



**Strukturelle Modifikation der Hauptallergene  
aus Sellerie und Karotte zur Reduktion der  
allergenen Reaktivität und Verwendung als  
mögliche Immuntherapeutika**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Chemie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Andrea Wangorsch**  
aus Mellrichstadt/Rhön

Frankfurt (2016)  
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie, Pharmazie (14) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann  
Prof. Dr. Stefan Vieths

Datum der Disputation: 22.02.2017

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung in die Typ-I-Allergie.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Nahrungsmittelallergie.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Birkenpollenassoziierte Nahrungsmittelallergie.....	5
1.2.2 Sellerie- und Karottenallergie.....	6
1.2.3 Nomenklatur von Allergenen.....	7
1.2.4 Allergene aus Sellerie und Karotten.....	8
1.2.4.1 Hauptallergen aus Sellerie: Api g 1.....	9
1.2.4.2 Hauptallergen aus Karotte: Dau c 1.....	10
1.2.4.3 Proteinstruktur von Api g 1 und Dau c 1.....	11
<b>1.3 Therapie von Allergien.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Spezifische Immuntherapie.....	13
1.3.1.1 Spezifische Immuntherapie der Lebensmittelallergie.....	14
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Problemstellung.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Arbeitshypothese, Zielsetzung und Arbeitskonzept.....</b>	<b>17</b>
<b>3 Materialien.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Chemikalien.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Geräte.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Pufferlösungen, Nährmedien und Nährböden.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Primer.....</b>	<b>25</b>

<b>3.6 Bakterienstämme</b> .....	<b>26</b>
<b>3.7 Antikörper</b> .....	<b>26</b>
3.7.1 Patientenseren.....	27
3.7.1.1 Patientenkollektiv.....	27
3.7.1.2 Kontrollgruppenkollektiv.....	31
<b>4 Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
4.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese.....	32
4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
4.1.2.1 Fusions-PCR.....	33
4.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	33
4.1.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	34
4.1.5 Restriktionsverdau.....	34
4.1.6 Ligation von DNA in Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	34
4.1.6.1 Ligation in den Klonierungsvektor pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> .....	34
4.1.6.2 Ligation in Expressionsvektoren.....	35
4.1.7 Mutation von DNA.....	35
4.1.8 Transformation von Bakterien.....	36
4.1.9 Selektion der transformierten Bakterien.....	36
4.1.9.1 Blau-weiß-Selektion von Bakterienkolonien.....	37
4.1.9.2 Kolonie-PCR.....	37
4.1.10 DNA-Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	37
4.1.11 DNA-Sequenzierung.....	38
<b>4.2 Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>38</b>
4.2.1 Expression rekombinanter Proteine.....	38
4.2.2 Zellaufschluss induzierter Bakterien.....	39
4.2.2.1 Nativer Zellaufschluss.....	39
4.2.2.2 Denaturierender Zellaufschluss.....	39



4.2.3	Reinigung rekombinanter Proteine.....	40
4.2.3.1	Präparative SDS-PAGE mittels Prep Cell.....	40
4.2.3.2	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)....	41
4.2.3.3	Acetonfällung von Proteinen.....	41
4.2.4	Proteinanalytik.....	42
4.2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	42
4.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
4.2.4.3	Proteinfärbung.....	43
4.2.5	Endotoxine in rekombinanten Proteinen.....	43
4.2.5.1	Bestimmung des Endotoxingehaltes.....	43
4.2.5.2	Abreicherung von Endotoxinen mittels Endo-Trap-Säulen.....	43
4.2.6	CD-Spektroskopie.....	44
4.2.6.1	Aufnahme von CD-Spektren.....	44
4.2.6.2	Aufnahme von Denaturierungskurven mittels CD-Spektroskopie. .	45
4.2.7	Modellierung der theoretischen 3D-Struktur von Proteinen.....	45
<b>4.3</b>	<b>Immunochemische Methoden.....</b>	<b>45</b>
4.3.1	ELISA.....	45
4.3.1.1	Humaner IgE-ELISA.....	45
4.3.1.2	Muriner IgG-ELISA.....	46
4.3.2	ELISA-Inhibition.....	47
4.3.2.1	Bestimmung der Serenverdünnung mittels Titrationskurve.....	47
4.3.2.2	Durchführung der ELISA-Inhibition.....	47
4.3.3	Bestimmung von spezifischem IgE in Humansenen mittels EAST.....	48
4.3.3.1	Herstellung von Allergenscheiben.....	48
4.3.3.2	Durchführung des EAST.....	49
4.3.4	Mediatorfreisetzung mittels der RBL-Zelllinie.....	49
<b>4.4</b>	<b>Tierexperimentelle Arbeiten.....</b>	<b>50</b>
4.4.1	Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Karottenallergenen.....	50
4.4.2	Finale Blutentnahme.....	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>

<b>5.1 Klonierung der Allergene Api g 1.01, Dau c 1.01 und Dau c 1.02.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Klonierung der Isoform Api g 1.0201.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 Klonierung von Dau c 1-Oligomeren.....</b>	<b>54</b>
5.3.1 Konstruktion eines Fusionsproteins aus den beiden Dau c 1 Isoformen.....	54
5.3.2 Klonierung eines Dau-c-1.0104-Trimers.....	56
<b>5.4 Gerichtete Mutationen von Api g 1.01, Api g 1.02, Dau c 1.01 und Dau c 1.0201.....</b>	<b>57</b>
5.4.1 Mutation von Api g 1.01 im Bereich der P-Loop-Region.....	57
5.4.2 Zerstörung der Struktur mittels gerichteter Mutation.....	60
<b>5.5 Auflistung aller klonierten Proteine.....</b>	<b>60</b>
<b>5.6 Expression und Reinigung der Allergene aus Sellerie und Karotte.....</b>	<b>61</b>
5.6.1 Expression und Reinigung der Sellerieallergene.....	62
5.6.1.1 Vergleich der Isoformen und Mutanten von Api g 1.....	64
5.6.2 Expression und Reinigung der Karottenallergene.....	65
5.6.2.1 Native Reinigung von Dau c 1.01 und Dau c 1.02.....	65
5.6.2.2 Denaturierende Reinigung der Mutanten und Oligomere.....	66
<b>5.7 Strukturelle Untersuchungen der rekombinanten Allergene aus Sellerie und Karotte mittels CD-Spektroskopie.....</b>	<b>69</b>
5.7.1 Sekundärstruktur der rekombinanten Sellerieallergene.....	69
5.7.2 Sekundärstruktur der rekombinanten Karottenallergene.....	71
<b>5.8 Immunologische Untersuchungen der Sellerieproteine.....</b>	<b>72</b>

5.8.1 Patientenkollektiv.....	72
5.8.2 Detektion der IgE-Bindungskapazität der Sellerieproteine mittels ELISA .....	73
5.8.3 ELISA-Inhibition.....	77

## **5.9 Untersuchung der Karottenproteine auf ihre allergene**

### **Potenz.....81**

5.9.1 Patientenkollektiv Karotte.....	81
5.9.2 Immunologische Aktivität der Dau-c-Proteine im EAST.....	81
5.9.3 Bestimmung des Endotoxingehaltes der Karottenproteine.....	84
5.9.4 Untersuchungen der Antigenität im Tiermodell.....	85
5.9.4.1 Bestimmung des IgG-Gehalts in Seren immunisierter Mäuse mittels ELISA.....	85
5.9.4.2 Inhibition der Bindung von humanem spezifischem IgE an Karottenallergene mittels murinem Serum.....	89
5.9.4.3 Spezifische IgE-Antwort der immunisierten Mäuse.....	90
5.9.4.4 Kreuzreaktivität der murinen IgE-Antikörper.....	93

## **6 Diskussion.....95**

### **6.1 Herstellung und Charakterisierung der Allergene und Allergenmutanten aus Sellerie und Karotte.....95**

6.1.1 Klonierung, Mutation und Oligomerisierung der Sellerie und Karottenproteine.....	95
6.1.1.1 Klonierung der Isoform Api g 1.0201.....	95
6.1.1.2 Mutation der beiden Isoformen von Api g 1 und Dau c 1.....	96
6.1.1.3 Multimerisierung der Karottenallergene.....	97
6.1.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Allergene und Allergenmutanten.....	98
6.1.2.1 Rekombinante Sellerieproteine.....	98
6.1.2.2 Rekombinante Karottenproteine.....	99

6.1.3 Charakterisierung der rekombinanten Proteine.....	100
6.1.3.1 Bestimmung der Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine .....	101
<b>6.2 Auswirkung der gerichteten Mutagenese von Allergenen auf deren Antikörper-Bindungskapazität.....</b>	<b>103</b>
6.2.1 IgE-Bindungseigenschaften der Sellerieallergene und Mutanten.....	104
6.2.2 Auswirkung der Mutagenese von Dau c 1 auf dessen IgE- Bindungseigenschaften.....	110
6.2.3 Immunogenität von Dau c 1, dessen Isoformen und Mutanten.....	114
<b>6.3 Ausblick.....</b>	<b>117</b>
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>120</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>.....</b>
<b>9.1 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>.....</b>
<b>9.2 Sequenzen und Plasmidkarten.....</b>	<b>139</b>
9.2.1 Sequenzen.....	139
9.2.2 Plasmidkarten.....	142
<b>9.3 Danksagung.....</b>	<b>145</b>
<b>9.4 Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>147</b>
<b>9.5 Publikationen und Präsentationen.....</b>	<b>148</b>
<b>9.6 Lebenslauf.....</b>	<b>152</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Typ-I-Allergie

In industrialisierten Ländern nehmen Krankheiten, wie allergische Rhinokonjunktivitis, Asthma und atopische Dermatitis in den letzten Dekaden stetig zu, was zu einer erhöhten Krankheitsbelastung der Bevölkerung und erniedrigten Lebensqualität der Betroffenen führt<sup>1,2</sup>. Bereits vor über hundert Jahren hat Clemens Freiherr von Pirquet erstmals das Phänomen der Allergie (griechisch: allos = Fremdreaktion) beschrieben<sup>3</sup>. Eine genaue Nomenklatur des Begriffes Allergie wurde 2004 von der Welt-Allergie-Organisation (WAO) festgelegt und veröffentlicht<sup>4</sup>. Demnach ist die allergische Reaktion eine spezifische, immunologisch bedingte Überreaktion (Hypersensitivität) auf normalerweise harmlose, nicht infektiöse Stoffe. Die Hypersensitivität wird anhand ihrer Art von Immun- und Effektormechanismen in vier Klassen (Typ I – Typ IV) eingeteilt, wie sie in Tabelle 1 dargestellt sind.

*Tabelle 1: Klassifikation der immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen.*

Art der Hypersensitivität	Immunmechanismen	Effektormechanismen
Soforttyp: Typ I	IgE-Antikörper	Mastzellen, Basophile und deren Mediatoren
Antikörper vermittelt: Typ II	IgM-, IgG-Antikörper gegen Zelloberflächenantigene oder extrazelluläre Matrixantigene	Opsonisierung und Phagozytose, Komplement und Fc-Rezeptor vermittelte Aktivierung von Leukozyten
Immunkomplex vermittelt: Typ III	IgM, IgG Antikörper, Immunkomplexe zirkulierender Antigene	Komplement- und Fc Rezeptor vermittelte Aktivierung von Leukozyten
T-Zell vermittelt: Typ IV	- CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen - CD8 <sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen	- Makrophagen Aktivierung, - direkte Tötung der Zielzellen

*(verändert nach Abbas et al. 2007<sup>5</sup>)*

Die Immunantworten der Allergie werden gerne in Immunglobulin E (IgE) vermittelte und nicht IgE vermittelte Reaktionen unterteilt. Zu den nicht IgE vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen zählen die Kontaktdermatitis (Typ IV), zytotoxische Reaktionen, wie sie bei manchen Arzneimittelallergien und der

Rhesusinkompatibilität vorkommen (Typ II), und die seltener gewordene Serumkrankheit (Typ III) (s. Tab. 1)<sup>6</sup>.

Bei der IgE vermittelten Allergie (Typ I) tritt in der Regel eine sehr schnelle Reaktion auf das Antigen auf, weshalb hier auch von einer Hypersensitivität des Soforttyps gesprochen wird. Auch die Nahrungsmittelallergie, welche im Fokus dieser Arbeit steht, ist eine Typ-I-Allergie, weshalb im folgenden diese Art der Hypersensitivität stets als Allergie bezeichnet wird.

Die Reaktionen der IgE vermittelten Allergie treten in der Regel sehr schnell nach Kontakt mit dem auslösenden Agens aus und können von leichteren Symptomen wie Rhinitis, atopischer Dermatitis und Urtikaria bis zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks reichen. Ausgelöst wird die Typ-I-Reaktion durch ein Zusammenspiel von gebildeten IgE-Antikörpern und Mastzellen. Wie bei vielen anderen pathologischen Immunreaktionen, untergliedert man die allergische Reaktion in zwei Phasen, die Sensibilisierungsphase und die Manifestationsphase (Abb. 1.1).

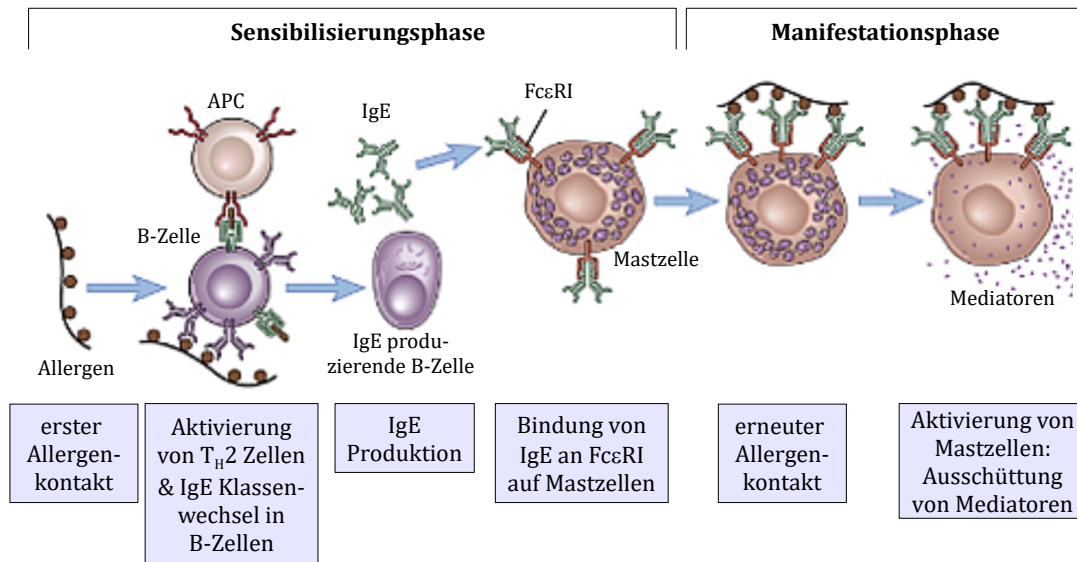


Abb. 1.1: Pathomechanismus der Typ I Allergie (verändert nach Abbas et al. 2007<sup>5</sup>).

Die Sensibilisierungsphase ist die Phase des ersten Kontaktes mit dem Antigen, welche noch keinerlei Symptome hervorruft. Im Fall der Allergie werden die eigentlich nicht pathogenen Antigene als Allergene bezeichnet<sup>5</sup>. Dies sind meist Proteine, aber auch reine Kohlehydratketten oder niedrig molekulare Chemikalien

werden als Allergene postuliert<sup>6</sup>. Während des Erstkontaktes mit einem Allergen wird dieses von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und an deren Oberfläche präsentiert. Als APCs spielen im Fall der Allergie vor allem dendritische und Langerhans-Zellen eine entscheidende Rolle, aber auch Makrophagen und B-Zellen können als APCs fungieren<sup>6</sup>. In der Regel werden die aufgenommenen Allergene in den APCs zu kleinen Bruchstücken, sogenannten Peptiden verarbeitet, welche anschließend an die Oberfläche der Zelle transportiert und dort über den Haupthistokompatibilitätskomplex II (engl. Major Histocompatibility Complex; Abk. MHC II) naiven T-Helferzellen ( $T_H0$ ) angeboten werden. Gleichzeitig sezernieren die APCs humorale Faktoren, wie Interleukine, die zur Aktivierung der  $T_H0$ -Zellen benötigt werden. Bei Atopikern, Patienten mit einer individuellen oder familiär bedingten Prädisposition eine Allergie zu entwickeln<sup>4</sup>, expandieren die Allergen stimulierten T-Zellen vorwiegend zu einer  $T_H2$ -Subpopulation, während in gesunden Individuen meist  $T_H1$ -Zellen gebildet werden<sup>6</sup>.  $T_H1$ -Zellen, welche Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ausschütten, expandieren vor allem in Anwesenheit von IL-12<sup>7</sup>. Liegt allerdings ein IL-4 Milieu vor, wie es in der Regel bei der Pathogenabwehr der Fall ist, so proliferieren die T-Zellen vorrangig zu  $T_H2$ -Zellen. Diese schütten die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5 und IL-13 aus, was in B-Zellen einen Wechsel der Immunglobulinklasse zu IgE produzierenden Plasmazellen begünstigt<sup>8</sup>. Das gebildete allergenspezifische IgE kann nun über den hoch affinen Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor an der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen gebunden werden<sup>9,10</sup>. Während dieser Sensibilisierungsphase kommt es zu keinen allergischen Reaktionen, diese treten erst in der Manifestationsphase auf.

