotope defined by phage display inhibits IgE binding to the plant panallergen profilin. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2921–7

26. Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure Fold Des* 2000; 8: 1025–35
27. Meloen RH, Puijk WC, Slootstra JW. Mimotopes: realization of an unlikely concept. *J Mol Recognit* 2000; 13: 352–9
28. Mirza O, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Wissenbach M, Spangfort MD, Gajhede M. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol* 2000; 165: 331–8
29. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; i: 1572–3
30. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988; 73: 305–18
31. Regenmortel MH van, Altschuh D, Klug A. Influence of local structure on the location of antigenic determinants in tobacco mosaic virus protein. *Ciba Found Symp* 1986; 119: 76–92
32. Rudolf MP, Zuercher AW, Nechansky A, Ruf C, Vogel M, Miescher SM, Stadler BM, Kricek F. Molecular basis for nonanaphylactogenicity of a monoclonal anti-IgE antibody. *J Immunol* 2000; 165: 813–9
33. Scholl I, Wiedermann U, Forster-Waldl E, Ganglberger E, Baier K, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Ebner C, Jensen-Jarolim E. 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. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1583–8
34. Schramm G, Bufe A, Petersen A, Haas H, Merget R, Schlaak M, Becker WM. Discontinuous IgE-binding epitopes contain multiple continuous epitope regions: results of an epitope mapping on recombinant Hol I 5, a major allergen from velvet grass pollen. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 331–41
35. Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993; 217: 228–57
36. Spangfort MD, Larsen JN, Gajhede M. Crystallization and preliminary X-ray investigation at 2.0 Å resolution of Bet v 1, a birch pollen protein causing IgE-mediated allergy. *Proteins* 1996; 26: 358–60
37. Stadler BM, Stampfli MR, Miescher S, Furukawa K, Vogel M. Biological activities of anti-IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102: 121–6
38. Stadler BM, Zurcher AW, Miescher S, Kricek F, Vogel M. Mimotope and anti-idiotypic vaccines to induce an anti-IgE response. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 119–21
39. Suphioglu C, Schappi G, Kenrick J, Levy D, Davies JM, O'Hehir RE. A novel grass pollen allergen mimotope identified by phage display peptide library inhibits allergen-human IgE antibody interaction. *FEBS Lett* 2001; 502: 46–52
40. Tamura Y, Kawaguchi J, Serizawa N, Hirahara K, Shiraishi A, Nigi H, Taniguchi Y, Toda M, Inouye S, Takemori T, Sakaguchi M. Analysis of sequential immunoglobulin E-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in humans, monkeys and mice. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 211–7
41. Tamura Y, Sasaki R, Inouye S, Kawaguchi J, Serizawa N, Toda M, Takemori T, Sakaguchi M. Identification of a sequential B-cell epitope on major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 228–35
42. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE auto-reactivity in sensitized individuals. *Science* 1991; 253: 557–60.
43. Verdino P, Westritschnig K, Valenta R, Keller W. The cross-reactive calcium-binding pollen allergen, Phl p 7, reveals a novel dimer assembly. *EMBO J* 2002; 21: 5007–16
44. Visco V, Dolecek C, Denepoux S, Le Mao J, Guret C, Rousset F, Guinneeain MT, Kraft D, Valenta R, Weyer A, Banchereau J, Labecque S. Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *J Immunol* 1996; 157: 956–62
45. Williams SC, Badley RA, Davis PJ, Puijk WC, Meloen RH. Identification of epitopes within beta lactoglobulin recognised by polyclonal antibodies using phage display and PEPS-CAN. *J Immunol Methods* 1998; 213: 1–17
46. Wu CH, Lee MF, Yang JS, Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach *Per a 1* allergen. *Mol Immunol* 2002; 39: 459–64