

Verbund ABROGATE - Neuartige Diagnose und Behandlung von Nahrungsmittelallergien - Nahrungsmittelallergie und nicht IgE-vermittelte Nahrungsmittelintoleranz in einer populationsbasierten Kohorte (Teilprojekt 2)

Abschlussbericht SP2, AP2 (UK Augsburg)

I. Kurzbericht

Im Subprojekt (SP) 2, Arbeitspaket 2 (Traidl-Hoffmann) wurden im ersten Schritt Seren einer Subkohorte von KORA FF4 (n = 792) in Augsburg mittels ISAC 112 (Phadia, ImmunoCAP) analysiert, um detaillierte Information über IgE Profile zu erhalten. Bei der untersuchten Kohorte handelte es sich jeweils zur Hälfte um Teilnehmer mit und ohne Angabe von Allergien und/oder Unverträglichkeiten, inklusive gegenüber Nahrungsmitteln.

In Zusammenarbeit mit dem SP 1 (von Mutius) wurden in Augsburg darüber hinaus IgE Profile von 227 Seren der GINI- und 142 Seren der LISA-Kinderkohorte gemessen, für die jeweils Angaben zu Nahrungsmittelallergien und/oder Unverträglichkeiten existierten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte innerhalb des SP 1.

Unter den Probanden aus KORA FF4, die einer Kontaktierung zwecks weiterer Studien zugestimmt hatten, wurden in im KORA-Studienzentrum in Augsburg mittels Flyern Teilnehmer mit Nahrungsmittelallergien und -Intoleranzen für eine doppelblinde, Nocebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokationsstudie (DBNCFC) rekrutiert. Aufgrund der geringen Anzahl für die Studie geeigneter und teilnahmewilliger Probanden wurde unter Mitgliedern des Deutschen Allergie- und Asthmabundes (DAAB) und unter Patienten der Hochschulambulanz für Umweltmedizin des Universitätsklinikums Augsburg hinzurekrutiert.

Die eingeschlossenen Studienteilnehmer (n = 43) wurden am Universitätsklinikum Augsburg in zwei getrennten, ambulanten Visiten einer 5-stufigen Dosis-eskalierenden Provokation mit dem relevanten Nahrungsmittel und einem optisch und geschmacklich verblindeten Nocebo-Nahrungsmittel unterzogen, wobei die Reihenfolge von Nocebo und Verum zufällig gewählt war und die beiden Visiten mindestens eine Woche auseinander lagen. Das durchführende klinische Team war ebenfalls bzgl. Nocebo und Verum-Verabreichung verblindet. Während der Studie gab es zwei Drop-outs, so dass insgesamt nur 40 Teilnehmer vollständig provoziert werden konnten.

Vor Beginn der ersten Provokation wurden die Teilnehmer gebeten, zwei Wochen lang ein Ernährungstagebuch zu führen, um zu erfassen, ob das verdächtige Nahrungsmittel zu sich genommen wurde oder nicht, und ob ggf. Symptome bei Verzehr aufgetreten sind.

Vor der ersten sowie nach jeder von maximal fünf verabreichten Dosen des Nahrungsmittels (bzw. des Nocebos) wurden 5 ml Blut aus der Armvene gewonnen. Eine physische Untersuchung und Symptomerfassung erfolgte ebenfalls vor Beginn der ersten Dosis und nach jeder weiteren verabreichten Dosis.

Vor und nach jeder der zwei Visiten (Nocebo, Verum) wurden Stuhlproben von den Teilnehmern selbst gewonnen. Die Blutproben wurden im Labor der Umweltmedizin abesert und die Seren einer Multiplex-Zytokinanalyse (MSD, Mesoscale Discovery) unterzogen.

Am Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) der TUM wurden unter Leitung von PD Dr. Claus Neuhaus (SP 7) die bakterielle DNA aus den Stuhlproben isoliert und die 16S Gene sequenziert. Anhand der resultierenden 16S Sequenzen wurde in der Umweltmedizin in Augsburg eine präliminäre Analyse des Stuhl-Mikrobioms der Studienpatienten (vor und nach Provokation; Verum vs. Nocebo) durchgeführt.

II. Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten

1. Angaben zu Nahrungsmittelallergien und Erstellung von IgE Profilen in KORA FF4

Im Subprojekt 2, Arbeitspaket 2 (Traidl-Hoffmann) 792 Seren einer Sub-Kohorte von KORA FF4 mittels ISAC 112 (Phadia, ImmunoCAP) untersucht, um IgE Profile zu bestimmen. Bei der untersuchten Kohorte handelte es sich jeweils zur Hälfte um Teilnehmer mit und ohne Angabe von Allergien und/oder Unverträglichkeiten, inklusive gegenüber Nahrungsmitteln.

Die untersuchte Stichprobe setzte sich wie folgt zusammen:

- Probanden mit Angabe mindestens einer Allergie und/oder Unverträglichkeit (inkl. gegenüber Nahrungsmitteln) im Umweltmedizin-Fragebogen von 2015 (N = 396; davon N = 113 mit Angabe von Nahrungsmittelallergie oder -unverträglichkeit).
- Alters- und Geschlechts-gematchte Probanden ohne Angabe von Allergien oder Unverträglichkeiten (N = 396).
- Gesamte Stichprobe N = 792.
- Geschlechtsverteilung: 61% Frauen, 39% Männer.
- Altersverteilung: Median 60 Jahre (Minimum: 47, Maximum: 72 Jahre).

Ein auswertbares IgE Profil konnte in 99,75% (790/792) der Proben erstellt werden. In 0,25% (2/792) der Proben war eine Auswertung des ISAC Assays nicht möglich, da die Positivkontrollen auch bei wiederholter Durchführung kein valides Ergebnis lieferten.

In der Gruppe mit angegebenen Nahrungsmittelallergien oder -Unverträglichkeiten wurden insgesamt 192 verschiedene Nahrungsmittel als Auslöser von Beschwerden genannt. Am häufigsten (22,8%) wurden Nahrungsmittel aus der Gruppe der nicht-IgE-vermittelten Allergene angegeben, mit (in absteigender Reihenfolge) Laktose (11%), Fruktose (4,7%), Gluten (3,1%) und Histamin (2%). Die nächstgrößte angegebene Gruppe waren Früchte (21%), gefolgt von Schalenfrüchten (Nüssen) mit 20,1%. Eine weitere heterogene Gruppe (15%) umfasste Angaben zu diversen Lebensmitteln wie Zusatzstoffen, Süßstoffen, Gewürzen, Gewürzmischungen, Kräutern, Samen etc. Die letzte große Gruppe (13%) waren Angaben zu „Milch“ und „Milchprodukten“, wobei hierin vermutlich auch viele Laktose-Intoleranzen enthalten waren, die (vermutlich aus Unkenntnis) nicht als solche bezeichnet worden waren. Der Rest der Angaben verteilte sich auf die kleinen Gruppen Getreide, Fisch, Fleisch, Krustentiere, Hülsenfrüchte und Hühnerei (jeweils 1-4 Angaben) (**Abbildung 1**).

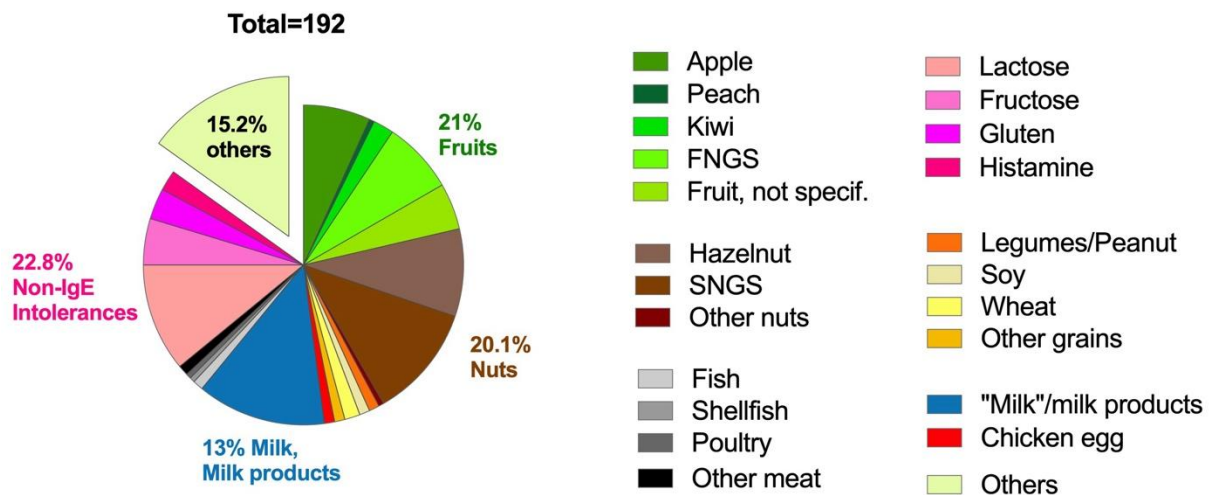


Abb. 1. Angaben zu Allergien und Unverträglichkeiten gegen verschiedene Nahrungsmittelklassen in KORA FF4.