Kommt es nach Ausbildung der Sensibilisierung zu einem erneuten Kontakt mit den Allergenen, so binden diese an das in der Sensibilisierungsphase gebildete antigenspezifische IgE. Multivalente Allergene mit mehreren IgE-Bindungsstellen (Epitope), können dabei mehrere an die Oberfläche von Effektorzellen gebundene IgE-Antikörper quervernetzen (s. Abb. 1.1 Manifestationsphase). Diese Rezeptor-Aggregation führt zu einer Reihe von Signalwegen, die die de novo Synthese und Ausschüttung von Mediatoren, wie Histamin, Tryptase, Leukotrienen und Prostaglandinen zur Folge haben<sup>6,9,11,12</sup>. Diese Mediatoren sind die Auslöser der typischen klinischen Symptome der Allergie.

## 1.2 Nahrungsmittelallergie

Neben den am weitesten verbreiteten Allergien auf Pollen sind auch Allergien auf Proteine in Nahrungsmitteln möglich. Einige der häufigsten allergieauslösenden Nahrungsmittel sind Soja, Erdnuss, Nüsse, Fisch, Schalentiere und Weizen, welche zum Teil lebensbedrohliche oder letale Reaktionen (anaphylaktischer Schock) auslösen<sup>13</sup>. Die Diagnose und Bestätigung einer echten Nahrungsmittelallergie ist komplex. In vielen Fällen werden Anamnesen nur anhand von Selbstauskünften mittels Fragebögen erstellt. Anhand dessen leiden bis zu 35% der Bevölkerung an einer Nahrungsmittelallergie<sup>2</sup>. Geeigneter ist allerdings die Durchführung einer Provokation mit dem Nahrungsmittel selbst. Goldstandard ist hierbei die doppelblinde, Placebo- kontrollierte orale Nahrungsmittelprovokation DBPCFC (engl. „*double-blind, placebo-controlled food challenge*“) <sup>14,15</sup>. Laut Studien, die auf einer Provokation mit dem Nahrungsmittel beruhen, leiden 1-10% der Bevölkerung an einer Nahrungsmittelallergie<sup>16,17</sup>. Die allergieauslösenden Proteine in Nahrungsmitteln können in tierische und pflanzliche Proteine unterteilt werden. Zu den tierischen Allergenen gehören die Caseine aus Milch, Ovomuroid aus dem Hühnereiweiß, Parvalbumine aus Fisch und Tropomyosine aus Schalen- und Weichtieren (18–20). Pflanzliche Allergene kommen ubiquitär in vielen Früchten vor. In Nord- und Mitteleuropa wurden Allergene am häufigsten in Haselnuss, Apfel Sellerie und Karotte nachgewiesen, während in Südeuropa neben Haselnuss auch Pfirsich eine bedeutende Rolle unter den pflanzlichen Allergenquellen spielt. Allergene aus pflanzlichen Nahrungsmitteln lassen sich anhand ihrer Proteinstruktur in vier Untergruppen einteilen: die Prolamin-Superfamilie, die Cupin-Familie, die Bet v 1 (Hauptallergen der Birke)-Familie und die Profiline<sup>21-23</sup>. Die Allergene der Prolamin- und Cupin-Familie, welche vor allem in Nüssen und Hülsenfrüchten vorkommen, sind meist Speicherproteine und Abwehrproteine, welche eine hohe Stabilität gegenüber den Enzymen des gastrointestinalen Trakts aufweisen und somit über die Darmschleimhaut das Immunsystem in intakter Form erreichen können<sup>6,23</sup>. Hier kommt es wie in Kapitel 1.1 beschrieben zur Ausbildung einer IgE vermittelten Typ-I-Allergie. Typische Reaktionen sind Durchfall, Erbrechen und Blutdruckabfall bis hin zum anaphylaktischen Schock<sup>2,6</sup>. Die in Nord- und Mitteleuropa am häufigsten vorkommenden allergischen



Symptome, wie orales Allergiesyndrom (OAS), Symptome der Atemwege und der Haut, werden vor allem durch Allergene der Bet v 1-Familie ausgelöst<sup>24,25</sup>. Da diese Proteinfamilie ein zentrales Thema dieser Arbeit darstellt, wird sie gesondert in Kapitel 1.2.1 beschrieben. Die Profiline sind cytosolische Proteine, welche ubiquitär in allen Eukaryoten vorkommen. Durch ihre hohe Sequenzidentität von bis zu 85% in unterschiedlichen Spezies<sup>21</sup>, kann es zu IgE-Kreuzreaktivitäten zwischen Pollen- und Nahrungsmittelprofilinen kommen (s. Kap. 1.2.1). Da die Profiline gegenüber Hitze und Verdauungsenzymen nicht stabil sind, verursachen sie in der Regel ein OAS<sup>21</sup>.

### **1.2.1 Birkenpollenassoziierte Nahrungsmittelallergie**

Eine besondere Form der IgE vermittelten Nahrungsmittelallergie wird durch Kreuzreaktionen zwischen Pollen und Nahrungsmitteln verursacht. Hierbei ist nicht das Nahrungsmittel selbst das sensibilisierende Agens, sondern eine vorangegangene inhalative Sensibilisierung auf aerogene Pollen<sup>26</sup>. Eine Vielzahl von Birkenpollenallergikern sind auf ein cytoplasmatisches Protein aus den Pollen sensibilisiert, welches zu den sogenannten Abwehrproteinen 10 (engl. „pathogenesis-related proteins“) kurz PR-10 gehört<sup>23</sup>. Dieses Protein, anhand der Nomenklatur von Allergenen (Kap. 1.2.3; [www.allergen.org](http://www.allergen.org)) in Anlehnung an den botanischen Namen *Betula verucosa* Bet v 1 genannt, zeigt hohe Ähnlichkeiten zu anderen PR-10-Proteinen aus Obst und Gemüse. Hierbei handelt es sich vor allem um Homologien in der Konformation der Proteine<sup>27,28</sup>. In der Sensibilisierungsphase gebildete, gegen Bet v 1 gerichtete IgE-Antikörper sind in der Lage auch Epitope anderer PR-10-Proteine, z.B. aus Sellerie, Apfel, Kirsche und Karotte zu erkennen, diese zu binden und eine allergische Reaktion auf das Nahrungsmittel auszulösen. Somit kommt es bei bis zu 70% der Birkenpollenallergiker beim Verzehr von rohem Obst und Gemüse oder auch Nüssen zu einem oralen Allergiesyndrom<sup>29,30</sup>. Meist bleibt das OAS das einzige Symptom bei der Bet v 1 assoziierten Nahrungsmittelallergie. Als Grund dafür wird unter anderem die Instabilität der PR-10-Proteine bezüglich Erhitzen angesehen.

Neben dem Hauptallergen Bet v 1 sind auch andere ubiquitär vorkommende Proteine, wie Profiline und nicht spezifische Lipid-Transfer-Proteine (nsLTP) für

IgE-Kreuzreaktivitäten zwischen Pollen und Nahrungsmitteln verantwortlich. Diese sind für die Arbeit aber nicht weiter von Bedeutung und werden somit nicht näher beschrieben.

### **1.2.2 Sellerie- und Karottenallergie**

Mittels einer systematischen retrospektiven Auswertung von Daten von Nahrungsmittelallergikern in der Schweiz, konnten Etesamifar et al.<sup>26</sup> zeigen, dass dort Gemüse, Nüsse und Obst die häufigsten Auslöser einer Nahrungsmittelallergie sind. Sellerie, mit einer Prävalenz von 36%, ist dabei das häufigste Allergie auslösende Gemüse. 25% der Nahrungsmittelallergiker hatten eine Allergie auf Karotte. Eine ähnliche Studie in Deutschland ergab, dass rund 30% aller Patienten mit einer pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie positiv im Prick-zu-Prick-Test auf Sellerie reagieren<sup>31</sup>. Burney et al., die in einer Multicenterstudie die Prävalenz und Verteilung von IgE-Sensibilisierungen auf Nahrungsmittel in Europa untersucht haben, konnten zeigen, dass 3,5% bzw. 3,6% aller getesteten Personen auf Sellerie bzw. Karotte sensibilisiert sind<sup>32</sup>. In der Regel zeigen Sellerie- und Karottenallergiker ein orales Allergiesyndrom, aber auch gastrointestinale Beschwerden und anaphylaktische Reaktionen sind beschrieben<sup>26,33-35</sup>. Wie in Kap. 1.2.1 dargestellt handelt es sich bei Allergien auf Gemüse oft um eine Kreuzreaktion von Pollen spezifischen IgE Antikörpern, auf Antigene aus Gemüse, die der gleichen Proteinfamilie angehören. Bereits 1985 haben Wüthrich et al. das "Sellerie-Karotten-Beifuß-Gewürz-Syndrom" beschrieben<sup>36</sup>. Später wurde auch Birke, als ursprünglicher Auslöser der Allergie mit eingeschlossen, so dass der Begriff „Sellerie-Beifuß-Birkenpollen-Syndrom“ geprägt wurde<sup>37</sup>. Während bei der Kreuzallergie mit Beifuß vor allem die Gruppe der Profiline die Allergien verursachen, sind es bei der Kreuzreaktion mit Birke hauptsächlich die PR-10-Proteine, was meist mit der Schwere der allergischen Reaktion korreliert. Patienten mit einem Birkenpollen-Sellerie-Syndrom reagieren nach Ingestion von rohem Sellerie häufig mit einem oralen Allergie-Syndrom, können aber durch die hohe Instabilität der Allergene gekochten Sellerie vertragen<sup>37,38</sup>. Schwerere Reaktionen werden vermutlich durch Profiline oder die sehr stabilen Lipid Transfer Proteine (LTP) ausgelöst<sup>39,40</sup>. Aber auch die hochmolekularen

kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (engl. cross-reactive carbohydrate determinant CCD) werden diskutiert in der Lage zu sein, schwere allergische Reaktionen auszulösen, welche bei der Sellerie-Beifuß-Kreuzreaktion beobachtet werden<sup>38,41</sup>.

Da Sellerie und Karotte beide der Familie der *Apiaceae* angehören, ist auch das Proteinmuster nahezu identisch, weshalb allergische Reaktionen auf Karotte vergleichbar sind. Wie bei Sellerie tritt bei den meisten Karottenallergikern nach Verzehr von rohen Karotten ein orales Allergie-Syndrom auf, während gekochte Karotten vertragen werden<sup>34,42,43</sup>.

### 1.2.3 Nomenklatur von Allergenen

Eine erste offizielle Nomenklatur für Allergene wurde bereits 1986 in einem Positionspapier der World Health Organisation (WHO) und der International Union of Immunological Societies (IUIS) eingeführt<sup>44</sup> und 1994<sup>45</sup> und 2014<sup>46</sup> überarbeitet. Demnach besteht der Name eines Allergens aus den ersten drei Buchstaben des Genus, einem Buchstaben der Spezies und einer arabischen Ziffer, z.B. Mal d 1 von *Malus domestica*, dem Hauptallergen des Apfels. Da meist mehrere Varianten und Isoformen eines Allergens existieren wird der Name um weitere vier Ziffern ergänzt, wobei die ersten beiden Nummern die Isoformen und die letzten beiden deren Varianten unterscheidet, z.B. handelt es sich bei Mal d **1.01** und Mal d **1.02** um Isoformen des Hauptallergens aus Apfel, während Mal d **1.0101** und Mal d **1.0102** Varianten der Isoform Mal d 1.01 beschreiben. Definitionsgemäß ist eine Isoform, auch Isoallergen genannt, ein Protein das gleiche biologische Eigenschaften und ein gleiches Molekulargewicht aufweist. Ferner muss das Allergen eine Aminosäure (AS)-Sequenzidentität von mindestens 67% aufweisen<sup>47</sup>. Ist die Sequenzidentität größer als 90%, so handelt es sich um eine Variante eines Allergens<sup>48</sup>. Alle bisher als Allergene akzeptierten Proteine sind von der IUIS in einer Datenbank zusammengefasst ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)). Ein Protein kann nur dann als neues Allergen in die IUIS-Datenbank aufgenommen werden, wenn eine assoziierte Sequenz mit gültigem NCBI-Datenbank Eintrag und die IgE-Bindung an Serum von Allergikern eindeutig bewiesen ist. Beurteilt wird dies

durch ein Konsortium, welches die Einreichung des nötigen Formblatts in einem peer review Verfahren zu bewerten hat.

#### 1.2.4 Allergene aus Sellerie und Karotten

Wie in Kap. 1.2.2 beschrieben, leiden eine Vielzahl der Sellerie- und Karottenallergiker zunächst unter einer Birkenpollenallergie und entwickeln mit der Zeit eine Kreuzreaktion auf homologe Proteine in Sellerie und Karotte. Die zum Birkenpollen-Hauptallergen Bet v 1 homologen Proteine aus Sellerie (*Apium graveolens*) und Karotte (*Daucus carota*) sind Api g 1 und Dau c 1<sup>49,50</sup>. Neben diesen Allergenen sind auch für Sellerie und Karotte Profilin (Kap. 1.2) als Allergene beschrieben (Api g 4 und Dau c 4). Aufgrund der niedrigen Prävalenz der Profilinsensibilisierung bei Sellerie- (23%)<sup>51</sup> und Karottenallergikern (38%)<sup>42</sup>, sind die Profilin als Nebenallergene eingestuft worden. Allergene der Lipid-Transfer-Proteingruppe sind bisher nur für Sellerie beschrieben. In der Selleriestange wurde Api g 2, welches zur LTP-1 Familie gehört, mit einer Prävalenz von 26%<sup>52</sup>, beschrieben. In der Knolle konnte Api g 6, zur LTP-2 Familie zugehörig, als Allergen identifiziert werden, welches eine Prävalenz von 38% in Sellerieallergikern aufweist<sup>40</sup>. In Karotten sind bisher keine LTPs beschrieben (34). Eine weitere wichtige Allergengruppe in Sellerie und Karotte allerdings scheinen die „kruzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten“ CCDs zu sein. Bis zu 55% der Sellerieallergiker haben IgE-Antikörper spezifisch für CCDs<sup>51</sup>. Die klinische Relevanz von CCDs als Allergene wird kontrovers diskutiert, da sie nur dann in der Lage sind Kreuzvernetzung von IgE auszulösen, wenn sie zwei IgE-bindene Glykane, oder ein IgE-Peptid-Epitop plus ein IgE-bindendes Glykan besitzen, dessen CCDs nicht terminal maskiert sind<sup>28,53</sup>. Für Sellerie ist ein CCD ähnliches, glykosyliertes Protein unter dem Namen Api g 5 beschrieben und auch vom IUIS Nomenklatur Subkomitee ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) als Allergen anerkannt<sup>54</sup>. Api g 5 gehört zur Gruppe der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) enthaltenden Oxidasen, kann im natürlich Zustand IgE binden und *in vitro* eine Histaminausschüttung in Basophilen auslösen. Wird das Protein deglykosyliert, so verliert es diese Wirkung<sup>54</sup>. Bauermeister et al.<sup>55</sup> konnten zeigen, dass bei Patienten mit einer abgesicherten Sellerieallergie eine hohe Korrelation zwischen der IgE Reaktivität

auf das Glykoprotein Api g 5 und isolierten CCDs besteht, allerdings gab es für diese Gruppe der Sellerieallergiker, welche alle unter einer Birkenpollenallergie litten, keine Patienten die auf Api g 5 monosensibilisiert waren. Somit scheinen CCDs im Falle der Sellerieallergie, welche durch eine Kreuzreaktion mit Birkenpollen ausgelöst werden, für die Allergieentwicklung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Für Karotte ist ein solches Allergen bisher noch nicht beschrieben, allerdings zeigen 20-40% der Karottenallergiker CCD-spezifische IgE-Antikörper<sup>34,42</sup>. In Mitteleuropa sind somit nur die Bet v 1 homologen Proteine, also die Hauptallergene Api g 1 und Dau c 1, für die Allergie gegen Sellerie und Karotte von Bedeutung.

