

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul III – Științe Funcționale**

BUZAN MARIA-ROXANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**PROFILELE DE SENSIBILIZARE IGE ÎN ALERGIA LA POLENUL
DE AMBROZIA ȘI RELEVANȚA CLINICĂ A ALEGENELOR
RECOMBinate AMB A 1 ȘI AMB A 8**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. PANAITESCU CARMEN

Timișoara

2024

REZUMAT

PARTEA GENERALĂ

Alergia reprezintă o reacție exagerată a sistemului imun la stimuli exogeni inofensivi și implică diverse tipuri de reacții de hipersensibilitate, care pot duce la apariția simptomelor respiratorii, cutanate, gastrointestinale, oculare sau alte manifestări, inclusiv anafilaxie. Reacția de hipersensibilitate de tip I, numită și răspuns imun imediat, este un răspuns imunologic anormal cauzat de o substanță inofensivă din mediu, denumită alergen, și este mediată de anticorpii IgE.

În prezent, există o creștere constantă a prevalenței alergiilor, atribuită modificărilor în stilul de viață (în special cel occidental), a obiceiurilor alimentare și mediului, inclusiv schimbărilor climatice. La nivel mondial, 8-10% din populație suferă boli alergice, prezentând de la simptome ușoare, cum ar fi rinita (10-30% din populație) sau conjunctivita, până la simptome severe, cum ar fi astmul (3-9% din populație) sau anafilaxia.

Una din cauzele importante ale incidenței crescute ale bolilor alergice este și polenul de ambrozia, o problemă majoră pentru sistemul de sănătate. *Ambrosia artemisiifolia*, cunoscută și sub denumirea de iarba pusteii este o buruiană originară din America de Nord, care, datorită naturii sale invazive, a reușit să se răspândească pe mai multe continente. La nivelul Europei zona cea mai afectată de polenul de ambrozia este Câmpia Panonică, dar impactul său negativ se manifestă și în România, afectând tot mai mulți pacienți alergici, în sezonul polinic, august-septembrie. Datele recente colectate de alergologi raportează o rată crescută de sensibilizare și simptome respiratorii severe cauzate de polenul de ambrozia. Se anticipează chiar că sensibilizarea la ambrozia în Europa va crește de la aproximativ 33 milioane la 77 milioane de indivizi (40% din populație) până în perioada 2041-2060, datorită creșterii concentrației de polen ce se va extinde pe o suprafață geografică tot mai întinsă.

Până în prezent, pentru polenul de ambrozia au fost identificate și descrise 11 alergene moleculare, două dintre acestea reprezentând alegelele majore: Amb a 1 și Amb a 11, restul fiind considerate alergene minore. Amb a 1 face parte din familia pectat-liazelor. Este considerat un alergen major deoarece are potențialul de a provoca reacții alergice la mai mult de 90% dintre pacienții sensibilizați la polenul de ambrozie. În plus, Amb a 1 este o proteină extrem de abundentă, constituind până la 15% din conținutul total de proteine al polenului de

ambrozii și reprezentând 54–78% din componenta alergenă. Amb a 1 prezintă 5 izoforme documentate până în prezent fiecare cu capacități diferite de legare a IgE, prima izoformă, Amb a 1.01, prezentând cea mai intensă alergenitate.

Printre alegenele minore se numără două plastocianine (Amb a 3 și Amb a 7), o defensină (Amb a 4), o proteină bazică a cărei funcție nu este încă cunoscută (Amb a 5), pan-alergenele Amb a 6 (proteină de transfer lipidic), Amb a 8 (profilină), Amb a 9 și 10 (polcalcine) și enolaza Amb a 12. Chiar dacă sunt considerate alegene minore prin prisma frecvenței de legare IgE nu înseamnă că nu sunt relevante clinic, însă acest lucru trebuie determinat pentru fiecare alegere în parte ceea ce necesită obținerea lor ca proteine pure. Printre alergenele de ambrozii cu o potențială importanță clinică se regăsește și Amb a 8, o profilină similară structural cu proteinele omoloage din alte surse alergice precum polenul de pelinăriță, mesteacăn și trimoctică. Producerea și includerea alergenilor relevante clinic în diagnosticul molecular al alergiei la ambrozii va îmbunătăți managementul clinic al acestei afecțiuni.