Im Hierarchical Clustering der ISAC 112 Daten ist eine deutliche Unterscheidung der IgE Profile von Fällen und Kontrollen sich ersichtlich (**Abbildung 2**).

Betrachtet man die Fallstichprobe, so ergibt sich keine offensichtliche Korrelation zwischen positiven Angaben von Nahrungsmittelallergien im Fragebogen mit den ermittelten IgE Profilen.

Eine Ausnahme waren Seren von Teilnehmern mit Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergien (Pollen-Food-Syndrome; PFS), die regelhaft Sensibilisierungen gegenüber PR-10-Familie Proteine wie z. B. Aln g 1 (Erle) Bet v 1 (Birke), Cor a 1 (Hasel), Ole e 1 (Ölbaumgewächse), Api g 1 (Sellerie), Ara h 8 (Erdnuss), Gly m 4 (Soja), Mal d 1 (Apfel), Pru p 1 (Pfirsich) und Act d 8 (Kiwi) aufwiesen. Im selben Cluster waren auch vermehrt Sensibilisierungen gegen Bermudagrass Expansin (Cyn d 1), Süßgräser-Allergene (Phl p 5, Phl p 6, Phl p 2, Phl p 11), Katze (Fel d 1) sowie Milben (Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der p 1) vorhanden. Das beschriebene Cluster war jedoch generell in Seren aus der Fallstichprobe zu beobachten, unabhängig davon, ob positive Angaben zu Nahrungsmittelallergien gemacht worden waren oder nicht. Insgesamt waren Sensibilisierungen gegen Baumpollen-, Gräserpollen- und Milben-Allergene am häufigsten und clusterten zusammen.

Ein weiteres Cluster, das in der Fallstichprobe zu beobachten war, umfasste die pflanzlichen Profilinen aus Latex (Hev b 8), einjährigem Bingelkraut (Mer a 1), Birke (Bet v 2) und Süßgräsern (Phl p 12).

In den Seren der Teilnehmer, die Nahrungsmittel-Unverträglichkeiten (Laktose, Fruktose, Histamin, Gluten) angegeben hatten, ist kein einheitliches Muster zu erkennen. Bei ca. der Hälfte dieser Teilnehmer lassen sich keine IgE-Sensibilisierungen erkennen, die andere Hälfte fällt in das Pflanzenpollen-/PR-10 Cluster.

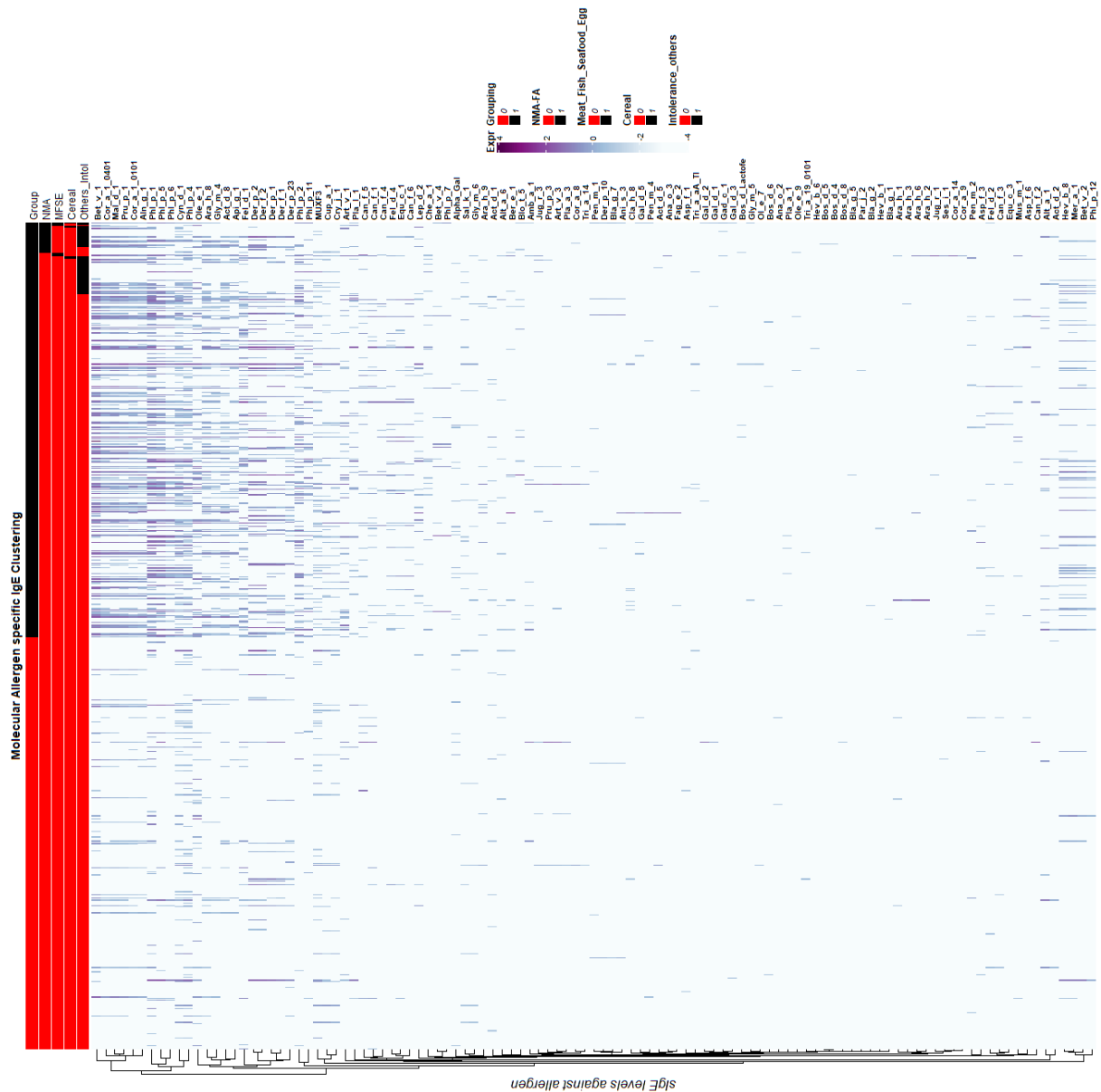


Abb. 2. Clustering der IgE-Profile in KORA FF4. Spezifische IgE Werte wurden in Seren von 791 Fällen und Kontrollen mittels ISAC 112 bestimmt. Gezeigt ist ein *hierarchical clustering* der Ergebnisse, sortiert nach Fällen und Kontrollen (Group: schwarz = Fälle; rot = Kontrollen). Die in der Fallkohorte angegebenen Nahrungsmittelgruppen sind mit schwarzen Balken gekennzeichnet.

2. Doppelblinde, Nocebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokation

2.1 Studienort und -ablauf

Die Nahrungsmittelprovokationen wurden ambulant in den Räumen des Comprehensive Cancer Center Augsburg (CCCA) am Universitätsklinikum Augsburg (UKA) durchgeführt.

Jeder Teilnehmer wurde zweimal zur Visite einbestellt: einmal für die Provokation mit dem angegebenen Nahrungsmittel (Verum) und einmal für die Provokation mit einem nach optisch und geschmacklich verblindeten Nocebo. Sowohl die Teilnehmer selbst wie auch

das medizinische Team waren bezüglich der Reihenfolge der Provokationsvisiten (Nocebo, Verum) verblindet. Das ärztliche Team war jedoch über den IgE-Status und die klinische Vorgeschichte der Teilnehmer informiert und wusste darüber Bescheid, welches Nahrungsmittelallergen bei jeder Visite getestet werden sollte. Dies war nötig, um bei einer IgE-vermittelter Anaphylaxie angemessen reagieren zu können.