#### **1.2.4.1 Hauptallergen aus Sellerie: Api g 1**

Api g 1, das Hauptallergen aus Sellerie ist ein Bet v 1 homologes Protein und gehört zur Gruppe der „pathogenesis-related“ PR-10-Proteine. In einer Studie mit DBPCFC positiven Sellerieallergikern zeigen Lüttkopf et al., dass 59% dieser Patienten auf Api g 1 sensibilisiert sind<sup>51</sup>. Andere Studien beschreiben sogar eine Prävalenz von bis zu 80%<sup>31,41</sup>. Bisher sind zwei Isoformen des Proteins als Allergene anerkannt, Api g 1.01<sup>49</sup> und Api g 1.02<sup>56</sup>. Varianten dieser beiden Isoallergene sind nicht beschrieben. Api g 1 ist das thermolabilste Allergen in Sellerie<sup>38</sup>. Die Isoformen haben ein Molekulargewicht (MW) von etwa 16,5 bis 17 kDa, wobei Api g 1.02 am C-Terminus des Proteins um fünf Aminosäurereste (AS) länger ist als Api g 1.01. Indem Sie eine um diese 5 Aminosäuren reduzierte Mutante von Pru av 1, dem homologen Allergen aus Kirsche, mit dem wildtyp Pru av 1 verglichen, welches die gleiche Verlängerung um 5 Aminosäuren besitzt, wie Api g 1.02, konnten Neudecker et al. zeigen, dass diese zusätzlichen Aminosäuren keinen Einfluss auf die Allergenität des Moleküls hat<sup>57</sup>. Die Sequenzidentität der Api-g-1-Isoformen beträgt nur 52%, die Sequenzähnlichkeit liegt allerdings bei 72%. Interessanterweise zeigt Api g 1.02 eine höhere AS-Sequenzidentität zu einem homologen Protein aus Petersilie<sup>56</sup> und mit dem homologen Protein aus Karotte (Dau c 1.02) ist es sogar zu 95% identisch. Bublin et al. haben die Expression der beiden Api-g-1-Isoformen in Sellerieknolle untersucht und konnten zeigen, dass die Isoform Api g 1.02, die in der Sellerieknolle überwiegend exprimierte Isoform

ist<sup>58</sup>. Eine Studie mit Seren von zehn Sellerieallergikern zeigt, dass beide Isoformen mit allen Seren IgE-reaktiv sind, allerdings war die Bindungsintensität an Api g 1.02 wesentlich schwächer<sup>56</sup>. Anhand von Inhibitionsuntersuchungen wurde in der gleichen Studie gezeigt, dass beide Isoformen und Bet v 1.0101 (Acc. No. X15877) nicht zu 100% kreuzreaktiv sind und somit unterschiedliche IgE bindende Epitope besitzen<sup>56</sup>. Eine wichtige IgE-bindende Region in Bet v 1 ist die „P-Loop“ ähnliche Region um AS 42-51<sup>59</sup>, welche in vielen Fällen für die Kreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und homologen Allergenen verantwortlich ist. Als besonders kritische Position in dieser Region ist die Aminosäure Glutamin 45 beschrieben. Ein Austausch dieser Aminosäure durch Serin führt zu einer 50% igen Reduktion der Bindung an humanes Bet-v-1-spezifisches IgE<sup>60</sup>. Interessanterweise fehlt der Isoform Api g 1.01 diese Aminosäure, während die schwächer IgE-bindende Isoform Api g 1.02 in seiner AS-Sequenz hier dem Bet v 1.01 ähnlicher ist<sup>56</sup>. Somit sind offensichtlich bei Sellerie andere Epitope für die Kreuzreaktivität mit Bet v 1 verantwortlich. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass Sellerieallergiker neben dem oralen Allergiesyndrom häufig auch schwerere Symptome entwickeln<sup>61</sup>.

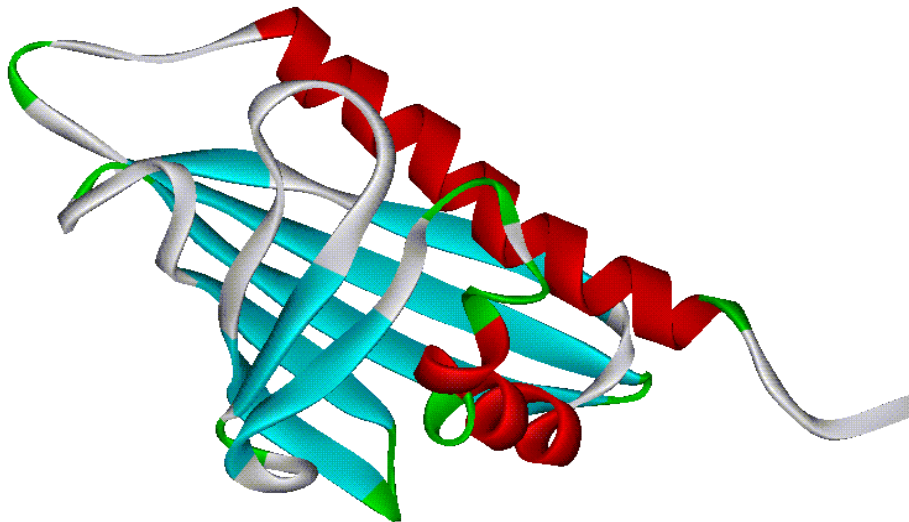
#### **1.2.4.2 Hauptallergen aus Karotte: Dau c 1**

In Karotte ist das Hauptallergen Dau c 1, wie das Api g 1 (s. Kap. 1.2.4.1), ein Bet v 1 homologes PR-10-Protein<sup>50</sup>. Bisher sind drei Isoformen des Allergens bekannt, Dau c 1.01<sup>50</sup>, Dau c 1.02<sup>42</sup> und Dau c 1.03<sup>62</sup>, wobei von der Isoform Dau c 1.01 fünf Varianten (Dau c 1.0101 bis Dau c 1.0105) beschrieben sind. Die Sequenzidentität zwischen den Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.03 beträgt 70%, während Dau c 1.02 zu den anderen Isoformen nur zu 48-50% identisch ist. Die Dau-c-1-Isoformen haben ein theoretisches Molekulargewicht von 16,2 bis 16,6 kDa, einen isoelektrischen Punkt (pI) von 4,55 bis 5,1 und sind wie alle Bet v 1 homologen Proteine thermolabil<sup>43</sup>. Bereits 2001 haben Ballmer-Weber et al. gezeigt, dass 85% eines Patientenkollektivs mit gesicherter Karottenallergie IgE gegen das natürliche Dau c 1 aufweisen. In der Regel ist die Reaktivität auf Dau c 1 mit einer Sensibilisierung gegen Bet v 1 assoziiert, d.h. die meisten Karottenallergiker sind primär auf Birkenpollen sensibilisiert, bevor sie mit der Zeit eine Allergie auf

Karotte entwickeln<sup>34</sup>. Allerdings sind auch Fälle beschrieben, in denen Patienten auf Dau c 1 sensibilisiert sind, ohne an einer Birkenpollenallergie zu leiden. In der Regel handelt es sich hierbei allerdings um Patienten aus Südeuropa, wo im Gegensatz zu Mittel- und Nordeuropa weniger Birken verbreitet sind; so dass hier von einer Kreuzreaktivität auf der Ebene der LTPs ausgegangen wird<sup>63,64</sup>. Wie bei Api g 1 weisen die einzelnen Dau-c-1-Isoformen unterschiedliche IgE-Bindungseigenschaften auf. In einer Studie mit Seren von 40 Karottenallergikern haben Ballmer-Weber et al. gezeigt, dass 98% der Seren IgE gegen Dau c 1.0104 aufwiesen und 65% gegen Dau c 1.02<sup>42</sup>. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Reaktivität gegen Dau c 1.03 mit der Reaktivität gegen Dau c 1.01 korreliert und es keine Patienten zu geben scheint, die auf Dau c 1.03 monosensibilisiert sind, wie es für Dau c 1.02 der Fall ist<sup>62</sup>. Kreuzreaktivitätsstudien der Isoformen untereinander zeigen, dass die von Seren von Karottenallergikern erkannten IgE-Epitope sehr heterogen und patientenspezifisch sind<sup>42,62</sup>. Die zum Teil geringe Kreuzreaktivität von Dau c 1.02 mit Bet v 1 könnte ein Indiz für die oben beschriebene pollenunabhängige Sensibilisierung gegen Karotten sein<sup>42</sup>.

#### **1.2.4.3 Proteinstruktur von Api g 1 und Dau c 1**

Da die dreidimensionale Struktur der meisten Allergene eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der Typ-I-Allergie spielt, sind viele Strukturen von Allergenen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) oder Röntgenkristallographie aufgeklärt worden. Darunter auch die von Bet v 1<sup>65</sup>, Dau c 1<sup>66</sup> und Api g 1<sup>61</sup>. Alle drei Allergene zeigen, wie andere Bet v 1 homologe Proteine auch, eine charakteristische Struktur aus einem siebensträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und drei  $\alpha$ -Helices (s. Abb. 1.2), die einen hydrophoben Hohlraum umschließen, die als Kavität der Bindung natürlicher Liganden dient<sup>67,68</sup>.



*Abb. 1.2: 3D-Modell von Bet v 1 (PDB-ID: 1BTV (Protein-Data-Bank; [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)): die Farben zeigen die jeweilige Sekundärstruktur. Helices in rot, beta Faltblätter in blau, Übergänge in grün und Loops in weiß.*

Der Vergleich von Oberflächenstrukturen wird gerne dazu benutzt, um potentielle IgE-bindende Epitope, vor allem von kreuzreaktiven Allergenen, zu bestimmen. Markovic-Housley et al. haben die Oberflächenstruktur von Dau c 1 mit der von Api g 1 und Bet v 1 verglichen und konnten zeigen, dass Dau c 1.0103 und Api g 1.01 sehr ähnliche Oberflächeneigenschaften aufweisen. Der Sequenzunterschied zwischen beiden Molekülen beträgt nur 19% und betrifft 30 Aminosäuren, von denen etwa die Hälfte an der Oberfläche exprimiert sind<sup>66</sup>. Diese hohe Homologie der Proteine, vor allem an der Oberfläche, deutet darauf hin, dass die beiden Proteine gemeinsame kreuzreaktive Epitope besitzen. Der Vergleich mit Bet v 1 zeigt, dass die Faltung der drei Allergene annähernd gleich ist, die Oberflächentopologie jedoch neben Bereichen mit sehr ähnlichen Eigenschaften auch Bereiche mit signifikanten Unterschieden aufweist<sup>61,66</sup>. Das Wissen über solche hoch konservierten Bereiche, welche mögliche IgE-bindende Epitope darstellen ist von großem Nutzen, um zum Beispiel durch gezielte Mutation hypoallergene Varianten der Allergene mit reduzierter IgE- aber intakter T-Zell-Reaktivität, herzustellen<sup>69,70</sup>.



## 1.3 Therapie von Allergien

### 1.3.1 Spezifische Immuntherapie

Die erfolgreichste Therapie der Allergie ist die vor etwa 100 Jahren erstmalig von Leonard Noon beschriebene spezifische Immuntherapie (SIT)<sup>71</sup>. Neben der Behandlung allergischer Symptome mit Pharmazeutika, wie Antihistaminika oder Kortikosteroiden und der Vermeidung der Allergie auslösenden Substanzen, ist die SIT die einzige Therapieform, die eine dauerhafte kausale Immunmodulation bewirkt<sup>72-74</sup>. Die spezifische Immuntherapie beruht auf der wiederholten Gabe des sensibilisierenden Agens in steigenden Dosen, welche zu einer langanhaltenden erhöhten Toleranz gegenüber dem Allergen führen kann<sup>72,75</sup>. Über die Jahre hat sich die SIT für einige Allergien, wie die auf Bienen- und Wespengift als eine effektive Form der Behandlung dargestellt, während sie für andere Allergene, wie Birkenpollen nur in ca. der Hälfte der behandelten Patienten zu einer Verbesserung der Symptomatik führt<sup>76,77</sup>. In der Regel werden bei der spezifischen Immuntherapie Allergenextrakte subkutan injiziert, aber auch sublinguale Applikationen werden erfolgreich eingesetzt<sup>75</sup>. Um die Effektivität der Desensibilisierung zu erhöhen und die Nebenwirkungen zu verringern, werden die Allergenextrakte in der Regel an Adjuvantien, wie Aluminiumhydroxid, Lipide oder Mikropartikel<sup>78</sup> adsorbiert, welche als Depot fungieren, um das Allergen langsam und stetig abzugeben<sup>75</sup>. Trotz vieler klinischer Studien, die eine erfolgreiche Therapie mittels SIT beschreiben<sup>79,80</sup>, ist der Mechanismus der spezifischen Immuntherapie noch nicht vollständig aufgeklärt. Aus immunologischer Sicht sind vor allem die Effekte auf T-Zell-Ebene von Bedeutung, da sich während der SIT vor allem das Verhältnis von T<sub>H</sub>1 zu T<sub>H</sub>2 Zytokinen erhöht. Hierbei greifen mehrere immunologische Mechanismen ineinander. Bei der Toleranzinduktion kommt es zum Teil zu einer vermehrten Bildung von allergenspezifischen regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (Treg), welche vermehrt die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  ausschütten und so zu einer Suppression der allergenspezifischen T<sub>H</sub>2-Zellen beitragen<sup>72,81</sup>. Treg-Zellen zeigen aber auch einen Einfluss auf B-Zell-Ebene. Vor allem das gebildete IL-10 ist ein wichtiger Faktor beim Antikörperklassenwechsel hin zu IgA, IgG1 und IgG4. Gerade das Zytokin IL-10 ist ein potenter Suppressor der IgE-Bildung, bei gleichzeitiger Induktion der Bildung

von IgG-Antikörpern<sup>73,82</sup>. Bei Patienten, die eine SIT durchlaufen, nimmt der Gehalt an IgG1- und IgG4-Antikörpern im Serum signifikant zu. Diese Antikörper sind in der Lage mit IgE um die Allergenbindung zu konkurrieren, weshalb sie als 'blockierende' Antikörper bezeichnet werden. Es wird postuliert, dass IgG-Antikörper in der Lage sind, das Allergen abzufangen bevor es die Effektorzellen erreicht, um dort mittels Quervernetzung deren Degranulation auszulösen<sup>82,83</sup>. Die blockierende Wirkung von IgG-Antikörpern zeigt sich aber auch in der IgE-Fcε-Rezeptor vermittelten Allergenpräsentation. Des Weiteren werden dem IgG4 antiinflammatorische Charakteristika zugeschrieben, da es nicht in der Lage ist eine Komplementbindung einzugehen und somit Immunkomplexbildung anderer Ig-Subtypen inhibiert<sup>72,75</sup>. Die spezifische Immuntherapie zeigt auch einen positiven Effekt auf Effektorzellen, wie Mastzellen und basophile Zellen. Diverse Studien zeigen, dass während einer allergenspezifischen Immuntherapie der Schwellenwert zur Aktivierung von Effektorzellen effizient verändert wird und es zu einer verringerten IgE vermittelten Mediatorausschüttung kommen kann<sup>72,73</sup>. Welche dieser immunmodulierenden Mechanismen während der allergenspezifischen Immuntherapie genau zum Tragen kommt und wie diese Mechanismen ineinander greifen, ist noch nicht abschließend geklärt, von Bedeutung ist jedoch, dass die SIT die Lebensqualität der behandelten Allergiker deutlich verbessert und vor der Entstehung von Asthma bei Patienten mit allergischer Rhinitis schützen kann<sup>73,82</sup>.

### **1.3.1.1 Spezifische Immuntherapie der Lebensmittelallergie**

Obwohl die klassische Immuntherapie, wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, erfolgreich bei diversen Allergien eingesetzt wird, ist sie für die Therapie von Nahrungsmittelallergien meist ungeeignet. Studien mit Erdnussallergikern, denen über einen Zeitraum von einem Jahr eine steigende Dosis Erdnussmehl verabreicht wurde, zeigen, dass alle Patienten, die das Ende der Studie erreichten, eine höhere Menge an Erdnuss vertragen konnten<sup>84</sup>. Allerdings mussten 20% der Patienten die Immuntherapie wegen schwerer gastrointestinaler Nebenwirkungen abbrechen<sup>85</sup>. Die Daten dieser und auch weiterer Studien mit anderen Nahrungsmitteln<sup>86-88</sup> demonstrieren, dass eine orale Immuntherapie zu einer Desensibilisierung bei

Nahrungsmittelallergikern führen kann, allerdings gibt es bisher keine überzeugenden Daten, die zeigen, dass dabei eine anhaltende Toleranz gegenüber dem Allergen induziert wird. Aufgrund dieser Tatsache und des hohen Risikos von schweren Nebenwirkungen ist die spezifische Immuntherapie noch nicht für Nahrungsmittelallergien etabliert<sup>85,89</sup>. Somit ist die Vermeidung des Nahrungsmittels und das Mitführen eines sogenannten Allergie-Notfallsets, bestehend aus Adrenalin-Spritze, Antihistaminikum und einem Kortikosteroid<sup>6</sup>, die einzige Möglichkeit, allergischen Reaktionen vorzubeugen und im Notfall sofort zu behandeln<sup>90</sup>, was den Alltag und die Lebensqualität der Patienten sehr beeinträchtigt<sup>91</sup>.

Die Entwicklung neuer Ansätze der Immuntherapie von Nahrungsmittelallergien ist somit in den letzten Jahren zu einem großen Schwerpunkt der allergologischen Forschung geworden. Ein wichtiger Ansatz, die IgE vermittelten Nebenwirkungen zu umgehen, liegt in der Modifikation der Allergene und wurde bereits zu Beginn der 1970er Jahre entwickelt. Durch Denaturierung der Allergenextrakte mittels Aldehyden wurden sogenannte Allergoide erhalten, welche eine stark verminderte IgE-Reaktivität zeigen<sup>92,93</sup>. Vorteil dieser Allergoide ist die Beibehaltung der für eine Immuntherapie wichtigen T-Zell-Reaktivität, weshalb sie die Basis vieler Therapieallergene darstellen<sup>94</sup>.