PARTEA SPECIALĂ

Printre principalele aspecte care conturează motivația alegerii acestui subiect de studiu se numără impactul negativ al alergiei la polenul de ambrozii asupra sănătății publice cauzat de creșterea continuă a prevalenței și de simptomele severe care afectează calitatea vieții pacienților. Pentru un management eficient al acestei afecțiuni este necesară o perspectivă clară asupra moleculelor implicate în alergii la ambrozii și, pe baza profilului de reactivitate IgE, identificarea alergenilor relevante clinic. În plus, producerea acestora ca alergene recombinante va facilita diagnosticul molecular al alergiei și va ajuta la depășirea limitărilor întâmpinate de folosirea extractelor alergice. De asemenea, caracterizarea amănunțită a alergenilor relevante clinic, în special identificarea epitopilor IgE, poate contribui la dezvoltarea unor noi imunoterapii moleculare.

Obiectivele științifice ale acestui studiu de cercetare au fost:

1. Identificarea profilului de sensibilizare al pacienților alergici la polenul de ambrozii și evaluarea potențialului alergen al altor alergene din ambrozii, pe lângă alergenul major Amb a 1;
2. Identificarea unor potențiale asocieri între profilul de sensibilizare IgE și simptomele alergice raportate de pacienții alergici la ambrozii;
3. Producerea recombinată a celei mai importante izoforme a alergenului major Amb a 1 și caracterizarea sa fizico-chimică și imunologică;

4. Producerea recombinată a profilinei Amb a 8, caracterizarea fizico-chimică și imunologică, și evaluarea potențialelor reactivități încrucișate;
5. Designul și caracterizarea peptidelor derivate din Amb a 8 necesare pentru localizarea epitopilor IgE ai alergenului Amb a 8.

IDENTIFICAREA PROFILELOR DE SENSIBILIZARE IGE ÎN ALERGIA LA POLENUL DE AMBROZIA

În vederea identificării profilelor de sensibilizare IgE, serurile provenite de la 150 de pacienți alergici la polen de ambrozia au fost testate în ImmunoCAP pentru identificarea prezenței IgE specific pentru CCD (determinanții carbohidrați cu reactivitate încrucișată). În continuare serurile pacienților negativi la CCD (n=130) au fost evaluate prin metoda imunoblot cu extractul de polen de ambrozia transferat pe o membrană de nitoceluloză, urmată de o detecție a legării IgE cu anticorpi marcați cu izotopi radioactivi. Rezultatele acestei analize au evidențiat existența a 19 profile diferite de sensibilizare IgE în cadrul acestei populații de studiu. Aceste profile au prezentat 7 tipuri de semnale IgE în diferite combinații și intensități. De asemenea, pentru a determina care este efectiv impactul alergenului major Amb a 1 asupra profilelor de reactivitate au fost realizate experimente de inhibiție în imunoblot cu 2 izoforme ale Amb a 1, una naturală (nAmb a 1.01) și celaltă recombinată (rAmb a 1.03). Aceste experimente au evidențiat că cele două izoforme au capacități diferite de inhibiție IgE, ceea ce sugerează că au și reactivități IgE diferite.