Bei der Visiten-Terminierung wurde den Teilnehmern ein Handout gegeben, in dem Anweisungen für die Zeit vor den Provokationen enthalten waren. Medikamenteneinnahmen wurden erneut abgefragt, um zu erfahren, ob Medikamente neu eingenommen wurden, die die Provokationsresponse beeinflussen können, so z. B. Glukokortikoide, Betablocker, Insulinpräparate, Antihistaminika oder zentralnervös aktive Substanzen. Falls solche Medikamente neu eingenommen wurden, wurde, sofern medizinisch vertretbar, ein Wechsel zu einem alternativen Wirkstoffpräparat angeregt. Falls ein Wechsel zu einem alternativen Wirkstoffpräparat unmöglich war, schied der betreffende Teilnehmer aus der Studie aus.

Vor der ersten Provokation bekamen die Teilnehmer vier Probenröhrchen für die Stuhlproben inklusive frankierter Rückumschläge zugesendet. Am Tag vor jeder Visite sowie beim nächsten Stuhlgang nach der Provokation wurde vom Teilnehmer selbst eine Stuhlprobe gewonnen und ins Studienzentrum der Umweltmedizin geschickt. Die Stuhlprobe wurde in *Stool Stabilizer* eingefroren und aufbewahrt. Nach dem Ende der Studie wurden alle erhaltenen Stuhlproben auf Trockeneis ans ZIEL verschickt für die DNA-Isolation und 16S-Sequenzierung (SP 7).

Zwei Wochen vor der ersten Provokation (Visite 1) füllten die Teilnehmer täglich ein Ernährungstagebuch aus, um alle Nahrungsmittel, die zu sich genommen hatten, sowie etwaige nach dem Verzehr aufgetretene Symptome zu dokumentieren. Das ausgefüllte Ernährungstagebuch wurde zur ersten Visite mitgebracht.

Die Teilnehmer wurden dazu angehalten, am Tag der Visite normal (leicht) zu frühstücken, jedoch „ihr“ Nahrungsmittel weiterhin zu meiden. Die Visite startete mit einem Anamnesegespräch und einer körperlichen Untersuchung, bestehend aus einer Inspektion der Haut, Mund- und Rachenschleimhaut, einer Thorax- und Abdomen-Auskultation sowie der Messung von Temperatur, Blutdruck und pO₂. Anschließend wurde der Teilnehmer an einen Vitalfunktionsmonitor angeschlossen.

Ein venöser Zugang wurde in der Armbeuge gelegt und ein Tropf mit 100 ml 0.7% NaCl Lösung (Braun) angehängt. Der venöse Zugang diente zur Sicherheit, falls im Notfall intravenös Medikamente verabreicht werden müssten. Ein Notfall-Kit mit Fenistil® Injektionsampullen und EpiPen® stand in den Untersuchungsräumen des CCCA zur Verfügung. Die beteiligten Studienärzte hatten im Vorfeld der Abrogate Studie einen Notfallkurs absolviert. Zusätzlich waren die diensthabenden Ärzte in der zentralen Notaufnahme vor jedem Provokationstermin informiert worden, um im Notfall Bescheid zu wissen. Zwei Patientenbetten standen in der CCCA bereit, falls ein Transport in die Notaufnahme nötig gewesen wäre.

Aus dem venösen Zugang wurden vor Verabreichung der ersten Dosis sowie nach jeder weiteren verabreichten Dosis des Nahrungsmittels je 5 ml Blutproben (Serum Monovette) entnommen. Die Blutproben wurden im Labor der Umweltmedizin abgesert, aliquotiert

und eingefroren bis zur Zytokin-Analyse. Ein Aliquot wurde an das ZAUM (AP Carsten Schmidt-Weber) verschickt, wo eine miRNA Analyse durchgeführt wurde.

Das Nahrungsmittel wurde in der Form von geschmacks- und geruchsverblindeten Breien in aufsteigenden Mengen verabreicht, angefangen von einer kleinen Menge bis hin zu einer Maximaldosis, die je nach Allergenquelle und Rezept variierte (siehe Tabellen 3-x). Nach jeder verabreichten Dosis wurde eine halbstündige Pause eingelegt, während derer der Teilnehmer beobachtet wurde und an deren Ende eine erneute Symptomerhebung und körperliche Untersuchung erfolgte. Der Monitor für die Vitalfunktionsüberwachung lief die gesamte Zeit über und wurde regelmäßig von der Study Nurse überwacht.

Wenn nach einer verabreichten Dosis objektive Symptome oder als schwerwiegend empfundene (subjektive) Beschwerden oder Unwohlsein auftraten, wurde die Provokation abgebrochen und die Abbruchdosis im CRF notiert. Im Anschluss an die letzte verabreichte Dosis wurde bis zu 270 Minuten nachbeobachtet, bei Symptommfreiheit jedoch mindestens 60 Minuten. Ein Blister Fenistil® Tabletten und Hydrokortison-Creme wurden jedem Teilnehmer für den Bedarfsfall mit nachhause gegeben. Bei Auftreten von Beschwerden im Verlauf der nächsten 24-48 Stunden waren die Teilnehmer angehalten, sich beim Studienteam zu melden oder bei der zentralen Notaufnahme des UKA vorzustellen. Alle später auftretenden Beschwerden (>48h) sollten notiert und dem Studienteam mitgeteilt werden.

Der Ablauf der Visiten ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt.

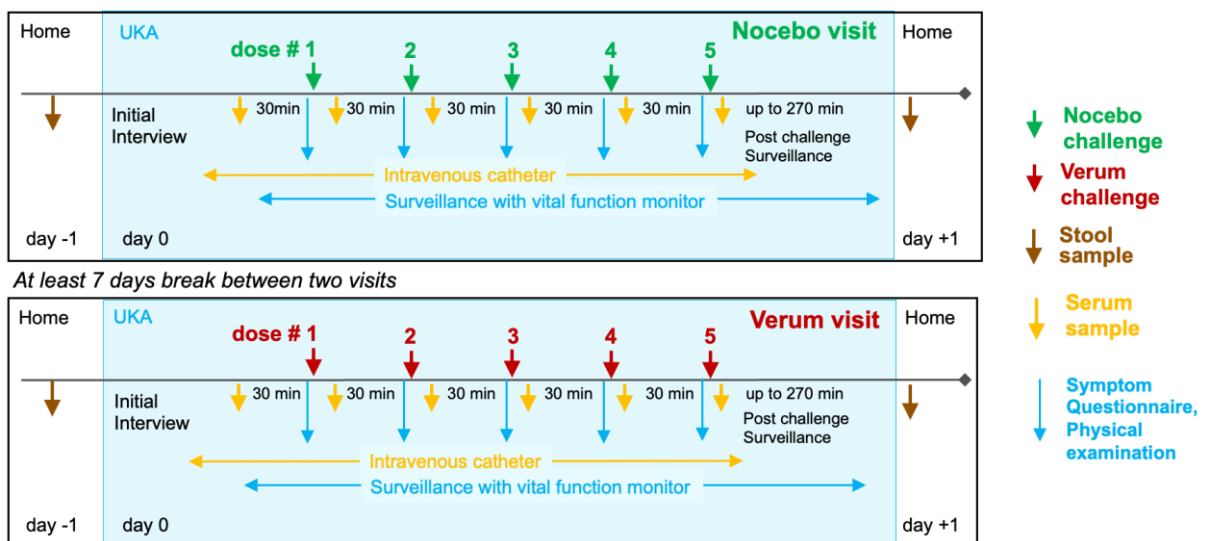


Abb. 3. Studiendesign der DBNCF. Für die Provokationsstudie wurden alle Teilnehmer zu zwei Visiten ans Universitätsklinikum Augsburg einbestellt. Der Abstand zwischen beiden Visiten bestand mindestens 7 Tage. Die Provokationen erfolgten unter Überwachung der Vitalparameter in fünf Schritten mit aufsteigender Dosis des jeweiligen Nahrungsmittels bzw. eines optisch und geschmacklich verblindeten Nocebos. Sowohl die Teilnehmer selbst wie auch das medizinische Team waren bezüglich der Reihenfolge der Provokationsvisiten (Nocebo, Verum) verblindet.