Gerade im Bereich der Allergencharakterisierung und durch die Möglichkeit, Allergene rekombinant herzustellen, wurden in den letzten Jahren diverse Ansätze neuartiger Immuntherapien vorgestellt. Dazu gehören (I) die T-Zell-Peptid basierte Immuntherapie, (II) die Verwendung modifizierter rekombinanter Allergene, (III) die Plasmid-DNA-Vakzinierung und (IV) die Induktion einer T<sub>H</sub>1 gerichteten Immunantwort mittels Verwendung von T<sub>H</sub>1-Adjuvantien<sup>85,94-96</sup>. Die Immunisierung mit Fragmenten von Allergenen (Peptiden) (I) hat den Vorteil, dass T-Zellen durch diese aktiviert werden können, während durch das Fehlen multipler IgE-Epitope keine Kreuzvernetzung des FcεRI-Rezeptors auf B-Zellen mehr möglich ist und somit das Risiko von starken Nebenwirkungen verringert wird<sup>97,98</sup>. Das gleiche Prinzip der Beibehaltung von T-Zell-Epitopen bei gleichzeitiger Zerstörung der B-Zell-Epitope wird bei der Verwendung modifizierter, rekombinanter Allergene zur Immuntherapie angewandt (II). Durch zielgerichtete Mutationen der Proteinsequenz, werden Epitope oder die Struktur von Allergenen so verändert,

dass sie eine reduzierte IgE-Reaktivität aufweisen, weiterhin aber in der Lage sind, die Bildung blockierender IgG-Antikörper zu induzieren. Neben der strukturellen Veränderung der Allergene, ist auch die Oligomerisierung, z.B. als Di- und Trimere, ein erfolgversprechender Ansatz zur Herstellung sogenannter „Hypoallergene“<sup>99-104</sup>. Eine Vakzinierung mit Allergen kodierender bakterieller Plasmid-DNA (III) ist ein weiterer Ansatz zur Therapie von Nahrungsmittelallergien. Hierbei kommt es zur Expression des Allergens im Körper und zu einer in Richtung  $T_H1$  modulierten Immunantwort auf das betreffende Protein<sup>105,106</sup>. Der Einsatz immunstimulatorischer Sequenzen (IV), wie CpG-Motive, oder Substanzen, welche als Auslöser einer  $T_H1$ -Immunantwort bekannt sind, ist vor allem in vielen erfolgversprechenden präklinischen und einigen klinischen Studien untersucht worden<sup>82,96,107</sup>. Dabei können die Substanzen, wie inaktivierte Bakterien, entweder als Adjuvantien dienen, oder sie werden direkt mit rekombinanten Allergenen fusioniert und diese Konstrukte als Immuntherapeutika eingesetzt<sup>108-110</sup>. Auch die Verwendung von  $T_H1$ -induzierenden Viren, als Träger von Allergenen wird als Vakzinkandidaten diskutiert<sup>111,112</sup>.

Neben den allergenspezifischen Immuntherapien werden auch unspezifische Therapieansätze verfolgt. Hierbei handelt es sich unter anderem, um die Verwendung humanisierter anti-IgE-Antikörper zur Blockierung von IgE, die traditionelle chinesische Medizin (TCM), durch Gabe einer speziellen Kräuterformulierung, aber auch um eine unspezifische Zytokin- oder anti-Zytokin-Therapie<sup>85,90,107</sup>.

Obwohl einige der neuen Therapieansätze bereits in klinischen Studien untersucht werden, stehen bis dato keine dieser Therapien zur Behandlung der Nahrungsmittelallergien für den Patienten zur Verfügung. Somit ist nach wie vor die Eliminationsdiät und das Mitführen einer Notfallausrüstung die einzige Behandlungsmöglichkeit einer Nahrungsmittelallergie<sup>85</sup>.

In dieser Arbeit werden vor allem die Verwendung von hypoallergenen, rekombinanten Proteinen, als eine mögliche Therapieform der Sellerie- und Karottenallergie diskutiert (Kap. 2).

## 2 Zielsetzung

### 2.1 Problemstellung

Die Inzidenz allergischer Erkrankungen bei Erwachsenen und Kindern steigt weltweit in den letzten Jahren stetig an, wodurch der Bedarf an einer entsprechenden Diagnostik und an Allergen-spezifischen Immuntherapien zunimmt. Insbesondere bei Nahrungsmittelallergien ist aufgrund zu hoher Risiken von Nebenwirkungen und fehlender Wirksamkeit bislang keine Behandlungsoption etabliert. Bisher steht nur die Vermeidung des Nahrungsmittelallergens als Prävention einer Allergie zur Verfügung. Die in den letzten Jahren gewachsenen Kenntnisse über die molekularen Strukturen der Nahrungsmittelallergene eröffnen jedoch neue Ansätze für die Etablierung einer dringend erforderlichen spezifischen Immuntherapie. Neuartige Strategien zur spezifischen Immuntherapie von Inhalationsallergien bestehen beispielsweise darin, sogenannte hypoallergene Derivate herzustellen, welche eine reduzierte IgE Antikörper-Bindungskapazität, bei gleichzeitiger Beibehaltung der Toleranzinduktion, aufweisen. Vergleichbare Ansätze werden auch bei Nahrungsmittelallergien diskutiert.

### 2.2 Arbeitshypothese, Zielsetzung und Arbeitskonzept

#### Arbeitshypothese

Grundlage der Arbeit ist die Hypothese, dass durch gezielte Modifikation (gerichtete Mutagenese und Oligomerisierung) der klinisch relevanten Hauptallergene Api g 1 aus Sellerie (*Apium graveolens*) und Dau c 1 aus Karotte (*Daucus carrota*), deren allergene Reaktivität vermindert und die immunogenen Eigenschaften moduliert werden können. Die so hergestellten hypoallergenen Derivate stellen somit mögliche geeignete Allergentherapeutika zur Intervention bei Lebensmittelallergien dar.

### Zielsetzung

Für Sellerie und Karotte sind neben den oft auftretenden klinischen Kreuzreaktionen mit Birkenpollen, welche sich in der Regel durch ein orales Allergie-Syndrom auszeichnen, auch schwere Symptome bis hin zum anaphylaktischen Schock beschrieben. Da bisher keine spezifische Immuntherapie für diese Nahrungsmittel etabliert ist, sollten die Möglichkeiten der strukturellen Veränderung zur Reduktion der Allergenität von Allergenen am Modell der Hautallergene von Sellerie (Api g 1) und Karotte (Dau c 1) untersucht werden.

Für die beiden Isoformen von Api g 1 war die gezielte Untersuchung eines potentiellen IgE-Epitops, der sogenannten P-Loop-Region und der Einfluss einer gezielten Mutation der Aminosäureposition 111 auf die Änderung der Konformation, Gegenstand dieser Arbeit. Sowohl die P-Loop Region, als auch die entsprechende Aminosäureposition sind bei dem homologen und kreuzreaktiven Birkenpollenallergen Bet v 1 an der IgE-Bindung beziehungsweise der Ausbildung der konformationsabhängigen Epitope beteiligt.

Bei zwei Dau c 1 Isoformen sollte der Einfluss der Entfaltung der Proteinstruktur durch gezielte Mutation der Aminosäureposition 111 und der zusätzliche Einfluss der Multimerisierung (chimäre Fusionsproteine und Trimere) auf die Allergenität untersucht werden. Im Weiteren sollten die verschiedenen Dau c 1 Derivate hinsichtlich ihrer Antigenität, d.h. der humoralen Immunantwort, in einem Mausmodell betrachtet werden.

### Arbeitskonzept

1. cDNA Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung von Api g 1 und Dau c 1 wildtyp Proteinen und daraus abgeleiteten Mutanten und Oligomeren

Erstes Ziel der Arbeit war es, alle für die Untersuchungen notwendigen Proteine rekombinant herzustellen. Dau c 1.01, Dau c1.02 und Api g 1.01 lagen bereits als in Expressionsvektor klonierte cDNA vor. Lediglich die Isoform Api g 1.02 musste noch kloniert werden. Dazu sollte aus Sellerieknolle Gesamt-RNA gewonnen werden und mittels reverser Transkription unter Verwendung genspezifischer Primer abgeleitet von der bereits publizierten Sequenz (Acc. No. Z75662), in die für Api g 1.02 kodierende cDNA umgeschrieben werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Multimerisierungen auf die Allergenität der Karottenallergene, sollte die vorliegende cDNA mehrmals hintereinander in einen Expressionsvektor kloniert werden. Für ein Dau-c-1.01-Trimer sollte die gleiche Technik der enzymatischen Restriktion und Ligation, wie für das Bet-v-1-Trimer angewandt werden<sup>113</sup>. Da neben Dau c 1.01 auch die Isoform 1.02 an der IgE-Reaktivität auf Karotte beteiligt ist, sollte neben dem Trimer von Dau c 1 auch das Multimer aus den beiden Isoformen auf seine immunologischen Eigenschaften untersucht werden. Die Klonierung des Multimers erfolgte mittels einer PCR-Strategie mit isoformspezifischen überlappenden Primern, wodurch die beiden Proteine direkt ohne enzymatische Schnittstelle aneinandergesetzt werden.

Bisherige Studien zeigten, dass eine Mutation von Bet v 1 und homologen Nahrungsmittelallergenen im Bereich der Aminosäureposition 111 zu Prolin einen entscheidenden Einfluss auf die Faltung der Proteine hat<sup>57,114,115</sup>. Somit bestand der nächste Schritt der Arbeit darin, diese Mutationen auch in die Isoformen und Multimere von Karotte und Sellerie einzubauen und anschließend die rekombinanten Proteine auf strukturelle Veränderung, Allergenität und Antigenität zu untersuchen. Die Verwendung der ortsgerichteten Mutagenese ist hier von Vorteil, da die zielgerichtete Punktmutation in die bereits im Expressionsvektor vorliegenden Konstrukte eingebaut werden kann. Sequenzvergleiche der P-Loop-Region von Bet v 1 mit den beiden Api-g-1-Isoformen zeigen, dass gerade an der als kritisch beschriebenen Aminosäureposition Glu44<sup>57,59</sup> die Isoform Api g 1.01 ein Lysin besitzt, während Api g 1.02 ebenfalls Glutamin aufweist. Da Lysin im Gegensatz zur sauren Glutaminsäure eine basische Aminosäure ist, könnte dies einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur der P-Loop-Region als IgE bindendes Epitop haben. Aus diesem Grund ist auch die Charakterisierung einer Api-g-1.01-Lysin-Mutante Gegenstand dieser Arbeit. Die Mutation sollte, wie für die Prolinmutanten, mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt werden. Nach erfolgreicher Klonierung aller Allergene, Multimere und Mutanten bestand der nächste Schritt der Arbeit darin, diese als rekombinante Proteine in *Escherichia coli* zu exprimieren und mittels geeigneter Methoden, wie Affinitätschromatografie oder präparativer SDS-PAGE, zu reinigen. Die korrekte Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine sollte mittels CD-Spektroskopie überprüft werden.

## 2. Charakterisierung der IgE-bindenden und allergenen Eigenschaften (in vitro)

Für die immunologischen Untersuchungen der Proteine standen Seren von Allergikern zur Verfügung, welche eine mittels doppelt blinder, Placebo kontrollierter Nahrungsmittelprovokation gesicherte Allergie auf Karotte bzw. Sellerie aufwiesen. Mit Hilfe dieser Seren, sollte die IgE-Bindungskapazität der Sellerie-wildtyp-Allergene mit den jeweiligen Mutanten im ELISA gemessen und mittels Streudiagramm mit Regressionsgerade verglichen werden. Die IgE-Kreuzreaktivität der verschiedenen Sellerieproteine sollte mittels ELISA Inhibition in den einzelnen Patientengruppen bestimmt werden. Die Bestimmung der IgE-Bindungskapazität der Karottenallergene, Mutanten und Multimere erfolgte unter Verwendung des Enzym-Allergosorbens-Tests (EAST) und Darstellung der Ergebnisse ebenfalls im Streudiagramm mit Regression.

## 3. Untersuchung der Antigenität der Dau c 1-Mutanten und -Oligomere in der Maus

Ein weiterer Aspekt der Arbeit bestand darin, die Karottenallergene und deren Mutanten und Multimere auch in vivo in einer Mausstudie hinsichtlich ihrer Allergenität und Antigenität vergleichend zu untersuchen. Die Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Allergenen unter Verwendung von Aluminiumhydroxid, erwies sich in der Arbeitsgruppe bereits als ein geeignetes Modell, um gute  $T_H2$  gerichtete Immunantworten in Mäusen auszulösen<sup>111,116</sup>. Aus diesem Grund wurde dieses Immunisierungsschema auch für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Die Ermittlung der Immunogenität von Wildtyp- und mutierten Allergenen sollte über die Bestimmung von Dau-c-1-spezifischem IgG- und IgE-Gehalt der gewonnenen Seren, unter Verwendung von ELISA und Mediatorfreisetzungstests, mittels einer basophilen Rattenzelllinie, erfolgen.

Ein wichtiger Aspekt der Arbeit lag in der abschließenden Beurteilung, ob die gezielte Veränderung von Allergenen ein geeignetes Hilfsmittel zur Aufklärung wichtiger kreuzreaktiver IgE-bindender Epitope ist. Des Weiteren sollte anhand der erhaltenen Daten diskutiert werden, ob Mutationen solcher Epitope oder die



Multimerisierung von Allergenen, die Allergenität und Antigenität tatsächlich dahingehend verändern, dass diese neuartigen Proteine hypoallergene Eigenschaften besitzen und somit für eine erfolgreiche Immuntherapie einsetzbar sind.

## 3 Materialien

### 3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in der Qualität „per analysis“ (p.a., zur Analyse) bezogen. Die Lösungen wurden in der Regel mit Reinstwasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt.

### 3.2 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 2 Verbrauchsmaterial.*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Einmalspritzen	VWR (Darmstadt)
Kanülen	B. Braun (Melsungen)
Mikrotiterplatte (Nunc, F96, Maxisorp)	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg) Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg) Greiner bio-one (Frickenhausen)
Stabpipetten, steril	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturplatten (Nunc, F96, Nunclon)	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Zellschaber (Nunc)	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)

### 3.3 Geräte

*Tabelle 3 Geräte.*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklaven: Hochdruckdampfsterilisator Bioclav	Münchener Medizin Mechanik GmbH (München) Schütt (Göttingen)
Bakterienschüttler (Innova 4335)	New Brunswick Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
CD Spektropolarimeter (J-180S)	Jasco (Groß-Umstadt)
ELISA-Reader (Spectra MAX340)	Molecular Devices (Ismaning)

ELISA-Platten-Waschgerät (ELX 405)	BioTek (Bad Friedrichshall)
Geldokumentationseinheit (Gel-iX)	Intas (Göttingen)
Gelelektrophorese-Apparaturen: Mini Protean 3 Horizon 58, Horizon 11.14	BioRad (München) Biometra (Göttingen)
Magnetrührer (RCT basic)	IKA (Staufen)
Mikrotiterplatten-Washer (ELx405)	Bio-Tek (Bad Friedrichshall)
pH-Meter (FE20)	Mettler Toledo (Gießen)
Photometer: ULTROSPEC 10 Nanodrop ND-1000	GE Healthcare (Freiburg) PEQLAB Biotechnologie GMBH (Erlangen)
Pipetten: Finnpipette Mehrfachdispenser (Handystep) Einkanalpipette variabel (Reference)	Thermo Fisher Scientific (Bonn) BRAND (Wertheim) Eppendorf (Hamburg)
Standard Power Pack T25	Biometra (Göttingen)
Sterilbank (Lamin Air HB2448)	Thermo Electron (Langenselbold)
Thermocycler: GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 2700	Life Technologies (Darmstadt)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Überkopfschüttler (Reax 2)	Heidolph (Darmstadt)
Vortex-Schüttelgerät (MS3 basic)	IKA (Staufen)
Waage (BL1500) Feinwaage (MC1)	Sartorius (Göttingen) Sartorius (Göttingen)
Wippschüttler (Rocking Plattform)	Biometra (Göttingen)
Zentrifugen: Mikrozentrifuge 5415R Sorvall Evolution RC	Eppendorf (Hamburg) Thermo Fisher Scientific (Bonn)

### 3.4 Pufferlösungen, Nährmedien und Nährböden

Table 4 Pufferlösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Acetatpuffer (EAST)	0,1 M Acetat, pH 4,0
Aluminiumhydroxid-Lösung	2mg/mL Aluminiumhydroxid in PBS
APS (SDS-PAGE)	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Bindungspuffer nativ (His GraviTrap)	20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4
Bindungspuffer denaturierend (His GraviTrap)	20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, pH 7.4

## Materialien

Carbonatpuffer (ELISA)	100mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> mit 100 mM NaHCO <sub>3</sub> auf pH 9,6 einstellen
Deaktivierungspuffer(EAST)	0,1 M Ethanolamin in Kopplungspuffer
6x DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau,
Elutionspuffer (His GraviTrap)	20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 100-1000 mM Imidazol, pH 7.4
Inkubationspuffer (ELISA)	0,05% Tween 20, 0,1% BSA in PBS
10 mM Kaliumphosphat-puffer (CD-Spektroskopie)	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH9) mit 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH4,5) auf pH 7,3 einstellen
Kopplungspuffer (EAST)	0,1 M NaHCO <sub>3</sub>
Laufpuffer (SDS-PAGE)	19,2 M Glycin, 5 M Tris (pH 6,8), 10% [w/v] SDS
PBS	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8mM NaHPO <sub>4</sub> , 137mM NaCl, 3mM KCl, pH 7,2
4x Probenpuffer (SDS-PAGE)	160mM Tris-HCl (pH6,8), 4% SDS, 20%Glycerol, 0,2% Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (4x) (SDS-PAGE)	0,5 M Tris-HCl pH6,8
Substratpuffer (RBL)	3,8 mM 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminid, 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, pH 4,5 mit 0,4M Zitronensäure
TAE-Puffer	40 mM TRIS, 40 mM Essigäure, 1 mM EDTA-Na <sub>2</sub> , pH 8,5
TBS	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TMB-Substrat	0,525 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), 0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 0,21 M Kaliumcitratpuffer pH 3,95
Trenngelpuffer (4x) (SDS-PAGE)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Tyrodepuffer (TP) 20x (RBL)	80g NaCl, 2g KCl, 0,5g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1g MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O ad 500ml
Tyrodepuffer (TP) 1x (RBL)	50 ml TP 20x, 1g Glucose, 1,4 ml CaCl <sub>2</sub> (1M), 2,4 g HEPES, ad 800 ml H <sub>2</sub> O, pH7,45, 1g BSA ad 1L H <sub>2</sub> O
Waschpuffer (IgG-ELISA)	0,05% Tween 20 in TBS
Waschpuffer (IgE-ELISA)	0,05% Tween 20 in PBS

*Tabelle 5 Nährmedien und Nährböden.*

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10g/l Bakto-Trypton, 10g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl
LB-amp Platten	15g/l Agar-Agar, 50mg/l Amp in LB Medium
LB-amp-X-Gal Platten	15g/l Agar-Agar, 90mg/l X-Gal, 50mg/l Amp in LB Medium
RBL-Medium	MEM (Biochrom, Berlin), 5% [v/v] FKS, 1% [v/v] L-Glutamin
S.O.C.-Medium (Invitrogen, Darmstadt)	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose

### 3.5 Primer

Die Tabellen 6 und 7 zeigen alle Primer, die zur Klonierung und Mutation der Sellerie- und Karottenproteine notwendig waren. In Tabelle 8 sind alle Primer aufgelistet, welche für Bakterienscreenings und Sequenzierungen eingesetzt wurden. Sämtliche Primer sind von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen worden. Enzymschnittstellen für die Klonierung sind unterstrichen und Mutationsbereiche kursiv dargestellt.