Analiza profilelor de reactivitate a evidențiat că cel mai frecvent semnal IgE de pe blot este banda dublă în jurul valorii de 38–40 kDa, care poate fi atribuită lui Amb a 1, pe baza testelor de inhibiție efectuate cu cele două izoforme Amb a 1 și confirmată și de alte studii de specialitate. Semnalele care nu au dispărut după inhibiția cu Amb a 1 reprezintă celelalte alergene din polenul de ambrozia. Astfel că, cele două benzi observate sub masa moleculară de 17 kDa ar putea include și reprezenta mai multe alergene minore, cum ar fi proteina de transfer lipidic Amb a 6 (10 kDa), plastocianinele Amb a 7 (10 kDa) și Amb a 3 (11 kDa), polcalcina Amb a 9 (10 kDa) sau profilina Amb a 8 (14 kDa). Banda de 24 kDa poate reprezenta defensina Amb a 4, iar banda mai mare de 55 kDa poate fi atribuită enolazei Amb a 12, recent descoperită.

Asocierea dintre simptomele alergice raportate de către pacienții alergici la ambrozia și tipul de profil de sensibilizare IgE a arătat că pacienții ce prezintă un profil complex au raportat mai multe simptome alergice. De asemenea, pacienții sensibilizați la Amb a 1 și la alte alergene din ambrozia au prezentat mai multe simptome asemănătoare astmului decât cei

care au fost sensibilizați doar la alergenul major Amb a 1. Toate acestea sugerează că polisensibilizarea la mai multe alergene din polenul de ambrozia determină apariția mai multor simptome alergice și induc mai frecvent manifestări de tipul astmului.

Aceste rezultate au fost verificate și confirmate și cu ajutorul testelor de degranulare a bazofilelor, folosind o linie de bazofile leucemice de șobolan (RBL) umanizate, ce exprimă pe suprafața lor receptorul de înaltă afinitate pentru IgE (FcεRI). Aceste celule au fost incubate cu serul unor pacienți cu un profil de sensibilizare complex, ser care a fost supus în prealabil unui proces de eliminare a anticorpilor IgE specifici pentru Amb a 1. Rezultatele au arătat că stimularea bazofilelor cu extract de polen de ambrozia induce eliberare de mediatori chimici chiar și în absența IgE specifici pentru alergenul major, iar acest lucru dovedește că și sensibilizarea la alte alergene din polenul de ambrozia este capabilă să inducă degranulare bazofilică, respectiv simptome clinice.

PRODUCEREA ȘI CARACTERIZAREA IZOFORMEI RECOMBINATE AMB A 1.01 A ALERGENULUI MAJOR AMB A 1 DIN POLENUL DE AMBROZIA

Așa cum s-a observat în studiul anterior, profilele de sensibilizare IgE ale pacienților alergici la polenul de ambrozia sunt complexe și eterogene, implicând răspunsuri alergice la cel puțin 11 molecule alergenicice. Dar o caracterizare detaliată necesită evaluarea individuală a fiecărui alergen, lucru imposibil în acest moment având în vedere că doar alergenele Amb a 1 și Amb a 4 sunt disponibile pe piață pentru diagnostic. Obținerea alegenelor moleculare pure se poate realiza fie prin izolare din extractul polinic, o metodă costisitoare ce prezintă un risc ridicat de contaminare; fie prin expresie proteică ca alergene recombinante.

După cum a fost menționat și anterior Amb a 1 reprezintă alergenul major din polenul de ambrozie, iar până în prezent au fost identificate și descrise 5 izoforme ale acestuia, fiecare având reactivități IgE diferite. Pentru un management mai bun al alergiei la ambrozia este important să se evalueze impactul clinic al fiecărei izoforme. Acest lucru este însă limitat de testele disponibile pe piață, care utilizează un amestec al celor 5 izoforme, fără a permite o evaluare distinctă a fiecăreia dintre ele.