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien: Alter (≥ 18 und ≤ 69 Jahre); Vorgeschichte oder V. a. auf Nahrungsmittelallergie, „Pollen Food Syndrome“ oder Nahrungsmittelintoleranz; vorhandener

Serum IgE Test (ISAC 112); informierte Zustimmung zur Studienteilnahme und zur studienbezogenen Datenverarbeitung.

Ausschlusskriterien: Schwangerschaft, Stillzeit; deutlich beeinträchtigter Allgemeinzustand; akute schwere Erkrankungen; Autoimmunerkrankung des Magen-Darm-Traktes (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa); Vorgeschichte von Anaphylaxie (Grade 3 und 4), insbesondere wenn durch Nahrungsmittel ausgelöst; vorangegangenes schweres, durch Nahrungsmittel ausgelöstes Asthma bronchiale; Immundeprivation (z.B. Hyper-IgE-Syndrom, Mastozytose, Hyper-Eosinophilie-Syndrom), systemische Behandlung Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren; fehlende Bereitschaft oder Fähigkeit, die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zu geben; absehbare fehlende Compliance während des Studienverlaufs.

2.3 Teilnehmer

KORA FF4 Probanden, die einer Kontaktaufnahme zu Studienzwecken zugestimmt hatten (n = 189), bekamen bei der GEFU 5 Untersuchung im KORA Studienzentrum Flyer für die doppelblinde, Nocebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokationsstudie ausgehändigt mit der Bitte, sich bei Interesse per E-Mail im Studienzentrum der Umweltmedizin zu melden. Insgesamt wurden 81 Teilnehmer aus KORA FF4 einem telefonischen Vor-Screening unterzogen, und 27 davon durchliefen im Anschluss ein ausführliches Screening mit Symptombefragung in der Hochschulambulanz für Umweltmedizin.

Aufgrund der geringen Zahl an geeigneten Teilnehmern wurde unter Mitgliedern des DAAB mit Wohnsitz im Gebiet Augsburg/Schwaben/Allgäu hinzu rekrutiert. Hier meldeten sich 61 Interessenten, die alle dem Vorab-Screening per Telefon unterzogen wurden; 30 davon wurden einem ausführlichen Screening mit Bluttest (ISAC 112) und Symptombefragung in der Hochschulambulanz für Umweltmedizin unterzogen.

Eingeschlossen wurden ursprünglich 57 Teilnehmer (27 aus KORA und 30 über DAAB und Hochschulambulanz). In Verlauf des Screening-Prozesses erfolgten 10 Drop-Outs (Kontaktabbruch). Die Teilnehmerzahl betrug damit nurmehr 47. Im Zuge des Ausfüllens des Ernährungstagebuchs gingen 3 Teilnehmer verloren und während der ersten Provokationsvisite ein weiterer, so dass letztlich 43 Teilnehmer vollständig mit Verum und Nocebo provoziert werden konnten (Verlauf siehe **Abbildung 4**).

Die angestrebte Stichprobengröße von N = 15 pro Gruppe ließ sich für Gruppe 1 auch durch Nachrekrutierung nicht erreichen, da etliche passende Kandidaten mit primärer, IgE-vermittelter Nahrungsmittelallergie, die gescreent worden waren, entweder nicht einverstanden waren, die Provokation durchführen zu lassen, oder im Screening über eine Anaphylaxie \geq Schweregrad 3 in der Vergangenheit berichtet hatten. Da die Provokation im ambulanten Setting durchgeführt wurde, konnten Kandidaten mit Risiko einer schweren Anaphylaxie nicht eingeschlossen werden.

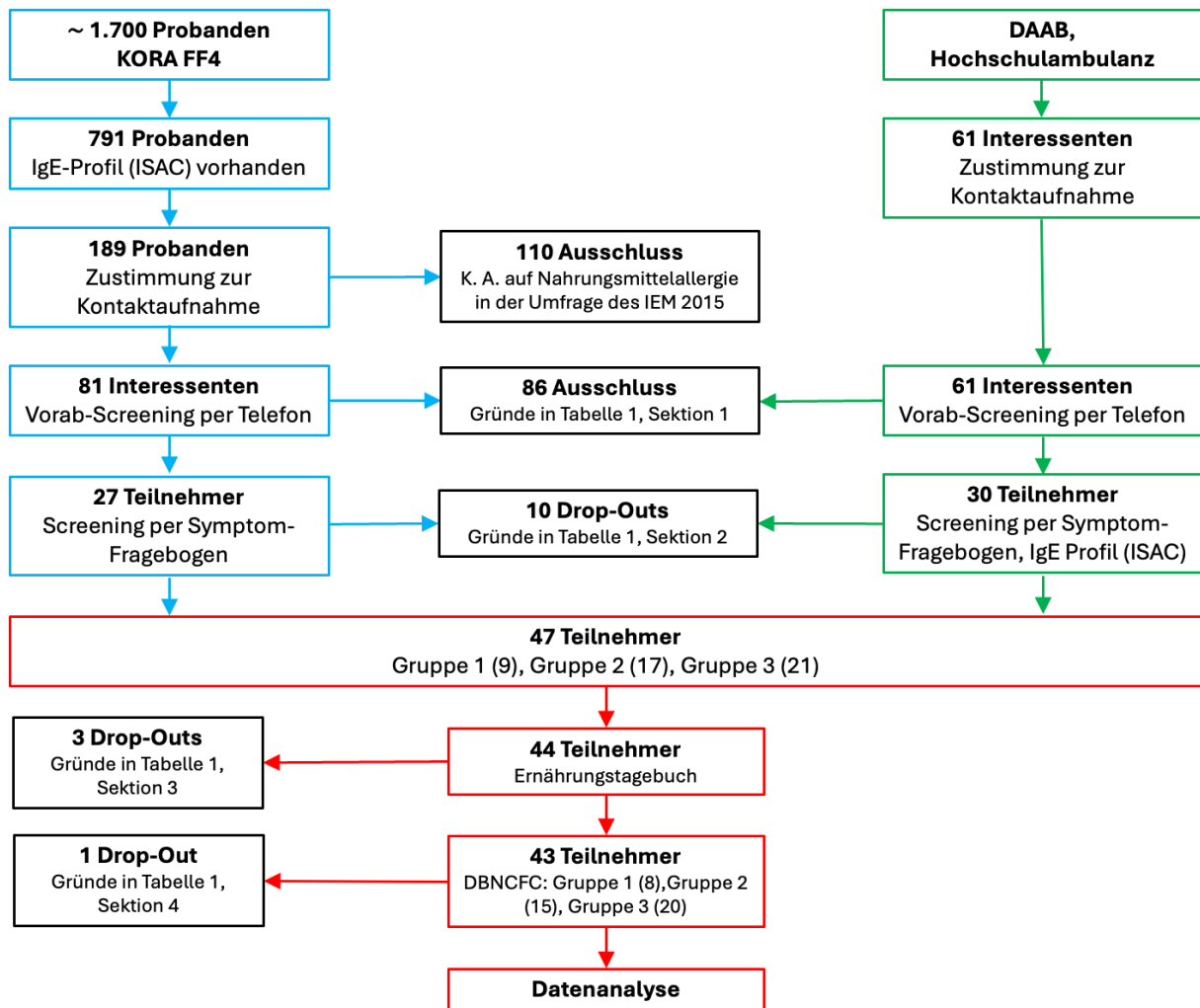


Abb. 4. Flowchart der Teilnehmer der doppelblinden, Nocebo-kontrollierten Nahrungsmittelprovokationsstudie in Augsburg. Die Gründe für Drop-Outs in den verschiedenen Phasen der Studie sind in Tabelle 1 aufgelistet.

2.4 Durchgeführte Provokationen und Dosen

Von den 43 vollständig provozierten Teilnehmern waren 8 der Gruppe 1 zugeordnet (Nahrungsmittelallergie +, passendes IgE +), 14 der Gruppe 2 (Pollen-Food-Syndrome +, spezifisches IgE+) und 18 der Gruppe 3 (Nahrungsmittelallergie/-Unverträglichkeit +, kein passendes IgE oder IgE negativ).