Tabelle 6 Primer zur Klonierung der Sellerieproteine.

Bezeichnung	Sequenz
Api g 1.02(+) <u>Nde</u>	5'-GTA <u>CAT ATG</u> GGT GTC CAA AAG ACC GTG GTT GAG GCT-3'
Api g 1.02(-) <u>Bam</u>	5'-CTA <u>GGA TCC</u> TCA AGC AAG AAA CTG CAA GTT TGC TAG-3'
Api g 1.01K <sup>44</sup> E(+)	5'-GCT TAC AAG AGT GTA GAA ATC GAG GGA GAT GGT GGA CC-3'
Api g 1.01K <sup>44</sup> E(-)	5'-CCA GGT CCA CCA TCT CCC TCG ATT TCG ACA CTC TTG-3'
Api g 1.01S <sup>111</sup> P(+)	5'-CT GCT GAT GGA GGA CCC ATT TGC AAG ACC ACT GCC ATC-3'
Api g 1.01S <sup>111</sup> P(-)	5'-GGC AGT GGT CTT CCA AAT GGG TCC TCC ATC AGC AGT TGG C-3'
Api g 102C <sup>111</sup> P(+)	5'-GTG CCA ACC GAC GGA GGT CCC ATA GTG AAG AAC ACC ACC-3'
Api g 102C <sup>111</sup> P(-)	5'-GGT GTT CTT CAC TAT GGG ACC TCC GTC GGT TGG CAC AAC A 3'

Tabelle 7 Primer zur Klonierung der Karottenproteine.

Bezeichnung	Sequenz
Dau c 1.01S <sup>111</sup> P(+)	5'-CT GCT GAT GGG GGT CCC ATT ACC AAG ACC ACG GCC ATA-3'
Dau c 1.01S <sup>111</sup> P(-)	5'-GGC CGT GGT CTT GGT AAT GGG ACC CCC ATC AGC AGT TGG-3'
Dau c 1.02C <sup>111</sup> P(+)	5'-GTG CCA ACA GAT GGA GGC CCC ATT GTG AAG AAC ACC ACC-3'
Dau c 1.02C <sup>111</sup> P(-)	5'-GGT GTT CTT CAC AAT GGG GCC TCC ATC TGT TGG CAC AAC A-3'
Dau c 1.01 (+)	5'-ATG GGT GCC CAG AGC CAT TCA CTC GAG ATC-3'
Dau c 101/102fus(-)	5'- <b>CTC AGT CTT TTG GAC ACC</b> ATT AGC AAT GAG GTA GGC-3'
Dau c 101/102fus(+)	5'-GCC TAC CTC ATT GCT AAT <b>GGT GTC CAA AAG ACT GAG</b> -3'
Dau c 1.02(-)	5'-TTA GTT TGC TAG GAG GTA AGC CTC AAC AGC-3'

Tabelle 8 Primer für Kolonie-PCR und Sequenzierungen.

Bezeichnung	Sequenz
Not I-d(T) <sub>18</sub>	5'-AAC TGG AAG AAT TCG CGG CCG CAG GAA T <sub>18</sub> -3'
Sp6	5'-CA TTT AGG TGA CAC TAT AG-3'
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7term	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG T-3'

### 3.6 Bakterienstämme

Im Folgenden sind alle verwendeten Bakterienstämme aufgeführt. Es wurden ausschließlich chemisch kompetente *E. coli* Stämme verwendet, welche für die Transformation mittels der Hitzeschockmethode eingesetzt werden konnten.

Tabelle 9 Zur Klonierung und Expression verwendete *E. coli* Bakterienstämme.

Organismus	Genotyp
BL21(DE3) (Novagen, Merck, Darmstadt)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), dcm, gal, λ(DE3)
Top10 (Invitrogen, Karlsruhe)	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
XL1-Blue supercompetent cells (Agilent, Waldbronn)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

### 3.7 Antikörper

Tabelle 10 zeigt die für immunchemische Methoden (Kap. 4.3) eingesetzten Sekundär- und Detektionsantikörper. Als Primärantikörper wurden Mausseren der durchgeführten Immunisierung (Kap. 4.4.2) oder Humanseren von allergischen Patienten (Kap. 3.7.1) verwendet.

Tabelle 10 Antikörper.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Neutravidin-HRP	Fisher Scientific (Schwerte)
Ziege-anti-human-IgE biotinyliert	Medac (Wedel)
Kaninchen-anti-Maus-IgG-AP (γ-Ketten-spezifisch)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Human IgE, gereinigt, polyklonal	Diatec (Oslo, Norwegen)
Ziege-anti-human-IgE	Nordic MUBio (Susteren, Niederlande)

### **3.7.1 Patientenserien**

Zur Charakterisierung und Analyse des allergenen Potentials rekombinanter Allergene eignen sich insbesondere Seren von Patienten mit einer Allergie auf das zu untersuchende Protein. Mittels immunchemischer Methoden ist es möglich, die Bindungskapazität der Allergene an das im Serum befindliche spezifische IgE zu bestimmen. Dazu werden Seren von gut charakterisierten Patienten benötigt. Die Absicherung einer Nahrungsmittelallergie erfolgt in der Regel anhand anamnestischer und serologischer Daten. Ein Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Seren stammen von Patienten, die zusätzlich mittels der doppelt verblindeten, Placebo kontrollierten Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC) auf ihre Allergie getestet waren. Dies Provokationen wurden an der Universität Zürich von Frau Prof. Dr. med. B. K. Ballmer-Weber durchgeführt und die Seren von Patienten mit gesicherter Karotten- bzw. Sellerieallergie freundlicherweise für diese Studie zur Verfügung gestellt. Weitere Seren stammen aus der Serumbank freiwilliger Spender des Paul-Ehrlich-Instituts.

Einschlusskriterien waren neben einer positiven DBPCFC, eindeutige charakteristische allergische Symptome wie das orale Allergiesymptom, Schwellungen im Rachenraum, Anaphylaxie und ein positiver Befund an karotten- bzw. selleriespezifischem IgE im Serum, gemessen mittels des ImmunoCAP® (Phadia, Freiburg).

Eine schriftliche Einwilligungserklärung lag für alle Studienteilnehmer vor.

#### **3.7.1.1 Patientenkollektiv**

Die Untersuchung der Karottenallergene konnte mittels eines Allergikerkollektivs von 24 Patienten durchgeführt werden (Tab. 11). In 16 dieser Patienten (#9-24) wurde die Karottenallergie mittels DBPCFC bestätigt, die anderen acht (#1-8) wiesen eine eindeutige Historie einer Karottenallergie auf. Alle Allergiker hatten einen positiven ImmunoCAP® auf Karotte mit einer Klasse größer als zwei. Außerdem waren alle Patienten auch Birkenpollenallergiker, so dass hier von einer Kreuzsensibilisierung von Birke und Karotte ausgegangen werden konnte. Gerade auch unter dem Aspekt, dass circa 71% der Patienten einen positiven CAP auf

Beifuß aufwiesen, kann hier von Seren von Allergikern mit einem Birke-Beifuß-Syndrom gesprochen werden (Tab. 11).

Tabelle 11: Klinische Symptome und spezifisches IgE auf Karotte, Birke und Beifuß der Karottenallergiker.

Patient Nr.	Diagnostik	Symptome (Anamnese)	ImmunoCAP™					
			Karotte		Birkenpollen		Beifußpollen	
			IU/ml	Klasse	IU/ml	Klasse	IU/ml	Klasse
01	Anamnese	OAS	9,6	3	54,1	5	4,3	3
02	Anamnese	OAS, Ehb	4,2	3	63,0	5	0,9	2
03	Anamnese	OAS, M	9,2	3	54,3	5	0,4	1
04	Anamnese	OAS	2,0	2	21,8	4	0,8	2
05	Anamnese	OAS	2,1	2	41,0	4	3,1	2
06	Anamnese	OAS	6,1	3	32,6	4	<0,35	0
07	Anamnese	OAS	5,3	3	>100	6	<0,35	0
08	Anamnese	OAS, AÖ	2,0	2	41,2	4	2,9	2
09	DBPCFC	OAS, U, D, V	2,0	2	41,8	4	<0,35	0
10	DBPCFC	OAS, Ehb	3,8	3	63,1	5	7,5	3
11	DBPCFC	OAS, AÖ	22,9	4	>100	6	16,8	3
12	DBPCFC	OAS, Ehb, Dph	2,4	2	77,6	5	<0,35	0
13	DBPCFC	OAS	12,1	3	75,3	5	0,7	1
14	DBPCFC	OAS	2,3	2	5,0	3	2,1	2
15	DBPCFC	OAS, Ehb, Dph	5,9	3	87,0	5	16,5	3
16	DBPCFC	OAS, Ehb	1,4	2	37,3	4	2,2	2
17	DBPCFC	OAS, AÖ	3,0	2	26,1	4	<0,35	0
18	DBPCFC	OAS, R	11,5	3	>100	6	6,1	3
19	DBPCFC	OAS	13,0	3	>100	6	4,1	3
20	DBPCFC	OAS, AÖ	15,2	3	>100	6	1,6	2
21	DBPCFC	OAS, R	26,1	4	>100	6	1,7	2
22	DBPCFC	OAS	15,8	3	>100	6	1,1	2
23	DBPCFC	OAS	3,2	2	54,1	5	<0,35	0
24	DBPCFC	OAS	60,8	5	9,5	3	<0,35	0

AÖ: Angioödem, D: Dyspnoe, Dph: Dysphagie, Ehb: Engegefühl im Hals und Brustbereich, He: Heiserkeit, M: Magenkrämpfe, OAS: orales Allergiesyndrom, R: Rhinitis, U: Urticaria, V: Vertigo.

Für die Analyse der Sellerieproteine konnte auf ein Patientenkollektiv zurückgegriffen werden, welches aus 23 im DBPCFC Sellerie positiv getesteten Patienten (Tab. 12) bestand.



Tabelle 12: Klinische Symptome und spezifisches IgE auf Sellerie der Sellerieallergiker.

Patient Nr.	Diagnostik	Symptome (Anamnese)	Sellerie ImmunoCAP™		Allergie auf	
			IU/ml	Klasse	Birke	Gräser
1	DBPCFC	OAS	1,54	2	ja	nein
2	DBPCFC	OAS	5,79	3	ja	ja
3	DBPCFC	OAS	<0,35	0	ja	ja
4	DBPCFC	OAS	2,43	2	ja	ja
5	DBPCFC	R, K, Flu	<0,35	0	ja	nein
6	DBPCFC	OAS	<0,35	0	ja	ja
7	DBPCFC	OAS	<0,35	0	ja	ja
8	DBPCFC	Gi, Bl	0,62	1	ja	nein
9	DBPCFC	R, D, U, Flu	<0,35	0	nein	nein
10	DBPCFC	OAS	0,93	2	ja	ja
11	DBPCFC	OAS	3,4	2	ja	nein
12	DBPCFC	OAS	3,29	2	ja	nein
13	DBPCFC	OAS	5,21	3	ja	ja
14	DBPCFC	AÖ	1,46	2	ja	ja
15	DBPCFC	OAS, AÖ	1,64	2	ja	ja
16	DBPCFC	OAS	40,7	4	ja	ja
17	DBPCFC	U	0,66	1	ja	ja
18	DBPCFC	OAS, U	54,6	5	ja	ja
19	DBPCFC	OAS, R, D, K	1,59	2	ja	nein
20	DBPCFC	OAS	<0,35	0	nein	nein
21	DBPCFC	R, K	3,15	2	ja	nein
22	DBPCFC	OAS	<0,35	0	ja	ja
23	DBPCFC	OAS	<0,35	0	ja	ja

AÖ: Angioödem, Bl: Blähungen, D: Dyspnoe, Flu: Flush (Gesichtsrötung) Gi: Schmerz im Gastrointestinaltrakt, K: Konjunktivitis, OAS: orales Allergiesyndrom, oP: offene Provokation, R: Rhinitis, U: Urticaria.

Interessanterweise hatten zirka 35% der Seren der DBPCFC positiven Patienten ein negatives Ergebnis im ImmunoCAP® auf Sellerie. Ein Grund dafür könnte sein, dass in dem zur Kopplung an die CAPs verwendeten Sellerieextrakt, das Allergen auf welches diese Patienten reagieren, nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden war.

Neben diesen Patienten wurden zur Kontrolle auch 22 Patienten eingeschlossen, welche eine Birkenpollenallergie ohne Sellerieallergie aufwiesen (Tab 13).

Tabelle 13: Klinische Symptome und spezifisches IgE auf Sellerie des Kontroll-Patientenkollektivs.

Patient Nr.	Diagnostik	Symptome (Anamnese)	Sellerie ImmunoCAP™		Allergie auf	
			IU/ml	Klasse	Birke	Gräser
1	oP	-	<0,35	0	ja	nein
2	oP	-	<0,35	0	ja	ja
3	oP	-	<0,35	0	ja	ja
4	oP	-	<0,35	0	ja	nein
5	oP	-	<0,35	0	ja	ja
6	oP	-	<0,35	0	ja	ja
7	oP	-	<0,35	0	ja	ja
8	oP	-	<0,35	0	ja	ja
9	oP	-	<0,35	0	ja	ja
10	oP	-	<0,35	0	ja	nein
11	oP	-	3,36	2	ja	nein
12	oP	-	<0,35	0	ja	ja
13	oP	-	<0,35	0	ja	ja
14	oP	-	0,53	1	ja	nein
15	oP	-	1,02	2	ja	ja
16	oP	-	<0,35	0	ja	ja
17	oP	-	<0,35	0	ja	ja
18	oP	-	<0,35	0	ja	ja
19	oP	-	0,57	1	ja	ja
20	oP	-	<0,35	0	ja	ja
21	oP	-	<0,35	0	ja	nein
22	oP	-	<0,35	0	ja	unbekannt

AÖ: Angioödem, Bl: Blähungen, D: Dyspnoe, Flu: Flush (Gesichtsrötung) Gi: Schmerz im Gastrointestinaltrakt, K: Konjunktivitis, OAS: orales Allergiesyndrom, oP: offene Provokation, R: Rhinitis, U: Urticaria.

Die Reaktion dieser Patienten auf Sellerie wurde mittels einer offenen Provokation mit frischem Sellerie getestet, welche für alle Patienten negativ ausfiel. 18% dieser Seren zeigten eine positive Reaktion im ImmunoCAP® auf Sellerie, was auf IgE-Kreuzreaktionen zwischen Birke und Sellerie zurückgeführt werden kann. Ein Großteil der auf Sellerie allergischen Patienten wurde wie für Karotte von Frau Prof. Dr. med B. K. Ballmer-Weber zur Verfügung gestellt, alle anderen stammten aus der Sammlung des Paul-Ehrlich-Instituts.

### **3.7.1.2 Kontrollgruppenkollektiv**

Sowohl für die Karotten- als auch die Selleriestudie wurde ein Kollektiv aus Kontrollseren zusammengestellt. Diese Seren stammten alle von Patienten, die unter keiner Allergie leiden. Wenn möglich, wurden offene Provokationen mit den frischen Gemüsen durchgeführt, welche zum Einschluss in die Kontrollgruppe negativ ausfallen mussten. Des Weiteren wurden nur Patienten eingeschlossen, deren Seren im ImmunoCAP® einen karotten- bzw. selleriespezifischen IgE-Gehalt von kleiner 0,35 kU<sub>A</sub>L aufwiesen.

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Sellerieknolle, wurde das kommerziell erhältliche System RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend der Herstellerangaben verwendet, welches speziell für die Reinigung von RNA aus pflanzlichen Materialien entwickelt wurde. Die so gewonnene RNA wurde mittels des First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, Freiburg) unter Verwendung des Oligonukleotides Not  $I-d(T)_{18}$ , welches spezifisch an den Poly(A)-Bereich von mRNA bindet, in kodierende DNA (cDNA) umgeschrieben.