Literatura de specialitate indică faptul că izoforma Amb a 1.01 prezintă alergenicitatea cea mai ridicată și cu toate acestea a fost obținută până acum doar prin purificare din extractul polinic și nu este în totalitate pură. Această situație sugerează că soluția optimă pentru obținerea unui alergen mai pur este producerea acestuia ca proteină recombinată. În ceea ce privește obținerea izoformelor Amb a 1 ca alergene funcționale s-a dovedit a fi dificilă și, până în prezent, nu a fost realizată cu succes. Încercările de a exprima aceste alergene în

celulele de *Escherichia coli* au produs doar proteine pliate necorespunzător și cu reactivitate IgE redusă. Până acum, doar Amb a 1.03 recombinat, obținut în *Pichia pastoris*, a demonstrat o reactivitate IgE comparabilă cu forma nativă. Astfel, obiectivul acestui studiu a fost producerea Amb a 1.01 ca o proteină recombinată, similară cu alergenul natural, pentru îmbunătățirea diagnosticului molecular al alergiei la polen de ambrozie.

În acest scop, în cadrul acestui studiu a fost exprimate în celule de insecte, două proteine recombinante reprezentând forma matură a izoformei Amb a 1.01. A fost ales acest sistem de expresie proteică pentru că Amb a 1.01 este o proteină complexă structural cu un situs de glicozilare și punți disulfidice. Una dintre proteine a fost proiectată cu un His-Tag la capătul N-terminal și o secvență de aminoacizi pentru clivajul His-Tag (rAmb a 1.01), în timp ce cealaltă conținea un His-Tag la capătul C-terminal (rAmb a 1.01 His+). S-a observat că în timpul expresiei proteice, doar rAmb a 1.01 a fost secretată în mediul de cultură, în timp ce rAmb a 1.01 His+ a rămas intracelular. Cel mai probabil, rAmb a 1.01 His+ a format aglomerări proteice, fenomen întâlnit atunci când proteina este pliată necorespunzător, acest lucru fiind probabil cauzat de poziția His-Tag-ului. Ambele proteine recombinante au fost purificate prin cromatografie de afinitate și au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic și imunologic în comparație cu izoforma naturală (nAmb a 1.01).

Analiza SDS-PAGE a arătat că izoforma recombinată rAmb a 1.01 are o masă moleculară ușor mai mare decât alergenul natural, dar analiza MALDI-TOF a confirmat că ambele alergene au o greutate moleculară comparabilă, de aproximativ 40 kDa. În plus, analiza dicroismului circular (CD) a arătat valori similare ale elipticității reziduale medii, sugerând că structura secundară a alergenului recombinat este asemănătoare cu cea a alergenului natural. În schimb, rAmb a 1.01 His+ a prezentat diferențe structurale față de nAmb 1.01.

În ceea ce privește caracterizarea imunologică, pentru identificarea potențialului de legare IgE au fost testați în ELISA 100 de pacienți alergici la polenul de ambrozie folosind cele două izoforme recombinante și omoloaga lor naturală. Rezultatele au arătat că izoforma naturală Amb a 1.01 a avut o frecvență de legare IgE de 99%, confirmându-se proprietatea sa de alergen major. Proteina recombinată rAmb a 1.01 a prezentat o frecvență de legare IgE similară și valori ale densităților optice corelate puternic cu cele ale nAmb a 1.01. Spre deosebire de acestea, rAmb a 1.01 His+ a prezentat o frecvență de legare IgE mai mică, de 86%, și o corelare mai slabă a densităților optice cu nAmb a 1.01. Aceste rezultate indică faptul că rAmb a 1.01 are o structură imunologică similară cu alergenul natural, în timp ce

rAmb a 1.01 His+ ar putea avea o structură secundară incorectă, ceea ce afectează capacitatea sa de a lega IgE.

În vederea evaluării relevanței clinice a alergenelor un test extrem de important este testul de activare a bazofilelor. Acesta permite evaluarea capacității alergenelor de a declanșa eliberarea de mediatori, mediată de IgE. Deoarece acest tip de test este extrem de sensibil, este potrivit pentru determina relația dintre concentrația alergenică și răspunsul alergic. Acest studiu a relevat că nAmb a 1.01 și rAmb a 1.01 au o activitate alergenică comparabilă și intensă, în timp ce alergenicitatea rAmb a 1.01 His+ a fost scăzută. Aceasta fiind detectabilă doar la pacienții cu niveluri ridicate de IgE și după stimulare cu concentrații mari de alergen. O potențială explicație pentru legarea redusă a IgE ar putea fi o pliere incorectă a rAmb a 1.01 His+ după denaturarea cu uree, care ascunde sau blochează epitopii IgE.