Tabelle 2 enthält eine Übersicht über die provozierten Nahrungsmittel und die entsprechenden Nocebos, aufgeschlüsselt nach Teilnehmergruppe.

Verum-Provokation	Nocebo-Provokation	IgE+ (j/n)	N	Drop-Out
Gruppe 3: NMI / IgE⁻ oder unpassend				
Laktose	Glucose	n	7	
Fruktose	Süßstoff	n	1	
Fruktose (Apfel)	Süßstoff	n	1	
Histamin	nur Brei	n	5	
Rohes Hühner-Ei	Speiseöl	n	1	
Putenfleisch	gehackter Tofu	n	1	
Erdnuss	gehackter Reis	n	2	
Garnelen	gehackter Tofu	n	1	
Sesamschrot	Haferflocken-Schrot	n	1	
			20	
Gruppe 2: PFS / IgE⁺				
Apfel	gekochter Apfel	j	5	
Pfirsich	gekochter Pfirsich	j	2	
Haselnuss	gehackter Reis	j	7	
Sojadrink	Haferdrink	j	1	
			15	
Gruppe 1: NMA / IgE⁺				
Erdnuss	gehackter Reis	j	4 (3)	1
Garnelen	gehackter Tofu	j	3	
Kabeljau	gehackter Tofu	j	1	
Miesmuschel	gehackter Tofu	j	1	
			9 (8)	
			Σ 44 (43)	

Tab. 2. Nahrungsmittelprovokation nach Gruppe. NMA: Nahrungsmittelallergie. PFS: Pollen-Food-Syndrome. NMI: Nahrungsmittel-Intoleranz. Ein Teilnehmer der Gruppe 1 (Erdnuss-Provokation) brach nach der ersten Provokation die Studienteilnahme ab (Drop-Out). Daher konnten nur 43 Teilnehmer vollständig provoziert werden.

Basis der Nahrungsmittelbreie

Die Basis für die provozierten Nahrungsmittel bzw. deren Nocebos war meistens ein hypoallergener Reisbrei (Beba Sinlac®, Nestlé), der durch Zugabe geeigneter Farb-, Süß- und Aromastoffe geschmacks-, geruchs- und manchmal auch farbverfremdet wurde.

Die Sinlac® Breie wurden am Vorabend der Provokation in der Stationsküche zubereitet, portioniert und in verschließbaren Tupperdosen im Kühlschrank bis zum nächsten Morgen aufbewahrt. Unmittelbar vor der Provokation wurden die Allergene bzw. Nocebo-Nahrungsmittel unter die Breie gemischt und die fertigen Portionen in die Untersuchungsräume im CCCA gebracht.

Für Fleisch-, Muschel-, Shrimp- und Fischzubereitungen wurde das Allergen einer Basis aus mit Raucharoma gewürztem „Chili con Carne“ (bei Vegetariern: „Chili sin Carne“) beigemischt. Die Chili-Zubereitungen wurden einmalig hergestellt, portioniert und eingefroren.

Erdnuss, Haselnuss

Rohe Erdnüsse und Haselnüsse wurden mit einem scharfen Messer sehr fein gehackt, das resultierende Pulver auf einer Feinwaage (kleinste Mengen) bzw. einer Küchenwaage eingewogen, die Portionen in Butterbrotpapier eingeschlagen und in sterile Plastikboxen gegeben, beschriftet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Als Nocebo für Erdnuss und Haselnuss diente gekochter, fein gehackter und getrockneter Reis. Die Erdnuss- bzw. Haselnusspulver bzw. der gehackte Reis wurden am Morgen der Provokation unter einen geschmacklich angepassten Sinlac® Brei gemischt und verabreicht. Die maximale kumulativ verabreichte Menge an Erdnüssen bzw. Haselnüssen betrug 18 g (Einzeldosen von 12 mg bis maximal 13 g).

Fleisch, Fisch und Meeresfrüchte

Fleisch, Fisch, Muscheln und Shrimps wurden in ungesalzenem Wasser zunächst gar gekocht und anschließend in einer Küchenmaschine püriert. Im Fall der Shrimps musste vor dem Pürieren Wasser zugegeben werden, da auch gekochte Shrimps sich in trockener Form nicht in der Küchenmaschine zerkleinern lassen. Die Trocknung der homogenisierten Shrimp-Masse erfolgte durch gründliches Auswringen der Masse in einem sauberen Küchenhandtuch, so dass das fertige Homogenisat nahezu wasserfrei war. Die Homogenisate wurden in sterilen Bechern portioniert und eingefroren. Als Nocebo diente feingehackter Tofu. Am Morgen vor der Provokation wurden die Chili-Portionen sowie die Portionen an Fleisch-, Fisch-, Muschel-, Shrimp- bzw. Tofu-Homogenisat aufgetaut (Chili: Mikrowelle; Homogenisat: Raumtemperatur), unter das Chili gemischt und verabreicht. Die maximal kumulativ verabreichte Menge an Fleisch, Fisch bzw. Meeresfrüchten betrug ca. 100 g Frischgewicht, entsprechend einer kleinen Restaurantportion (Einzeldosen von 0,1 g bis maximal 75 g).

Apfel und Pfirsich

Für die Provokation mit Früchten (Apfel, Pfirsich) wurde zunächst ein Brei aus frischem, ungeschältem (Verum) oder gekochtem, ungeschältem Obst (Nocebo) zubereitet. Für die Apfelprovokation wurde die Sorte „Granny Smith“ verwendet, da diese einen hohen Allergengehalt aufweist. Vor dem Pürieren des frischen Obstes in der Küchenmaschine wurde reichlich Zitronensäure und Vitamin C Pulver zugegeben, um eine Oxidation zu verhindern. Rohes und gekochtes Obst wurden geschmacklich und farblich durch Zugabe von Süßstoff, Backaromen (Dr. Oetker) und grüner Lebensmittelfarbe angeglichen. Die Obstbreie wurden portioniert, mit Sinlac® Brei gemischt und die fertigen Zubereitungen eingefroren. Kurz vor der Provokation wurden die Zubereitungen aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht und verabreicht. Die maximal verabreichte Menge an Apfel betrug 200g, entsprechend einem großen Apfel bzw. Pfirsich (Einzeldosen von 7 g bis maximal 125 g).

Soja

Aufsteigende Volumina an Sojadrink (Verum) bzw. Haferdrink (Nocebo) wurden mit Sinlac®-Brei gemischt. Damit jede verabreichte Portion am Ende die gleiche Menge an Flüssigkeit enthielt, mussten die Sinlac® Breie für die verschiedenen Portionen mit unterschiedlichen Breipulver-zu-Wasser Verhältnissen hergestellt werden. Die maximale kumulativ verabreichte Menge an Sojadrink betrug 144 g, entsprechend einem mittelgroßen Glas (Einzeldosen von 0,1 g bis maximal 110 g).

Sesam

Für die Provokation mit Sesam wurden Sesam-Samen aus dem Bioladen (Verum) bzw. Bio-Haferflocken (Nocebo) in einer Mühle geschrotet und verschiedene Mengen des Schrots unter einen Sinlac® Brei gemischt. Die maximale kumulativ verabreichte Menge an Sesam betrug 17g (Einzeldosen von 6 mg bis maximal 10 g).

Rohes Hühnerei

Für die Provokation mit rohem Hühnerei wurde ein Bio-Ei aufgeschlagen, verquirlt und in aromatisierten Sinlac® Brei eingerührt. Als Nocebo diente Keimöl in Sinlac® Brei. Die maximal kumulativ verabreichte Menge betrug ein rohes Ei bzw. 5 Teelöffel (TL) verquirltes Ei (Einzeldosen von 0,5 bis 2 TL).

Laktose, Fruktose

Die Zucker (Laktose, Fruktose) wurden jeweils in Sinlac® Brei gemischt. Als Nocebo für Laktose diente Glukose; als Nocebo für Fruktose musste flüssiger Süßstoff („JA“) verwendet werden, da die Süßkraft von Fruktose nur mit unverhältnismäßig großen Mengen an Glukose zu erreichen gewesen wäre. Die maximal kumulativ verabreichte Menge an Laktose bzw. Fruktose betrug ca. 100 g (Einzeldosen von 3 g bis maximal 50 g).