#### 4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Abschnitte unter Verwendung thermostabiler Polymerasen<sup>117</sup> in vitro vermehrt und verändert werden. Als DNA-Matrize wurde entweder die in Kap. 4.1.1 gewonnene cDNA aus Sellerie, oder bereits klonierte Allergen-Expressionsvektoren (z.B. Dau c 1.0104/pET16b) verwendet. Alle für die PCR verwendeten Primer sind in den Tabellen 6 und 7 aufgelistet. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes richtete sich exakt nach den Herstellerangaben der verwendeten Polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Darmstadt). Die dNTPs wurden von der Firma GE Healthcare (Freiburg) bezogen und die Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 14 Bedingungen der Polymerase-Kettenreaktion.

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
94°C	5 min	1x
94°C	30sec	} 30x
55°C	1 min	
72°C	1,5 min	
72°C	10min	1x
4°C	endlos	1x

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 4.1.3) kontrolliert und bei Bedarf aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gereinigt.

#### 4.1.2.1 Fusions-PCR

Die Fusion der beiden Dau-c-1-Isoformen erfolgte unter Verwendung der in Kap. 4.1.2 beschriebenen Chemikalien, lediglich als DNA-Matrize wurden gleiche Mengen an gereinigtem PCR-Produkt der überlappenden Dau-c-1-DNA-Sequenzen in den Reaktionsansatz eingesetzt. Das Protokoll der PCR sah wie folgt aus:

*Tabelle 15 Bedingungen der Fusions-Polymerase-Kettenreaktion.*

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
94°C	5 min	1x
94°C	1sec	} 30x
55°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10min	1x
4°C	endlos	1x

#### 4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese kann DNA nach Größe aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid in UV Licht sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Gele mit, je nach zu erwartender Fragmentgröße, 1-2% (w/v) Agarose (Bioline, Luckenwalde) in TAE-Puffer, in einer Gelkammer (RAGE, Biokey, Portland, USA) gegossen. Die mit 6x Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 210 V durchgeführt. Die Färbung des Gels erfolgte nach Beendigung des Elektrophoreselaufes für ca. 30 min in einem Ethidiumbromidbad (75µg/ml in dH<sub>2</sub>O) und nach Anregung mittels UV-Licht (320nm) konnte die DNA in einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen) dokumentiert werden. Zur Kontrolle der Größe wurde der Größenstandard 1 Kb Plus DNA Ladder™ der Firma Invitrogen, Darmstadt eingesetzt.

#### **4.1.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente, z.B. Restriktions- oder PCR-Produkte, nach der Auftrennung in Agarosegelen (Kap. 4.1.3) zu reinigen, wurden diese unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Reinheit des Produktes wurde mittels einer weiteren Agarose Gelelektrophorese überprüft.

#### **4.1.5 Restriktionsverdau**

Zur Ligation von cDNA z.B. Api g 1.02, Dau c 1 FP und Dau c 1 3x in die Expressionsvektoren, musste die cDNA aus dem Klonierungsvektor pCR®II-TOPO® (Kap. 4.1.6.1) herausgeschnitten und die Zielvektoren pET11a und pET16b (Novagen, Schwalbach) linearisiert werden. Dazu wurde die DNA mittels passender Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs (Frankfurt/Main)), unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen zugehörigen Puffer enzymatisch verdaut. Für einen präparativen Restriktionsansatz wurden 3-5 µg DNA, für einen analytischen 1 µg DNA, mit 5 Units Enzym pro 1µg DNA für 3 Stunden bei 37 °C in einem Endvolumen von 10 bis 50 µl inkubiert. War ein Doppelverdau mit unterschiedlichen Enzymen aufgrund von inkompatiblen Puffern nicht möglich, so wurden die Enzyme nacheinander eingesetzt, wobei vor Verwendung des zweiten Enzyms ersteres mittels Hitze inaktiviert wurde.

#### **4.1.6 Ligation von DNA in Klonierungs- und Expressionsvektoren**

##### **4.1.6.1 Ligation in den Klonierungsvektor pCR®II-TOPO®**

Vor der Ligation, mittels PCR amplifizierter DNA-Fragmente, ist es sinnvoll, die korrekte Basenabfolge durch eine Sequenzierung überprüfen zu lassen. Optimal dafür ist das Vorliegen des Fragmentes in einem Vektor, der gängige Sequenzierbereiche enthält. Ein solcher Vektor ist pCR®II-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe), der durch einen Thymin-Überhang speziell für die Klonierung von PCR-Produkten konzipiert ist, da vor allem Taq-DNA-Polymerasen bei der PCR einen Adenin-Überhang an das Fragment anhängen. Außerdem liegt er in Konjugation

mit einer Topoisomerase vor und besitzt daher eine eigene Ligaseaktivität. Somit lassen sich PCR-Produkte schnell und effizient, ohne weitere Zwischenschritte in diesen Vektor klonieren. Zu beachten ist allerdings, dass durch die T-A-Ligation keine gerichtete Insertion in den Vektor stattfindet.

Die Ligation von PCR-Produkten in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor erfolgte exakt nach Herstellerangaben. Das bedeutet, dass in der Regel 4µl gereinigtes PCR-Produkt (Kap. 4.1.4) mit 1µl Salzlösung und 1µl TOPO<sup>®</sup>-Vektor für genau fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bis zur Transformation (Kap. 4.1.8) in *E.-coli*-Top10-Zellen auf Eis aufbewahrt oder bei -20°C eingefroren.

#### **4.1.6.2 Ligation in Expressionsvektoren**

Mittels Restriktionsverdau erhaltene, für Protein kodierende DNA (Kap. 4.1.5) kann direkt in Expressionsvektoren ligiert werden, wenn diese mit den gleichen Enzymen linearisiert wurden. Zur Ligation wurde das Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Frankfurt) exakt nach Herstellerangaben verwendet. Die Abschätzung des molaren 1:3 Verhältnisses von Vektor zu Insert erfolgte mittels Vergleich im Agarosegel.

#### **4.1.7 Mutation von DNA**

Punktmutationen, wie in dieser Arbeit der Austausch einer DNA-Base, kann sehr einfach unter Verwendung des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Waldbronn) in DNA eingebracht werden. Hierbei wird die Mutation mittels mutagener Primer in einer PCR unter Verwendung der thermostabilen *PfuTurbo*-DNA-Polymerase, die eine sechsfach höhere Genauigkeit als die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt, in die Ziel-DNA eingebracht. Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, bereits in Expressionsvektoren klonierte cDNA verwenden zu können. Dabei wird während der PCR der komplette Plasmidring vervielfältigt und die Mutation über die Primer eingebaut. Da PCR-Produkte nicht methyliert sind, kann die mütterliche methylierte DNA mittels des Enzyms *Dpn* I abgebaut werden, so

dass nur das veränderte Plasmid zurück bleibt, welches direkt in XL1-Blue kompetente Bakterien transformiert (Kap. 4.1.8) werden kann .

Für alle eingefügten Mutationen wurde diese Methode mit Erfolg angewandt. Wichtig dabei ist allerdings, dass strikt nach Herstellerangaben gearbeitet wird und die Primer genau den Vorgaben des Protokolls entsprechen. Alle hier verwendeten Mutationsprimer sind in Tab. 6 und 7 aufgelistet.

#### **4.1.8 Transformation von Bakterien**

Die Transformation von klonierten Plasmiden erfolgte in der Regel genau nach Herstellerangaben. Die Transformation in Top10 chemisch kompetente Zellen wurde, wie im Protokoll des pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Kits (Invitrogen, Darmstadt) (Kap.4.1.6.1) angegeben, durchgeführt und die Transformation in XL1-Blue superkompetente Zellen wie im Protokoll des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Waldbronn) (Kap. 4.1.7) angegeben.

Sollten Plasmide in die chemisch kompetenten Expressionszellen BL21(DE3) (Merck, Darmstadt) transformiert werden, so wurden die Bakterien im Eisbad aufgetaut und 1 µl Plasmid-DNA pro 50µl Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation für 30 sec bei exakt 43 °C. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C-Medium <sup>118</sup> (Invitrogen, Darmstadt) erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C, nach der 10-20 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen wurden. Die Platten inkubierten anschließend bis zur Bildung einzelner Kolonien entweder über Nacht bei 37 °C im Brutschrank, oder über das Wochenende bei Raumtemperatur.

#### **4.1.9 Selektion der transformierten Bakterien**

Da in dieser Arbeit nur mit Plasmiden gearbeitet wurde, die eine Ampicillin-Resistenz aufwiesen, erfolgte die Primärselektion der Bakterien durch Zugabe von Ampicillin in das Nährmedium der Agarplatten (Kap. 3.4).



#### **4.1.9.1 Blau-weiß-Selektion von Bakterienkolonien**

Neben der einfachen Ligation von PCR-Produkten bietet der Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> noch einen weiteren Vorteil, da der Vektor das *LacZ $\alpha$* -Gen trägt (Abb. 9.6). Dieses Gen kodiert für das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase, welches die farblose Chemikalie 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid („X-Gal“) durch Abspaltung des Zuckerrestes in einen blauen Farbstoff (5-Brom-4-chlor-3-indigo) hydrolysieren kann. Werden Agarplatten verwendet, die „X-Gal“ enthalten, so kann die in den Bakterienkolonien gebildete  $\beta$ -D-Galaktosidase das „X-Gal“ umsetzen, so dass die Kolonien eine Blaufärbung annehmen. Wird allerdings ein Insert in den kodierenden Bereich des *LacZ $\alpha$* -Gens kloniert, so verschiebt sich das Leseraster des Gens und das Enzym kann nicht mehr gebildet werden. Diese Kolonien behalten ihre weiße Färbung. Dadurch ist es möglich, Bakterienklone mit Insert (weiß) von Klonen ohne Insert (blau) zu unterscheiden. Um diesen Sachverhalt auszunutzen, wurden alle in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor klonierten PCR-Produkte auf LB-Amp-XGal-Agarplatten (Tab. 5) kultiviert.

#### **4.1.9.2 Kolonie-PCR**

War eine Blau-weiß-Selektion nicht möglich, so konnte eine Kolonie-PCR einzelner Bakterienklone durchgeführt werden. Dazu wurde mittels einer Impfüse etwas Bakterienmaterial der Kolonie aufgenommen und statt der DNA in den Standard-PCR-Ansatz (Kap. 4.1.2) eingesetzt. Als Primer dienten, wenn möglich, ein vektor- und ein insertspezifisches Oligonukleotid (Tab. 6, 7 und 8)

#### **4.1.10 DNA-Plasmidpräparation aus *E. coli***

Bakterienklone, die positiv selektioniert wurden, dienten als Ausgangsmaterial für Kulturen, die zur Vermehrung der Plasmid-DNA dienten. Dazu wurden 5 ml LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, mit der Bakterienkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Bakterien-schüttler inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA wurde anschließend mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration der DNA

wurde photometrisch mittels des NanoDrop-Photometers (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) und zugehöriger Software bestimmt.

#### **4.1.11 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der klonierten DNA wurde mittels kommerzieller vektorspezifischer Primer, oder mittels selbst konstruierter insertspezifischer Primer der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden circa 1 µg gereinigte Plasmid-DNA auf ein Volumen von 15 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und versendet. Nach vollständiger Sequenzierung konnte die Sequenz mit zugehörigem Chromatogramm über die Internetseite von Eurofins heruntergeladen werden. Die Auswertung der DNA-Analyse erfolgte mittels der Vector NTI Advance™ Software (Invitrogen, Darmstadt).

## **4.2 Proteinchemische Methoden**

### **4.2.1 Expression rekombinanter Proteine**

Um rekombinante Proteine in ausreichenden Mengen herzustellen, müssen mindestens 1 L induzierte Bakterien vorliegen. Dazu wurden zunächst 5 ml Übernachtskulturen der in BL21(DE3) transformierten Expressionsplasmide, wie für die Plasmidpräparation beschrieben, angesetzt (Kap. 4.1.10). Mit 1 ml dieser Kultur konnten dann 1 L LB-Medium angeimpft werden, welches 50 µg/ml Carbenicillin (Roth, Karlsruhe), ein Ampicillin-Analogon, enthielt. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C inkubiert, bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht war, was einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 entsprach. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte der Start der Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Carl Roth, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 1mM. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase, in der Regel nach 4 Stunden bei 37 °C, oder über Nacht bei 20 °C, wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet. Die Kontrolle der erfolgreichen Expression des gewünschten Proteins erfolgte durch Abnahme von je 1 ml Bakterienkultur vor und nach Induktion der Bakterien. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.2) analysiert.

## **4.2.2 Zellaufschluss induzierter Bakterien**

### **4.2.2.1 Nativer Zellaufschluss**

Das nach Induktion von 1 L Bakterienkultur durch Zentrifugation gewonnene Bakterienpellet wurde in 30 ml Bindungspuffer aufgenommen, zur Lyse dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren (dazwischen wurde die Lösung stets aufgetaut) und anschließend bei 13.000 xg für 30 Minuten zentrifugiert. War die Lösung durch freigesetzte DNA zu viskös, wurden vor der Zentrifugation 10U/ml Benzonase (Merck KGaA, Darmstadt) zugesetzt. Das exprimierte Zielprotein befindet sich im Überstand und kann nun mittels präparativer SDS-PAGE (Kap. 4.2.3.1) oder Metallchelate-Affinitätschromatographie (Kap. 4.2.3.2) gereinigt werden.

### **4.2.2.2 Denaturierender Zellaufschluss**

Sind die induzierten Proteine mittels des nativen Zellaufschlusses nicht aus den Bakterien herauszulösen, so muss ein denaturierender Zellaufschluss erfolgen. Dazu wird dem Bindungspuffer 8 M Harnstoff zugesetzt. Dies ermöglicht die Freisetzung der Proteine aus den „*inclusion bodies*“ (engl. Einschlusskörper) der Bakterien, allerdings werden dabei die Proteine denaturiert und müssen bei oder nach der anschließenden Reinigung in der Regel schonend wieder zurück gefaltet werden. Ein Einfrieren und Auftauen wie für den nativen Zellaufschluss (Kap. 4.2.2.1) ist hier nicht nötig. Das in Kap. 4.2.1 gewonnene Pellet wurde nach Aufnahme in 30 ml denaturierendem Bindungspuffer und Zugabe von 15 U/ml Benzonase für 30 Minuten bei Raumtemperatur über Kopf rotiert und anschließend 30 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Protein konnte anschließend mittels präparativer SDS-PAGE (Kap. 4.2.3.1) oder Metallchelate-Affinitätschromatographie (Kap. 4.2.3.2) gereinigt werden.

## 4.2.3 Reinigung rekombinanter Proteine

### 4.2.3.1 Präparative SDS-PAGE mittels Prep Cell

Die Reinigung der Sellerieproteine sollte ohne weitere Aminosäureanhänge, wie dem Histidin-Anhang, erfolgen, weshalb eine Reinigung mittels IMAC (Kap. 4.2.3.2) nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden die Proteine mittels präparativer SDS-PAGE unter Verwendung der Prep-Cell-Apparatur (Model 491) der Firma BioRad, München (Abb. 1) gereinigt. Hierbei werden die Proteine elektrophoretisch über ein zylindrisches Polyacrylamidgel anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Erreichen die Proteine das Ende des Gels werden sie über eine Fritte und eine Dialysemembran in die Elutionskammer geleitet. Mittels einer angeschlossenen Peristaltikpumpe und eines Fraktionssammlers (beides GE Healthcare, Freiburg) können Fraktionen bestimmter Volumina gesammelt werden.

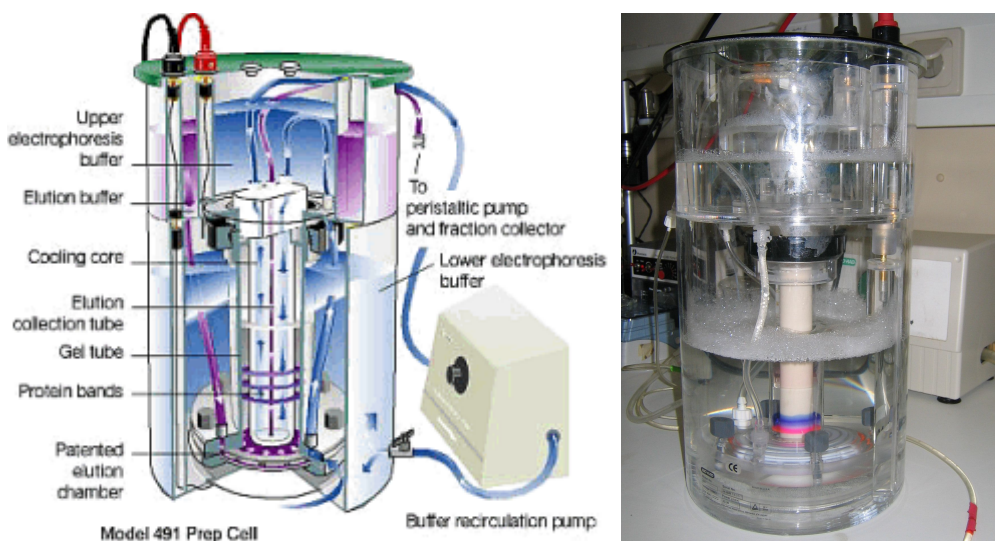


Abbildung 1: Prinzip der Proteintrennung mittels Prep Cell.