Pe baza rezultatelor evaluării fizico-chimice și imunologice, s-a constatat că rAmb a 1.01 prezintă o structură și o reactivitate IgE similară cu nAmb a 1.01, sugerând o pliere corectă a acestei proteine recombinat, spre deosebire de rAmb a 1.01 His+. Astfel că în următoarele experimente a fost folosită doar izoforma recombinată rAmb a 1.01, inclusiv în generarea de antiseruri alergen specifice ca urmare a imunizării iepurilor.

Importanța izoformei Amb a 1.01 a fost evaluată și printr-un test de inhibiție în ImmunoCAP, în care serul pacienților a fost preincubat cu rAmb a 1.01 și extract de polen și apoi a fost testat pentru legarea IgE de alergenul Amb a 1 natural aflat pe ImmunoCAP. În urma acestei evaluări s-a observat un potențial ridicat de inhibiție a legării IgE de către rAmb a 1.01 sugerând că fie ImmunoCAP-ul cu nAmb a 1 conține cantități mari de Amb a 1.01, fie că pacienții sunt în principal sensibilizați la această izoformă. În orice caz, această izoformă recombinată s-a dovedit a fi un candidat potrivit pentru diagnosticul alergiei la ambrozie, dar sunt necesare studii mai detaliate care să includă alte izoforme ale alergenului major Amb a 1.

Studiul acesta reprezintă prima raportare a obținerii izoformei Amb a 1.01, izoforma Amb a 1 cu cea mai mare activitate alergenică, ca proteină recombinată funcțională și corect pliată cu caracteristici comparabile cu alergenul natural, devenind astfel o resursă valoroasă pentru îmbunătățirea diagnosticului alergic molecular.

PRODUCEREA ȘI CARACTERIZAREA ALERGENULUI RECOMBINAT AMB A 8 DIN POLENUL DE AMBROZIA

Profilele de sensibilizare IgE ale pacienților alergici la polen de ambrozie au prezentat frecvent pe lângă alergenul major Amb a 1 și semnale corespunzătoare altor alergene. Unul dintre aceste semnale este cel de la nivelul masei moleculare de 14 kDa și îi este atribuit

profilinei Amb a 8. Astfel că scopul acestui studiu a fost determinarea importanței clinice a Amb a 8. Dar, pentru o mai bună identificare a relevanței clinice este nevoie de testarea individuală a pacienților la acest alergen lucru posibil prin producerea lui ca proteină recombinată. De asemenea, făcând parte din familia profilinelor, Amb a 8 prezintă un grad înalt de identitate structurală cu alte proteine din această familie, astfel că acest studiu și-a propus și identificarea reactivității încrucișate cu extracte și profile din alte surse alergice. În plus, acest studiu a vizat și determinarea epitopilor de legare IgE ai Amb a 8, necesari pentru studiile viitoare orientate spre dezvoltarea de imunoterapii alergice pentru alergia la polenul de ambrozie sau mai mult, pentru alergia la profile.

Deoarece este o proteină mică și relativ simplă din punct de vedere structural, alergenul recombinat Amb a 8 (rAmb a 8) a fost produs folosind sistemul de expresie proteică bazat pe celule *E. coli*. Pentru că în timpul expresiei rAmb a 8 a format corpuri de incuziune a fost nevoie de o izolare și o purificare în condiții denaturante, folosind o cantitate mare de uree, care a fost ulterior eliminată prin dializare. Proteina astfel obținută a fost testată în SDS-PAGE și a prezentat o masă moleculară (aprox. 15 kDa) similară cu cea prezentată în literatură, lucru susținut și de evaluarea MALDI-TOF. De asemenea, aceste teste au arătat că alergenul rAmb a 8 prezintă dimeri, lucru observat și la alte profile, inclusiv la cele naturale ceea ce demonstrează că această dimerizare nu este cauzată de obținerea recombinată a alergenului. Determinarea dicroismului circular a evidențiat faptul că rAmb a 8 prezintă o pliere corectă.