Histamin

Pulverförmiges Histamin-HCl (aus der Apotheke) wurde abgewogen, in Backpapier portioniert, bei Raumtemperatur in sterilen Behältern aufbewahrt und jeweils am Morgen der Provokation in Sinlac® Brei eingerührt. Als Nocebo diente nur Sinlac® Brei. Die maximal kumulativ verabreichte Menge an Histamin betrug 125 mg (Einzeldosen von 10 mg bis maximal 50 mg).

3. Zytokinprofile vor und nach Nahrungsmittelprovokation

Die Seren der Teilnehmer wurden im Labor der Umweltmedizin mittels Multiplex (Mesoscale Discovery) auf ein Panel an inflammatorischen Zytokinen untersucht. Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass, unabhängig von der Provokation (Verum, Nocebo) bzw. dem Zeitpunkt der Messung die Seren einzelner Teilnehmer eine erhöhte Konzentration einzelner Typ-2 Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) bzw. Alarmine (TSLP, IL-25, IL-33) aufwiesen (**Abbildung 5**).

Erhöhte IL-4 Konzentrationen wurden ausschließlich bei einzelnen Teilnehmern der Gruppe 3 (Histamin, Ei) beobachtet, erhöhte IL-5 Konzentrationen bei einem Teilnehmer der Gruppe 2 (Pfirsich) und bei drei Teilnehmern der Gruppe 3 (Laktose, Histamin, Ei). Deutlich erhöhte IL-13 Konzentrationen sah man bei einem Teilnehmer der Gruppe 2 (Pfirsich); leicht erhöhte auch bei einem Teilnehmer der Gruppe 1 (Erdnuss) und zwei Teilnehmern der Gruppe 3 (Laktose, Histamin).

Was die Alarmine betrifft, so waren erhöhte Konzentrationen an TSLP bei einem Probanden der Gruppe 2 (Pfirsich) sowie der Gruppe 3 (Laktose, Histamin, Ei) nachweisbar, während TSLP in den Gruppe 1 Probanden mit Erdnuss-Allergie deutlich niedriger lag als der Durchschnitt aller Proben. IL-25 war deutlich erhöht bei Probanden der Gruppe 2 (Pfirsich, Haselnuss) sowie in Gruppe 3 bei zwei der Laktose Probanden sowie bei einem Gruppe 3 Probanden mit Unverträglichkeit gegenüber Erdnuss. IL-33 war deutlich erhöht in einzelnen Gruppe 2 Probanden (Pfirsich, Haselnuss) sowie bei einem Teil der Gruppe 3 Probanden mit Laktose-Intoleranz sowie bei dem einen Probanden mit

Intoleranz gegenüber Ei. Eine leicht erhöhte Konzentration an IL-33 wurde bei einem Teil der Probanden mit Histamin-Intoleranz beobachtet.

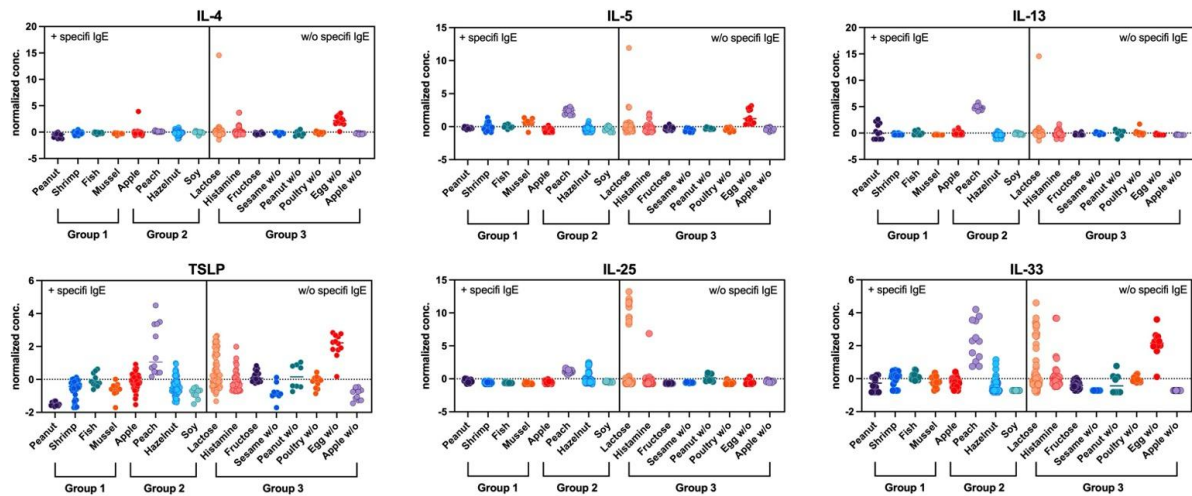


Abb. 5. Typ-2 Zytokine und Alarmine in Seren von Teilnehmern der DBNCFc. Gezeigt sind gepoolte Daten aller Probanden. Je Proband waren maximal 12 Seren vorhanden (2 prä- und 10 Post-Provokation), meistens waren es weniger.

Betrachtet man alle 13 gemessenen Zytokine (**Abbildung 6**), so fällt auf, dass einzelne Probanden eine Typ-2 und Alarmin-Signatur aufwiesen, andere eine mehr proinflammatorische Signatur. Diese individuellen Signaturen waren unabhängig von der Provokation (und blieb auch meist über beide Visiten stabil). Interessanterweise hatte ein Proband (ID 1108) deutlich unterschiedliche Zytokinprofile bei den beiden Visiten (Visite 1: TSLP^{high}; Visite 2: IFN- γ ^{high}), jedoch war dies jeweils unabhängig vom Zeitpunkt der Probenabnahme (prä-Provokation = post-Provokation). Zusammenfassend zeigt die präliminäre Auswertung der Zytokindaten ein komplexes Bild mit hohen interindividuellen Unterschieden, und die beobachteten Zytokinsignaturen lassen sich nicht ohne weiteres einzelnen Allergengruppen zuordnen. Vielmehr scheinen einzelne Probanden distinkte Typ-2 oder Alarmin-Signaturen zu haben, die unabhängig von der Provokation existieren. Eine detailliertere Auswertung der Daten, insbesondere in Kombination mit den individuellen IgE-Profilen, den klinischen Befunden aus Anamnese und Provokation und den Einträgen im Ernährungstagebuch ist unbedingt erforderlich, ist allerdings zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