Um die Sellerieproteine zu trennen wurden SDS-Gele (Trenngel: 18 %, 6,5 cm hoch, Sammelgel: 5 %, 2 cm hoch) nach Laemmli<sup>119</sup> (Kap. 4.2.4.2) mit einem Durchmesser von 28 mm gegossen. Die in Kapitel 4.2.2.2 gewonnene Proteinlösung wurde mit 4x SDS-Puffer (+ $\beta$ -ME) versetzt und aufgeköcht. Nach Zusammenbau der Apparatur erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von maximal 8 ml Probe bei konstanter Stromleistung von 12 W über ca. 8 Stunden. Es wurden 2,5 ml

Fraktionen gesammelt, die anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert wurden. Fraktionen gleicher Größe wurden vereinigt, mittels Acetonfällung (Kap. 4.2.3.3) von der Elutionslösung befreit, in PBS aufgenommen und je nach Bedarf einer zweiten Prep-Cell-Reinigung unterzogen.

#### **4.2.3.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Rekombinante Proteine, welche einen Histidin-Anhang (His-Tag) besitzen, können mittels Affinität dieses Tags zu zweiwertigen Metallionen gereinigt werden. Dies betraf nur die Karottenproteine, welche in den pET16b-Vektor kloniert wurden, der die Sequenzinformation für diesen Tag trägt. Somit erfolgte die Reinigung der rekombinanten Karottenproteine, welche sich nach der Zentrifugation im Überstand befanden (Kap. 4.2.2.1 und 4.2.2.2), mittels His-GraviTrap-Säulen (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben. Lediglich die Elution wurde dahingehend verändert, dass nicht mehrmals mit 1M Imidazol-Elutionspuffer eluiert wurde, sondern mit steigenden Konzentrationen an Imidazol (100 mM, 250 mM, 500 mM und 1 M).

Die Rückfaltung der denaturierten Proteine (Kap. 4.2.2.2), konnte direkt auf der His-GraviTrap-Säule während des Waschvorganges durchgeführt werden. Dazu wurde die Konzentration an Harnstoff bei jedem zweiten Waschschrift kontinuierlich verringert (8 M, 4 M, 2 M, 1 M und 0 M). Der Waschvorgang ohne Harnstoff wurde insgesamt 4 mal wiederholt, um sicherzustellen, dass die Proteine ohne Harnstoff eluiert wurden. Die erfolgreiche Reinigung der Proteine wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.2) kontrolliert und die Elutionsfraktionen vereinigt, welche das reine Proteine enthielten. Je nach Anwendung wurden die Proteine anschließend in die entsprechende Lösung umgepuffert.

#### **4.2.3.3 Acetonfällung von Proteinen**

Um Proteine aus wässrigen Lösungen auszufällen, wurde ein Volumenanteil der Proteinlösung mit 4 Volumenanteilen -20°C kaltem 100% igem Aceton versetzt, über Nacht bei -20°C inkubiert und anschließend die ausgefallenen Proteine mittels Zentrifugation (15 min bei 12.000 x g und 4 °C) gewonnen. Nach

Abdampfen des Acetons im Abzug konnten die Proteine im zu verwendeten Puffer zurückgelöst werden.

## **4.2.4 Proteinanalytik**

### **4.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Bestimmung des Gehaltes an gelöstem Gesamtprotein in den Lösungen der gereinigten rekombinanten Proteine erfolgte nach der Methode von Bradford<sup>120</sup> mittels des Roti®-Nanoquant (5x Konzentrat, Carl Roth, Karlsruhe) Protein-Bestimmungsreagenz nach Herstellerangaben.

### **4.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Analytik der gereinigten rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-(engl. „sodium dodecyl sulfate“)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli<sup>119</sup> durchgeführt. Durch das Aufkochen der Proben in SDS-haltigem Puffer werden die Proteine denaturiert und durch Anlagerung von SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen. Dadurch wandern sie in einem Polyacrylamidgel geeigneter Porengröße durch Anlegen eines elektrischen Feldes, je nach Ladungsstärke schneller oder langsamer zur Anode und werden somit anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Mengen an zugesetztem Acryl- und Bisacrylamid bestimmen dabei die Porengröße des Gels. Hier wurde eine gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30 % ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 (Rotiphorese® Gel 30; Carl Roth, Karlsruhe) verwendet. Die Zusammensetzung von Trenngel- und Sammelgellösungen erfolgte laut Tabelle 4.3 und die Präparation der Gele mittels des Mini-PROTEAN® 3 Systems (Bio-Rad, München). Die elektrophoretische Trennung wurde nach folgendem Spannungsprofil durchgeführt: 10 min 80 V, 20 min 100 V und 45 min 200 V. Als Proteinstandard wurde stets der LMW-Marker der Firma GE-Healthcare, Freiburg, mitgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.

Trenngel				Sammelgel			
gewünschtes %T		12,0	15,0	gewünschtes Volumen	ml	6,0	12,0
gewünschtes Volumen	ml	20,0	21,0	H <sub>2</sub> O	ml	3,50	7,00
H <sub>2</sub> O	ml	7,00	5,25	Trenngelpuffer (4x)	ml	1,50	3,00
Trenngelpuffer (4x)	ml	5,00	5,25	Acrylamidlg. (30%T)	ml	1,00	2,00
Acrylamidlg. (30%T)	ml	8,00	10,50	Pyronin Y (1%)	µl	6	12
SDS-Lsg. (10%)	µl	200	210	SDS-Lsg. (10%)	µl	60	120
TEMED	µl	20	21	TEMED	µl	12	24
APS (10%)	µl	100	105	APS (10%)	µl	30	60

#### 4.2.4.3 Proteinfärbung

Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde durch Färbung mit dem Färbereagens GelCode Blue (Thermo Fisher Scientific, Bonn) nach Herstellerangaben oder über die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick<sup>121</sup> kontrolliert.

#### 4.2.5 Endotoxine in rekombinanten Proteinen

Bei der Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* kommt es oft zur Verunreinigung mit Endotoxinen. Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, welche in biologischen Systemen und Tierversuchen die Ergebnisse verfälschen können.

##### 4.2.5.1 Bestimmung des Endotoxingehaltes

Zur Bestimmung des Gehaltes an LPS in den Proteinlösungen wurde der LAL-Geltest (Limulus Amöbocyten Lysat) (Acila, Weiterstadt) nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Test hat ein Detektionslimit von 0,015 EU/ml, was in etwa 1,5 pg Endotoxin/ml Proteinlösung entspricht. Ziel war es, dass die Endotoxin-konzentrationen aller Proteinlösungen unterhalb dieses Detektionslimits lagen.

##### 4.2.5.2 Abreicherung von Endotoxinen mittels Endo-Trap-Säulen

Zur Abreicherung von Endotoxinen aus den Lösungen der rekombinanten Proteine wurden EndoTrap®-HD-Säulen (Hyglos, Regensburg) nach Herstellerangaben

verwendet. Der Erfolg der Endotoxinanreicherung wurde mittels des LAL-Geltestes (Kap. 4.2.5.1) kontrolliert.

#### 4.2.6 CD-Spektroskopie

Die Untersuchung von Proteinen hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur mittels der CD-Spektroskopie ist ideal, um Aussagen über die Faltung der Proteine zu machen<sup>122</sup>. Um von Proteinen ein CD-Spektrum aufnehmen zu können, müssen diese in einem Puffer mit geringer Salzkonzentration vorliegen. Ideal ist ein 10 mM Kaliumphosphatpuffer, so dass alle rekombinanten Proteine vor der Messung im CD-Spektrometer in diesen umgepuffert wurden. Für die Messungen wurde ein J-810 Spektrometer der Firma Jasco, Groß-Umstadt, verwendet, welches an ein CDF-426S Peltier Kühlelement, gekoppelt an ein Wasserbad F200 (Julabo, Seelbach), angeschlossen war. Die Probe, welche idealerweise eine Konzentration von 2-5  $\mu\text{M}$  aufwies, wurde in einer Quarzküvette (1 mm Schichtdicke, Hellma, Müllheim) vermessen.

##### 4.2.6.1 Aufnahme von CD-Spektren

Die Aufnahme von einfachen Spektren der Proteine erfolgte nach oben genannten Bedingungen bei einer Temperatur von 20 °C, einer Geschwindigkeit von 50 nm/min und einem Wellenlängenbereich von 180-250 nm. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verringern, wurden 10 aufgenommene Spektren akkumuliert. Zur Auswertung wurde die mittlere molare Elliptizität  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) nach folgender Formel berechnet und gegen die Wellenlänge aufgetragen.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \Theta / (c \cdot d \cdot N)$$

Dabei ist  $\Theta$  die gemessene Elliptizität,  $N$  die Anzahl der Aminosäuren,  $d$  die Schichtdicke der Küvette in cm und  $c$  die Konzentration der Proteinlösung in mM.



#### **4.2.6.2 Aufnahme von Denaturierungskurven mittels CD-Spektroskopie**

Zur Bestimmung der Temperatur, bei der Proteine von einem gefalteten Zustand in einen ungefalteten übergehen, wurden Denaturierungskurven der Proteine bei einer konstanten Wellenlänge von 220 nm aufgenommen. Dabei wurde die Probe in einem Temperaturbereich von 20-100 °C konstant um 2 °C pro Minute erhitzt, bzw. abgekühlt. Wie in Kap. 4.2.6.1 beschrieben, wurde die mittlere molare Elliptizität errechnet und diesmal im Diagramm gegen die gemessene Temperatur aufgetragen.

#### **4.2.7 Modellierung der theoretischen 3D-Struktur von Proteinen**

Liegt von einem Protein noch keine experimentell ermittelte 3D-Struktur vor, so kann diese anhand einer bereits bekannten 3D-Struktur eines homologen Proteins modelliert werden. In dieser Arbeit wurde dazu die Software SWISS-MODEL verwendet. Zur Modellierung von Api g 1.02 wurde dessen Proteinsequenz auf der Homepage [www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org) in das dafür vorgesehene Feld eingefügt und die PDB-ID (engl. „protein database identification number“) 2BK0 von Api g 1.01 als Vorlage angegeben. Nach Abschluss der online-Modellierung<sup>123-125</sup> konnte die fertige Struktur von Api g 1.02 von der Internetseite heruntergeladen und mittels ViewerLite (Accelrys, San Diego, USA) bearbeitet werden.

### **4.3 Immunchemische Methoden**

#### **4.3.1 ELISA**

##### **4.3.1.1 Humaner IgE-ELISA**

Zur Bestimmung der IgE-Bindungskapazität der rekombinanten Sellerieproteine wurde ein IgE-ELISA (engl. „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) eingesetzt. Maxisorp™-Platten (96-well, Nunc, Wiesbaden) wurden mit den Proteinen (50 ng in 100 µl PBS pro Kavität) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit 2 % BSA in PBS (200 µl/Kavität), fand die Inkubation mit den verdünnten Seren (1:4 in Inkubationspuffer (IP)) über Nacht bei Raumtemperatur statt. Die spezifische Detektion von gebundenem IgE wurde

mittels einstündiger Inkubation mit biotinkoppeltem Anti-human-IgE-Antikörper aus Ziege (1:2000 in IP) (KPL, Medac, Wedel) und anschließender Einwirkung von Neutravidin-HRP (1:10.000 in IP, 1h) (Fisher Scientific, Schwerte). Die Färbung erfolgte durch Zugabe von TMB-Lösung für 20-30 Minuten. Die Farbreaktion wurde mittels 50µl/Kavität 3 M Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bichromatisch (450/360 nm) in einem Plattenlesephotometer (SpectraMax 340, Molecular Devices, Ismaning). Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationen in einem Volumen von 100µl/Kavität, bei Raumtemperatur. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Platten 4x mit Waschpuffer (300µl/Kavität) gewaschen. Positiv wurden alle Seren gewertet deren OD größer als dreimal die OD der Negativkontrolle waren.

#### **4.3.1.2 Muriner IgG-ELISA**

Spezifische IgG-Antikörper im Serum immunisierter Mäuse wurden mittels ELISA bestimmt. Dazu wurden Maxisorp™-Platten (96-well, Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4°C mit dem zu bestimmenden Antigen (0,5 µg/ml in Karbonatpuffer) beschichtet und am nächsten Tag die freien Bindungsstellen mit 1% BSA in Waschpuffer (300 µl/Kavität) blockiert. Die Inkubation der Seren erfolgte anschließend in einer Verdünnungsreihe ( $1:\sqrt{3}$ , beginnend mit 1:100) für 1,5 Stunden. IgG wurde durch Zugabe von Ammoniumperoxid markiertem Anti-Maus-IgG ( $\gamma$ -Ketten-spezifisch, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Färbung mittels pNPP-Tabletten (nach Herstellerangaben, Sigma-Aldrich) detektiert. Die optische Dichte wurde bichromatisch bei 405/650 nm in einem Plattenlesephotometer (SpectraMax 340, Molecular Devices, Ismaning) bestimmt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationen in einem Volumen von 100 µl/Kavität, bei Raumtemperatur. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Platten 4x mit Waschpuffer (300 µl/Kavität) gewaschen. Die Auswertung der Daten erfolgte als Titrationskurve durch den Auftrag der Verdünnung gegen die OD.

## **4.3.2 ELISA-Inhibition**

### **4.3.2.1 Bestimmung der Serenverdünnung mittels Titrationskurve**

Die ELISA-Inhibitionen auf Sellerie- und Karottenproteine sollten zur Einsparung von Serum mit zu Pools vereinigten Seren durchgeführt werden. Zur Bestimmung der optimalen Verdünnung jedes einzelnen Serums, wurden diese im IgE-ELISA (Kap. 4.3.1.1) mittels einer Verdünnungsreihe, beginnend mit einer 1:2 Verdünnung, titriert. Die Verdünnung, bei der das Serum eine OD zwischen 0,8 und 0,9 aufwies, wurde anschließend zum Ansatz der Serenpools verwendet. Für die Inhibitionstests mit Api-g-1-Isoformen an der Festphase wurden zwei Pools gebildet. Pool A bestand aus vier Seren von Sellerieallergikern, die nur auf Api g 1.01 sensibilisiert waren, Pool B aus Seren, die mit beiden Api-g-1-Isoformen reagierten. Für die Inhibition, bei denen die Karottenallergene an der Festphase gebunden waren, wurde für beide Isoformen ein Pool aus je fünf Seren verwendet.

### **4.3.2.2 Durchführung der ELISA-Inhibition**

Die Durchführung des Inhibitions-ELISA war analog zu der des IgE-ELISA (Kap. 4.3.1.1), einzig die Seruminkubation erfolgte in Gegenwart der Inhibitoren. Für die Api-g-1-Inhibition waren dies Api g 1.01, Api g 1.01K<sup>44E</sup>, Api g 1.01S<sup>111P</sup>, Api g 1.02 und Api g 1.02C<sup>111P</sup> in einer Verdünnungsreihe von 100 µg/ml bis 0,0001 µg/ml. Für die Dau-c-1-Inhibition wurden die Serenpools der immunisierten Mäuse als Inhibitoren in einer Verdünnungsreihe von 1:2,5, beginnend mit 1:2, eingesetzt. Die Inhibitoren (50 µl/Kavität) wurden in die Mikrotiterplatte pipettiert, anschließend mit den verdünnten Serenpools der Humansen auf 100 µl/Kavität aufgefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbliebene IgE-Bindung an die beschichteten Platten wurde wie oben beschrieben in optischer Dichte gemessen.

Der Prozentsatz an Inhibition wurde anschließend über folgende Formel bestimmt:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{OD(B}\emptyset\text{)} - \text{OD(B)}}{\text{OD(B}\emptyset\text{)} - \text{OD(NSB)}}$$

B: Serum mit Inhibitor; B $\emptyset$ : Serum ohne Inhibitor; NSB: nicht spezifische Bindung der Immunreagenzien

### **4.3.3 Bestimmung von spezifischem IgE in Humanseren mittels EAST**

#### **4.3.3.1 Herstellung von Allergenscheiben**

Zur Durchführung des enzymkonjugierte Allergo-Sorbent-Tests (EAST) (Kap. 4.3.3.2) sind allergengekoppelte Scheiben notwendig. Da die mit Dau-c-1-Isoformen und -Mutanten gekoppelten Scheiben nicht kommerziell erhältlich sind, mussten diese selbst hergestellt werden. Dazu wurden Bromcyan (BrCN) aktivierte Filterpapierscheiben (Hycor, Kassel) mit jeweils 0,25 $\mu$ g der rekombinanten Dau-c-1-Isoformen und -Mutanten pro Scheibe gekoppelt. Die benötigte Menge an BrCN aktivierten Scheiben wurde gravimetrisch bestimmt, einmal mit Kopplungspuffer gewaschen und mit der jeweiligen Proteinlösung (0,25  $\mu$ g/Scheibe verdünnt in 10 ml Kopplungspuffer), über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend fand die Deaktivierung freier Bindungsstellen durch zweistündiges Einwirken von Deaktivierungspuffer bei Raumtemperatur statt, gefolgt von einer zweimaligen Inkubation á 30 Minuten mit Acetatpuffer. Abschließend wurden die Scheiben noch zweimal mit PBS gewaschen und entweder direkt im EAST (Kap. 4.3.3.2) verwendet, oder zur Lagerung bei -20 °C lyophilisiert. Alle Inkubationsschritte fanden auf einem Kreisschüttler statt und zwischen jedem Pufferwechsel wurden die Scheiben zweimal je 5 Minuten mit Kopplungspuffer gewaschen.