Alergenicitatea proteinei rAmb a 8 a fost determinată în urma testării reactivității IgE prin metoda ELISA, folosind ser de la 255 pacienți alergici la polen de ambrozia. Acest alergen și-a păstrat statutul de alergen minor cu o frecvență de 27.17%, în schimb a prezentat o activitate alergică importantă inducând eliberarea de mediatori chimici la 5 din cei 6 pacienți testați, cu o intensitate asemănătoare sau chiar mai ridicată decât cea indusă de alergenul major Amb a 1. Aceste rezultate arată că rAmb a 8 este capabil să provoace o degranulare puternică a bazofileor și astfel să inducă simptome alergice, însă natura acestor manifestări clinice nu poate fi determinată cu exactitate deoarece pacienții au fost sensibilizați și la alergenul major Amb a 1. Cu toate acestea, acest alergen prezintă relevanță clinică în populația alergică inclusă în acest studiu.

Cunoscută ca o proteină cu structură înalt conservată, Amb a 8 a prezentat un grad ridicat al reactivității încrucișate când a fost testată cu profilele omoloage din polenurile de pelinăriță (Art v 4), mesteacăn (Bet v 2) și timoftică (Phl p 12).

Toate aceste caracteristici imunologice au condus la necesitatea de a caracteriza mai amănunțit alergenul Amb a 8 inclusiv localizarea epitopilor de legare a IgE. Astfel că au fost

proiectate și sintetizate 5 peptide de aproximativ 24-35 aminoacizi care acoperă întreaga secvență de aminoacizi a Amb a 8. Aceste peptide au fost testate cu ser de la pacienți alergici la Amb a 8 și s-a observat că nu au reactivitate IgE, sugerând că acest alergen nu prezintă epitopi liniari. Ulterior, peptidele au fost conjugate cu o proteină „carrier” – KLH și injectate la iepuri. Serurile de iepuri anti-peptide au fost apoi testate din punct de vedere al legării de alergenul întreg pentru ca mai apoi să fie folosite în testele de inhibiție a legării IgE. O parte din aceste seruri au arătat un potențial ridicat de inhibiție, sugerând că Amb a 8 are în principal epitopi conformaționali. De remarcat este că serurile de iepure produse pentru două dintre peptidele de Amb a 8 au prezentat un potențial ridicat de inhibiție IgE (aproximativ 80%), reprezentând candidate importante pentru o viitoare imunoterapie moleculară.

În concluzie, profilina Amb a 8 a fost produsă cu succes în celule de *E. coli*, având caracteristici fizico-chimice și imunologice care sugerează că este un alergen funcțional, cu o pliere corectă. Aceasta poate reprezenta un element important în diagnosticul și terapia alergiei la polenul de ambrozia, însă sunt necesare cercetări mai amănunțite.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PROPRII

Toate obiectivele științifice stabilite pentru acest studiu au fost realizate cu succes. Acest studiu a evidențiat că sensibilizarea la polenul de ambrozia este eterogenă și complexă, implicând 19 profile diferite de reactivitate IgE. Analizele simptomelor clinice au arătat că pacienții cu profile de sensibilizare mai complexe sunt predispuși să prezinte simptome alergice mai severe. În cadrul studiului, cele două izoforme ale Amb a 1, și anume nAmb a 1.01 și rAmb a 1.03, au prezentat tipare de inhibiție diferite, sugerând că reactivitățile lor IgE sunt distincte. De asemenea, deși Amb a 1 este considerat alergenul major al polenului de ambrozia, nu este singurul responsabil pentru inducerea simptomelor alergice. Acest fapt subliniază că Amb a 1, deși important, nu este suficient pentru un diagnostic complet și pentru o imunoterapie de precizie pentru alerggia la ambrozia, iar alergene precum Amb a 11, Amb a 4, Amb a 8 și Amb a 8, ar trebui să fie luate în considerare pentru un management adecvat al alergiei la polenul de ambrozia.