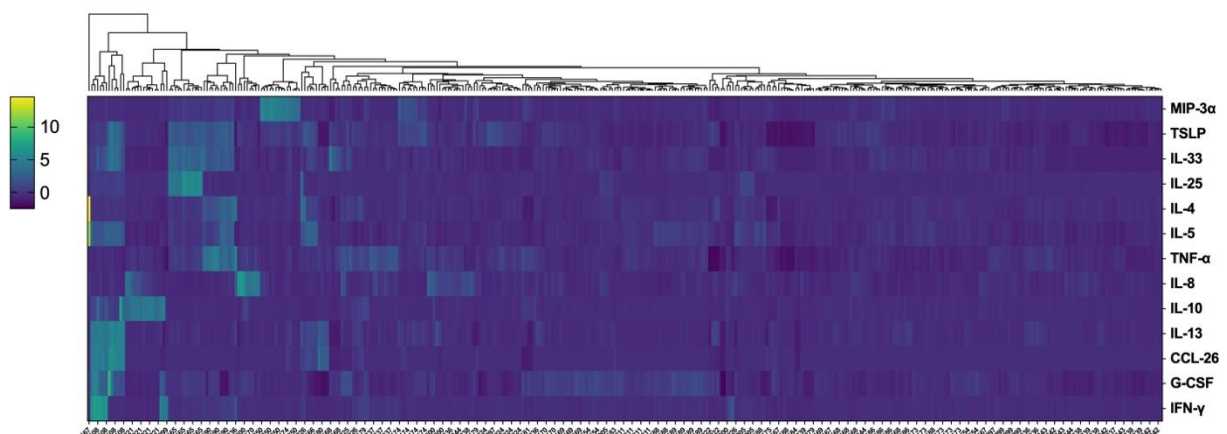


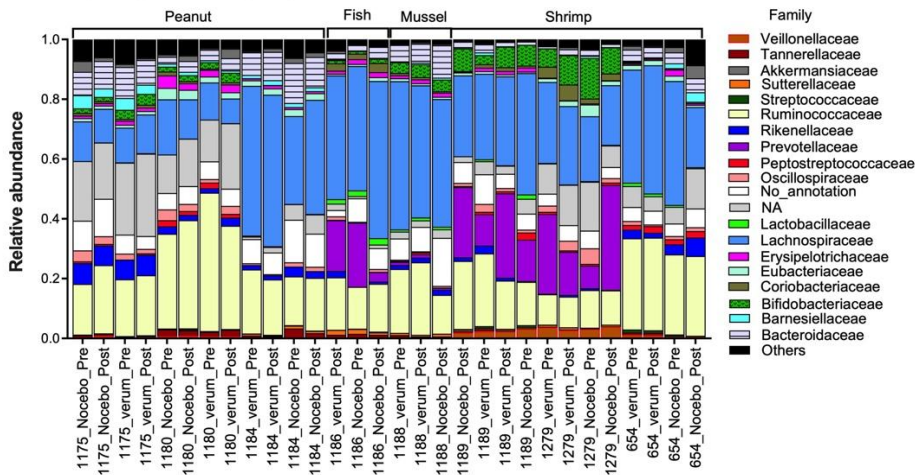
Abb. 6. Hierarchical Clustering der Daten nach Zytokinen und Teilnehmern. Auf der x-Achse sind die Teilnehmer-IDs dargestellt, auf der y-Achse die im Serum zu jedem Zeitpunkt gemessenen Zytokine. Deutlich erkennbar ist ein Cluster an Alarminen (IL-33, IL-25, TSLP), Typ-2 Zytokinen (IL-4, IL-5) und TNF- α , sowie ein davon distinktes Cluster aus IFN- γ , G-CSF und CCL-26. Diese beiden Cluster waren in einzelnen Probanden gegensätzlich exprimiert.

4. Stuhl-Mikrobiom vor und nach Nahrungsmittelprovokation

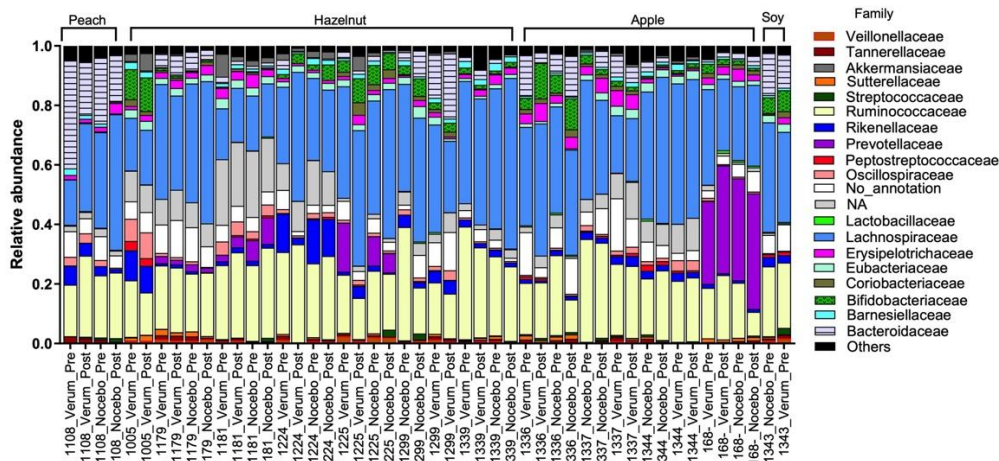
Die vor und nach den Provokationen gewonnenen Stuhlproben wurden auf Trockeneis ans ZIEL gesendet, wo die DNA extrahiert und eine Sequenzierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene durchgeführt wurde. Die Rohdaten wurden an die Umweltmedizin in Augsburg gesendet, wo sie mit Hilfe des dort entwickelten Tools „annot-IEM“ annotiert wurden. In einer präliminären Analyse wurden die so annotierten Daten auf Familie-, Genus- und Spezies-Level ausgewertet, wobei sich auf Genus und Spezies-Ebene eine stark ausgeprägte inter-individuelle Variabilität zeigte. Betrachtet man die Daten aller Probanden auf Familien-Ebene, so zeigen sich diese Muster ebenfalls: einzelne Probanden zeichneten sich durch spezifische Mikrobiom-Muster aus, die, unabhängig von der Visite und Provokation, stabil waren (**Abbildung 7**). Darüber hinaus waren keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den drei untersuchten Probanden-Gruppen (NMA, PFS, NMI) zu beobachten (**Abbildung 8**). Die bakteriellen Familien mit der höchsten relativen Häufigkeit waren Lachnospiraceae (ca. 30 %), Ruminococcaceae (ca. 20 %), und nicht-annotierte Familien (ca. 15 %), gefolgt von Prevotellaceae und Bacteroidaceae (jeweils ca. 5 %). Alle weiteren Familien waren zu weniger als 5 % vertreten.

Im nächsten Schritt werden wir, in Zusammenarbeit mit dem ZIEL und unseren Partnern aus SP 2, eine detailliertere Analyse der Mikrobiom-Daten durchführen. Beispielsweise ist der Versuch geplant, die Mikrobiome der DBNCFC-Probanden distinkten sog. Enterotypen zuzuordnen, die in den Baseline Mikrobiom-Daten aus KORA bereits identifiziert wurden. Leider waren unsere DBNCFC-Probanden nur teilweise aus der KORA-Kohorte. Möglicherweise lassen sich dennoch einzelne Enterotypen bei Teilnehmern eines bestimmten klinischen Phänotyps häufiger oder seltener identifizieren. Insbesondere werden wir die Mikrobiom-Daten unter Berücksichtigung der anderen gemessenen Parameter, d. h. der IgE- und Zytokinprofile, auswerten. Von unseren Partnern im SP 2 wurde bereits eine kombinierte Analyse des Baseline-Mikrobioms mit IgE Profilen in KORA FF4 durchgeführt. Die Ergebnisse unserer Studie könnten hierzu komplementäre Informationen liefern.

Group 1 (NMA+ IgE+)



Group 2 (PFS+ IgE+)



Group 3 (NMI+ IgE-)

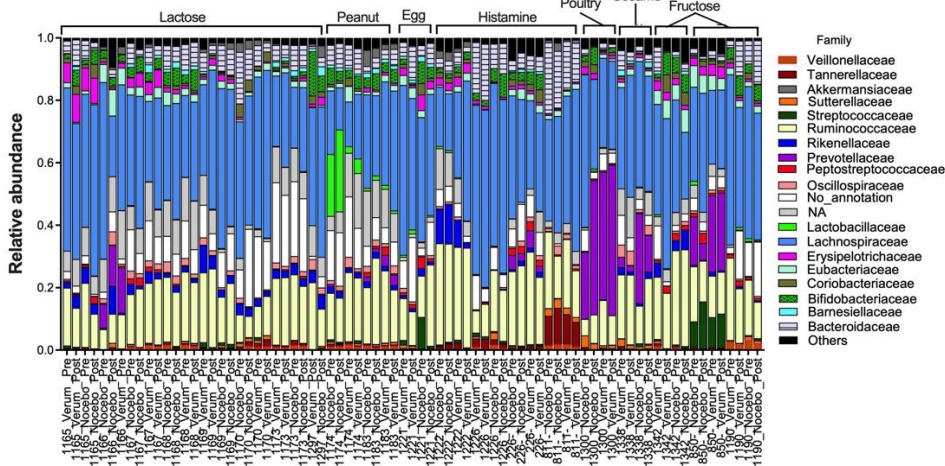


Abb. 7. Relative Häufigkeit von bakteriellen Familien im Stuhl-Mikrobiom der DBNFCF Probanden.

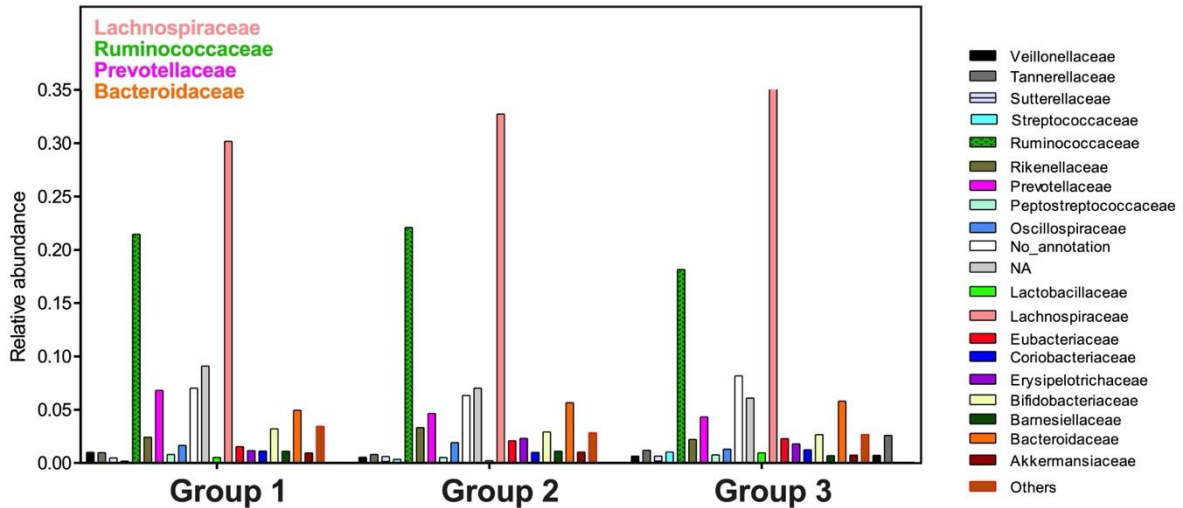


Abb. 8. Vergleich der Relativen Häufigkeit bakterieller Familien im Stuhl-Mikrobiom der drei DBNCF-C-Gruppen. Die am häufigsten in den Proben identifizierte bakteriellen Familien waren Lachnospiraceae > Ruminococcaceae > Prevotellaceae > Bacteroidaceae > nicht annotierte Familien. Alle übrigen Familien machten weniger als 5% aus.

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten:

Die ausgegebenen Personalkosten im Projektzeitraum beliefen sich auf insgesamt 103.917,79 €.

Von Januar bis Dezember 2022 wurden 79.500,64 € für die Beschäftigung einer ärztlichen wissenschaftlichen Mitarbeiterin (TVL-Ä1/4) und 24.417,15 € für eine technische Assistenz/Study Nurse (TVL-E9a/1) ausgegeben. Diese Personalausgaben waren notwendig zur erfolgreichen Durchführung der Nahrungsmittelprovokation.

Sachkosten:

Die ausgegebenen Sachkosten beliefen sich auf insgesamt 76.326,36 €.

Hiervon fiel ein Posten mit knapp 22.000 € auf die Anschaffung der ISAC 112 Assays (Thermo Fisher) zur Erstellung der IgE Profile der KORA FF4 Teilkohorte. Ein weiterer großer Posten waren etwa 18.000 € an Aufwandsentschädigungen für die Teilnehmer der Nahrungsmittelprovokation. (Begründung: Eine Aufwandsentschädigung von 400,- € pro Person war notwendig, um teilnahmewillige Probanden für die Studie gewinnen zu können.) Der größte Posten innerhalb der Sachmittel waren 27.383 € für Bedarf an Labor-Diagnostika. Hierunter fielen die Mesoscale Discovery (MSD) Assays für die Serum Zytokin-Diagnostik (430 Proben aus dem klinischen Verlauf). Die restlichen Sachkosten entfallen auf kleinere Ausgaben für Labordiagnostik, Arznei- und Verbandmittel, sonstiges Verbrauchsmaterial für die klinische Studie sowie sonstige Ausgaben, u. a. für die Nahrungsmittelzubereitung, Wegeunfallversicherung für die Probanden und Porto für den Probenversand.

5. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die geleisteten Projektarbeiten waren für den Erfolg des Verbundprojektes unbedingt notwendig, da Ergebnisse der anderen SPs auf Ergebnissen aus SP2-2 beruhen. Insbesondere ist dies der Fall für folgende Projektarbeiten aus SP2-2:

- IgE-Profile der KORA FF4-Kohorte (notwendig für SP2-1 – Standl/Peters, SP7 – Haller, SP8 – Schmidt-Weber)
- IgE Profile der GINI- und LISA-Kohorten (notwendig für SP2-1 – Standl/Peters und SP1 – von Mutius)
- Klinische Phänotypen der KORA FF4 Probanden (SP2-1 – Standl/Peters; SP7 – Haller)
- Klinische Verlaufsproben (Seren, Stuhlproben) aus der DBNCFC (SP7 – Haller; SP8 – Schmidt-Weber) für Mikrobiom- und miRNA- (liquid biopsy) Analysen

Sowohl die Bestimmung der IgE-Profile als auch die klinische Studie (DBNCFC) wurden in angemessenem Umfang gemäß des ursprünglichen Projektplans durchgeführt und erfüllten die notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Implementation der Zusammenarbeit mit den o. g. SPs.

6. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

a) Nutzen, Verwertbarkeit

Die präliminäre Auswertung der Ergebnisse von SP2-2, wie oben ausgeführt, liefert den Kernbefund, dass bei einigen Patienten aus der Gruppe 3 (= berichtete Nahrungsmittelunverträglichkeiten ohne zur Klinik passende IgE Profile) eine ausgeprägte Typ-2- und / oder Alarmin-Signatur im Serum nachweisbar war, und zwar unabhängig vom Verzehr des als problematisch empfundenen Nahrungsmittels. Dies könnte darauf hinweisen, dass ein Teil der von Erwachsenen berichteten Nahrungsmittelunverträglichkeiten auf systemische Änderungen im Immunsystem zurückzuführen sind. Falls sich dieser interessante Befund in prospektiven Studien bestätigen lässt, könnte es in der Eröffnung neuer Therapieoptionen resultieren, bspw. dem „Repurposing“ von Medikamenten und Biologicals, die bisher für andere Erkrankungen aus dem Atopie-Spektrum (z.B. Atopische Dermatitis, Asthma) zugelassen sind. Außerdem könnten sich mögliche Überschneidungen in der Prävention von Atopie und Nahrungsmittelunverträglichkeiten ergeben.

b) Konkrete Planung für die nähere Zukunft

Die bisherige Auswertung der miRNA (liquid biopsy) und des Stuhl-Mikrobioms der klinischen Verlaufsproben lieferten analoge Ergebnisse zu den Befunden der Zytokinanalyse. Es ist jedoch in der nahen Zukunft noch eine tiefere bioinformatische Auswertung nötig. Geplant ist insbesondere ein *mapping* der erhobenen Stuhl-Mikrobiom-Daten aus der Provokationsstudie auf einen bestehenden

Datensatz aus den KORA Baseline Proben, anhand derer unterschiedliche „Enterotypen“ im Core-Mikrobiom identifiziert worden waren (Claus Neuhaus, persönliche Mitteilung). Wir erwarten, dass die Core-Mikrobiome der symptomatischen Teilnehmer der Provokationsstudie, insbesondere der interessanten Gruppe 3, sich gehäuft bestimmten Enterotypen zuordnen lassen. Diese lassen sich dann mit den Metadaten der KORA-Kohorte abgleichen, um Zusammenhänge zwischen dem Enterotyp, dem klinischen Phänotyp und einzelnen Umwelt-, Lebensstil- und intrinsischen Faktoren (z. B. BMI, Bauchumfang) herauszuarbeiten (Troll et al., *Microorganisms* 2020; doi: 10.3390/microorganisms804054).

7. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es ist mir nichts bekannt.

8. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die Ergebnisse der IgE-Typisierung sind bereits in zwei Publikationen aus dem Konsortium eingegangen (Vasovets et al., Maier et al., siehe unten). Die klinischen Ergebnisse der DBNCFC sowie die Stuhl-Mikrobiom- und Serum-Zytokindaten im klinischen Verlauf werden in Zusammenarbeit mit SP7 und SP8 bis Ende 2026 publiziert.

- Vasovets O, Standl M, Maier L, Gilles S, Grallert H, Traidl-Hoffmann C, Peters A, Müller CL. The role of IgE patterns and their link to the gut microbiome in allergic sensitization. *Cell Host & Microbe* (submitted)
- Maier L, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of food allergy and IgE-sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2025 (accepted)