De asemenea, cea mai alergenică izoformă a alergenului major Amb a 1 a fost produsă cu succes ca proteină recombinată în celule de insecte. Aceasta prezintă caracteristici fizico-chimice și imunologice similare cu cele ale izoformei naturale, având o reactivitate IgE de 99% și o activitate alergenică intensă. În același timp, profilina Amb a 8 a fost produsă eficient în celule de *Escherichia coli* și a prezentat în cadrul populației studiate caracteristicile unui alergen relevant clinic, cu o frecvență IgE de 27% și o activitate alergenică ridicată. Mai mult,

Amb a 8 a prezentat un grad ridicat de reactivitate încrucișată cu profiline omoloage din polenul de pelinariță, mesteacăn și timoftică, iar identificarea epitopilor de legare IgE pentru Amb a 8 a relevat că acest alergen conține în principal epitopi conformaționali.

Contribuții proprii

- Procesarea și stocarea probelor serologice obținute de la pacienții incluși în studiu și actualizarea bazei de date a pacienților cu informațiile obținute din chestionar (de exemplu, simptome, alte sensibilizări);
- Realizarea imunobloturilor cu extract de polen de ambrozia și identificarea profilelor de reactivitate IgE. Efectuarea imunobloturilor de inhibiție a legării IgE folosind două izoforme ale alergenului major Amb a 1 pentru a determina dacă există alte alergene, în afară de Amb a 1, implicate în răspunsul IgE al pacienților la polenul de ambrozia;
- Proiectarea primului model experimental pentru a captura și elimina IgE specific pentru Amb a 1 din serul pacienților alergici. Serul a fost apoi testat în testul de activare a bazofilelor și s-a observat că celulele RBL incubate cu serul încă degranulau după stimularea cu extract de ambrozia;
- Designul constructelor ADN pentru Amb a 1.01 și Amb a 8 pentru a obține vectorii necesari expresiei proteice;
- Expresia, izolarea și purificarea a două proteine recombinat reprezentând cea mai importantă izoformă a alergenului major Amb a 1 (una cu un His Tag C-terminal și cealaltă cu un His Tag N-terminal, care a fost eliminat după purificare). Este de menționat că aceasta este prima dată când această izoformă alergenică este produsă cu succes ca proteină recombinată funcțională;
- Expresia, izolarea și purificarea profilinei Amb a 8 în celule de *E. coli*;
- Caracterizarea fizico-chimică și imunologică a alergenelor recombinat obținute, arătând că Amb a 1.01 recombinat este similar cu izoforma naturală și poate fi utilizat cu succes în viitoarele teste de diagnostic;
- Evidențierea că în populația studiului alergenul minor Amb a 8 este relevant din punct de vedere clinic și ar trebui luat în considerare pentru diagnosticul alergiei la ambrozia și pentru o potențială imunoterapie;
- Determinarea potențialelor reactivități încrucișate ale alergenului Amb a 8 cu profilinele omoloage din cele mai comune surse (mesteacăn, timoftică și pelinariță) de polen din Timișoara, zona desfășurării studiului;

- Designul și caracterizarea peptidelor derivate din Amb a 8. Identificarea potențialului de legare a IgE, de degranulare a bazofilelor și testarea serului obținut după imunizarea iepurilor pentru a identifica epitopii IgE ai Amb a 8. Aceasta este prima abordare de cercetare de acest tip și a permis determinarea peptidelor cu cel mai mare potențial de inducere a IgG blocant, ceea ce reprezintă un pas important în dezvoltarea unei potențiale imunoterapii.