#### **4.3.3.2 Durchführung des EAST**

Der enzymkonjugierte Allergo-Sorbent-Test dient, wie der ELISA, zur Bestimmung von spezifischem IgE in humanen Seren. Durch das Mitführen einer Standard-Kalibrationsgerade können die Ergebnisse im Gegensatz zum ELISA in der internationalen Einheit IU/L angegeben werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Allergopharma, Reinbek) allerdings wurden keine kommerziell erhältlichen Allergenscheiben eingesetzt, sondern mit rekombinanten Karottenproteinen gekoppelte Scheiben, wie in Kapitel 4.3.3.1 beschrieben.

#### **4.3.4 Mediatorfreisetzung mittels der RBL-Zelllinie**

Die Zelllinie RBL-2H3, eine basophile Ratten-Leukämiezelle, trägt an ihrer Oberfläche den FcεRI-Rezeptor, welcher IgE bindet. Wird das gebundene IgE mittels spezifischer Allergene kreuzvernetzt, kommt es zur Freisetzung von Mediatoren, wie Histamin und β-Hexosaminidase. Durch Quantifizierung der Menge an ausgeschütteten Mediatoren kann der Gehalt an allergenspezifischen IgE-Antikörpern im Serum von immunisierten Mäusen bestimmt werden<sup>126,127</sup>.

Dazu wurden die Zellen in der stationären Wachstumsphase geerntet, auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in MEM 5% FKS (Gibco, Life technologies, Darmstadt) eingestellt und in 96-Loch-Flachbodenplatten (Nunc, Fisher Scientific, Schwerte) a 150µl pro Kavität ausgesät. Nach Anheftung der Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C, wurden diese durch Zugabe der Mausseren in einer Verdünnungsreihe für 1h sensibilisiert (50µl/Kavität).

Die Stimulation mit Antigen erfolgte ebenfalls für 1h nach Zugabe von in Tyrodepuffer verdünnter Allergenlösung (100µl/Kavität). Zwischen Sensibilisierung und Stimulation wurde die Platte 4x mit 250µl/Kavität Tyrodepuffer 1x gewaschen.

Die Mediatorfreisetzung lässt sich durch Umsetzung des eingesetzten Substrates mittels des durch die Zellen ausgeschütteten Enzyms β-Hexosaminidase in einen gelben Farbstoff leicht bestimmen. Dazu wurden nach Beendigung der Stimulation je 30µl der Zellüberstände in eine mit 50µl RBL-Substratlösung pro Kavität bestückte neue Platte überführt, für 45 Minuten inkubiert und die Reaktion durch

Zugabe von 100µl/Kavität Glycinlösung abgestoppt. Hierbei wurde die Farbreaktion sichtbar und konnte nun bei einer Wellenlänge von 400nm (Referenzwellenlänge: 650nm) in einem Photometer gemessen werden. Sämtliche Inkubationsschritte fanden, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in einem Wasserbad statt.

Als Kontrollen wurden Proben für die Spontanfreisetzung (Freisetzung ohne Stimulation) und die totale β-Hexosaminidase-Freisetzung (Lyse der Zellen durch Triton) mitgeführt.

Die Mediatorfreisetzung wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{Mediatorfreisetzung (\%)} = \frac{\text{OD(Probe)} - \text{OD(Spontan)}}{\text{OD(Total)}}$$

Zur Auswertung der Daten wurde im folgenden die IgE-Induktion mit der Mediatorfreisetzung in Korrelation gesetzt. Dies bedeutet, dass ein hoher Mediatorrelease mit einem hohen Gehalt an kreuzvernetzendem IgE gleichgesetzt werden konnte.

## 4.4 Tierexperimentelle Arbeiten

Sämtliche tierexperimentellen Arbeiten wurden nach Vorgaben des hessischen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 4.4.1 Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Karottenallergenen

Zur Untersuchung des Einflusses der Struktur von Karottenallergenen auf deren Antigenität und Allergenität wurden 5 bis 6 Wochen alte BALB/c Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) 6 mal in zweiwöchigem Abstand immunisiert. Die Applikation der rekombinanten Karottenproteine erfolgte intraperitoneal (i.p.) in einem Volumen von 500µl unter Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans. Pro Immunisierung wurden folgende Dosen an rDau c 1.01 + rDau c 1.02, rDau c 1FP, rDau c 1.01S<sup>111</sup>P + rDau c 1.02C<sup>111</sup>P und rDau c 1 FP<sup>111</sup>P (s. Tab. 17) eingesetzt: 0,01 µg/Dosis, 0,1 µg/Dosis und 1,0 µg/Dosis. Um unspezifische

Endotoxin-Effekte auszuschließen, wurden diese vor der Applikation aus den Allergenlösungen mittels EndoTrap-Säulen entfernt (s. Kap. 4.2.5.2)

#### **4.4.2 Finale Blutentnahme**

Nach Beendigung der Immunisierung in Woche 12 erfolgte die Serumgewinnung. Dazu wurden die Tiere final durch eine Herzpunktion unter Isofluran-Narkose mit anschließender zervikaler Dislokation geblutet und nach 20 minütiger Gerinnungsphase des Blutes das Serum durch Zentrifugation des Gesamtblutes für 10 min bei 3.000 x g gewonnen.

## 5 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, die bereits beschriebenen klinisch relevanten Hauptallergene aus Sellerie und Karotte so zu verändern, dass deren allergenes Potential vermindert ist, sie aber noch in der Lage sind, eine Immunantwort auszulösen. Dazu sollten bekannte IgE bindende Epitope in ihrer Konformation verändert, beziehungsweise zerstört, sowie Oligomere der Allergene hergestellt werden. Die so generierten hypoallergenen Derivate sollen als mögliche Allergentherapeutika mit reduziertem Risiko für unerwünschte Nebenreaktionen diskutiert werden.

### 5.1 Klonierung der Allergene Api g 1.01, Dau c 1.01 und Dau c 1.02

Um gezielt den Einfluss von Mutationen und Oligomerisierungen auf die Allergenität von Proteinen zu untersuchen, müssen zum Vergleich auch die unveränderten (wildtyp, wt) Allergene in klonierter Form vorliegen. Dabei handelt es sich um die beiden Isoformen des Hauptallergens aus Sellerie Api g 1.01 und Api g 1.02 und die Varianten des Hauptallergens aus Karotte Dau c 1.0104 und Dau c 1.0201. Bis auf das Allergen Api g 1.02 lagen alle Gene dieser Proteine bereits in Expressionsvektoren kloniert vor, so dass die Plasmide im Rahmen der Arbeit nur über eine Subklonierung amplifiziert und in das zugehörige Expressionsbakterium *E. coli* transformiert werden mussten.

### 5.2 Klonierung der Isoform Api g 1.0201

Zur Gewinnung der für die Isoform Api g 1.0201 codierenden DNA aus Sellerieknolle wurde zunächst Gesamt-RNA aus einem Stück Knollensellerie isoliert und anschließend mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Kap. 4.1.1). Da die DNA-Sequenz von Api g 1.0201 bereits unter der Acc. No. Z75662<sup>56</sup> beschrieben war, konnten direkt geeignete Primer für das 5' und 3' Ende konstruiert werden, welche in einer PCR mit der cDNA aus Sellerie eingesetzt wurden. Das erhaltene DNA-Produkt wurde in den Vektor pCR®II-





### 5.3 Klonierung von Dau c 1-Oligomeren

In unserer Arbeitsgruppe lagen die für die beiden Isoformen (Acc. Nos. Z81362 und AF456481) des Karottenallergens Dau c 1 codierenden DNA Sequenzen bereits in den Expressionsvektor pET16b kloniert vor. Sequenzen und Vektorkarte s. Kap. 9.2. Diese Konstrukte konnten somit direkt für die Herstellung von Di- und Trimeren verwendet werden.

#### 5.3.1 Konstruktion eines Fusionsproteins aus den beiden Dau c 1 Isoformen

Die DNA der beiden codierenden Sequenzen von Dau c 1.0104 und Dau c 1.0201 wurde mittels PCR aus den vorhandenen pET16b-Konstrukten unter Verwendung der Primer Dau c 1.01(+), Dau c 1.01fus(-), Dau c 1.02fus(+), und Dau c 1.02(-) gewonnen. Die erhaltenen DNA-Fragmente enthielten jeweils überlappende Teile der anzuhängenden DNA. Mittels einer Fusions-PCR konnten die beiden DNA-Fragmente zu einem Konstrukt zusammengefügt werden. Die Gesamtlänge der DNA Sequenz betrug 921bp. Nach Ligation des Produktes der Fusions-PCR in den Sequenziervektor pCR®II-Topo®, wurde diese Größe bei zwei von vier untersuchten Klonen (2 & 4) mittels Kolonie-PCR bestätigt. (5.2)

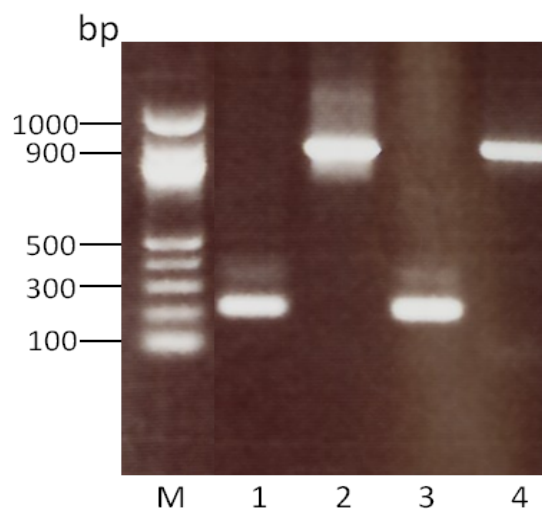


Abb. 5.2: Ergebnis der Kolonie-PCR nach Klonierung des PCR-Fusionsproduktes in den Sequenziervektor pCR®II-TOPO®; M: Marker, 100kb plus (New England Biolabs, ), 1-4: Kolonie-Nr. 1-4.

Nach der Sequenzierung dieser beiden Klone konnte die für das Fusionskonstrukt erwartete Sequenz bestätigt werden (Abb. 5.3)

```

      M G A Q S H S L E I T S S V S A E K I F S
1  ATGGGTGCC CAGAGCCAT TCACTCGAG ATCACTTCT TCCGTCTCA GCAGAGAAA ATATTCAGC

      G I V L D V D T V I P K A A P G A Y K S V
64 GGCATTGTC CTTGATGTT GATACAGTT ATCCCCAAG GCTGCCCTT GGAGCTTAC AAGAGTGTC

      D V K G D G G A G T V R I I T L P E G S P
127 GATGTTAAA GGAGATGGT GGAGCTGGG ACCGTCAGA ATTATCACC CTTCCCGAA GGTAGCCCG

      I T S M T V R T D A V N K E A L T Y D S T
190 ATCACCTCA ATGACGGTT AGAACTGAT GCAGTCAAC AAGGAGGCC TTGACATAC GACTCCACC

      V I D G D I L L G F I E S I E T H L V V V
253 GTTATTGAT GGAGACATC CTTTTAGGC TTCATCGAA TCCATTGAA ACCCATCTT GTCGTTGTG

      P T A D G G S I T K T T A I F H T K G D A
316 CCAACTGCT GATGGGGGT AGCATTACC AAGACCACG GCCATATTC CACACTAAA GGTGATGCC

      V V P E E N I K F A D E Q N T A L F K A I
379 GTCGTTTCTT GAAGAGAAC ATCAAGTTT GCCGATGAG CAGAACACT GCTCTTTTC AAGGCTATT

      E A Y L I A N G V Q K T E V E A P S T V S
442 GAGGCCTAC CTCATTGCT AATGGTGTG CAAAAGACT GAGGTTGAG GCTCCTTCC ACCGTGTCA

      A E K M Y Q G F L L D M D T V F P K V L P
505 GCAGAGAAA ATGTATCAG GGATTTCTC CTTGATATG GACTACTGTT TTCCCCAAG GTTCTTCTT

      Q L I K S V E I L E G D G G V G T V R L V
568 CAGCTTATC AAGAGTGTC GAGATTCTT GAGGGCGAT GGTGGTGTT GGAACCGTC AGACTCGTC

      H L G E A T E Y T T M K Q K V D V I D K A
631 CATCTTGGC GAAGCAACT GAATATACC ACAATGAAG CAAAAGGTA GACGTAATC GACAAGGCC

      G L G Y T Y T T I G G D I L V E G L E S V
694 GGATTAGGC TACACCTAC ACCACCATC GGAGGTGAC ATCCTCGTG GAAGGACTC GAATCCGTG

      V N Q F V V V P T D G G C I V K N T T I Y
757 GTGAATCAA TTCGTTGTT GTGCCAACA GATGGAGGC TGCATTGTG AAGAACACC ACCATTTAC

      N T K G D A V L P E D K V K E A T E K S A
820 AACACCAA GCGATGCT GTGCTCCC GAAGACAAG GTGAAGGAA GCCACCGAA AAGTCTGCC

      L A F K A V E A Y L L A N *
883 CTGGCCTTC AAAGCTGTT GAGGCTTAC CTCCTAGCA AACTAA
    
```

Abb. 5.3: Sequenz der erfolgreichen Fusion der codierenden DNA von Dau c 1.0104 (schwarz) und Dau c 1.0201 (rot).

Dieses Fusionskonstrukt wurde mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen NdeI und XhoI in den ebenfalls mit NdeI und XhoI geschnittenen Expressionsvektor pET16b kloniert und nach Überprüfung des korrekten Einbaus mittels Sequenzierung in die Expressionszellen *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

### 5.3.2 Klonierung eines Dau-c-1.0104-Trimers

Vrtala *et al.*<sup>128</sup> haben ein Trimer des Birkenpollenhauptallergens Bet v 1 publiziert, welches als hypoallergene Mutante beschrieben wurde. In Folgeuntersuchungen konnten die Autoren Van Hage *et. al.*<sup>129</sup> in Hauttestungen zeigen, dass dieses Konstrukt in Birkenpollenallergikern, im Gegensatz zu Bet v 1, keine positiven Reaktionen auslöste. Um die geplanten Multimere und Mutanten mit bereits veröffentlichten hypoallergenen Proteinen vergleichen zu können, wurde auch von Dau c 1.0104 ein entsprechendes Trimer hergestellt. Zur Klonierung wurde die gleiche Strategie angewandt, wie sie von Vrtala für das Bet-v-1-Trimer verwendet wurde<sup>128</sup>. Mittels PCR und geeigneten Primern wurden jeweils an die 3'- bzw. 5'-Enden der cDNA von Dau c 1.0104 Sequenzen angefügt, die für einen Restriktionsverdau angreifbar sind. Somit wurden folgende 3 Produkte erhalten, die in Abb. 5.4 schematisch dargestellt sind.

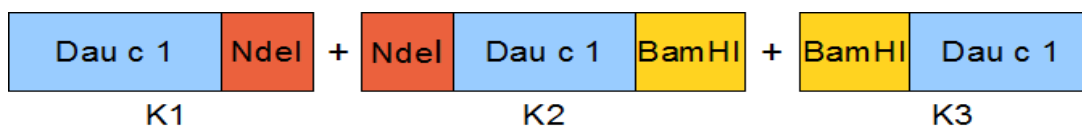


Abb. 5.4: Schematische Darstellung der drei Dau-c-1-Konstrukte K1-K3, welche für die anschließende Ligation zu einem Trimer eingesetzt wurden.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 1,5% igen Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und gereinigt. Anschließend wurde jedes Produkt mit den erforderlichen Restriktionsenzymen geschnitten und die erneut gereinigten Produkte mittels der DNA-Ligase ligiert. So wurde ein Konstrukt erhalten, in dem die cDNA für Dau c 1.01 dreimal hintereinander angeordnet ist. Die Übereinstimmung dieses Produktes mit der theoretisch zu erhaltenden Sequenz wurde mittels Sequenzierung überprüft. Dieses so erhaltene Trimer wurde anschließend in den Expressionsvektor pET16 ligiert und nach Feststellung der korrekten Sequenz mittels Sequenzierung in die Expressionszellen *E. coli* BL21(DE3) transformiert.



Da die Strukturen von Bet v 1 und Api g 1.01 bereits aufgeklärt sind (Bet v 1a, Protein-Datenbank-Nr. (pdb): 1BTV; Api g 1.01, pdb: 2BK0) konnte die Oberfläche dieser Moleküle genauer betrachtet werden. Um die Strukturen auch mit der Isoform Api g 1.02 vergleichen zu können, wurde deren Proteinstruktur mit Hilfe des Programms Swiss-Model modelliert (Kap. 4.2.7). Abbildung 5.6a zeigt die Oberflächenstruktur dieser drei Allergene, vor allem im Bereich der Aminosäureposition 44/45. Hier ist gut zu erkennen, dass sich Api g 1.01 von Bet v 1a und Api g 1.02 an Position 44/45 unterscheidet. Da Api g 1.01 an dieser Position ein positiv geladenes Lysin trägt, besitzt es dort eine andere Ladung, als Bet v 1a und Api g 1.02, die an entsprechender Position die negativ geladene Glutaminsäure tragen. Dies wirkt sich auf die Oberflächenstruktur und auf ein eventuell dort vorhandenes Konformationsepitop aus. (Abb. 5.6a). Sterische Unterschiede an Position 44 bzw. 45 sind Abb. 5.6b zu entnehmen. Auch in dieser Ansicht ist gut zu sehen, dass die Unterschiede zwischen Api g 1.01 und Bet v 1 an dieser Position von großer Bedeutung sein könnten.

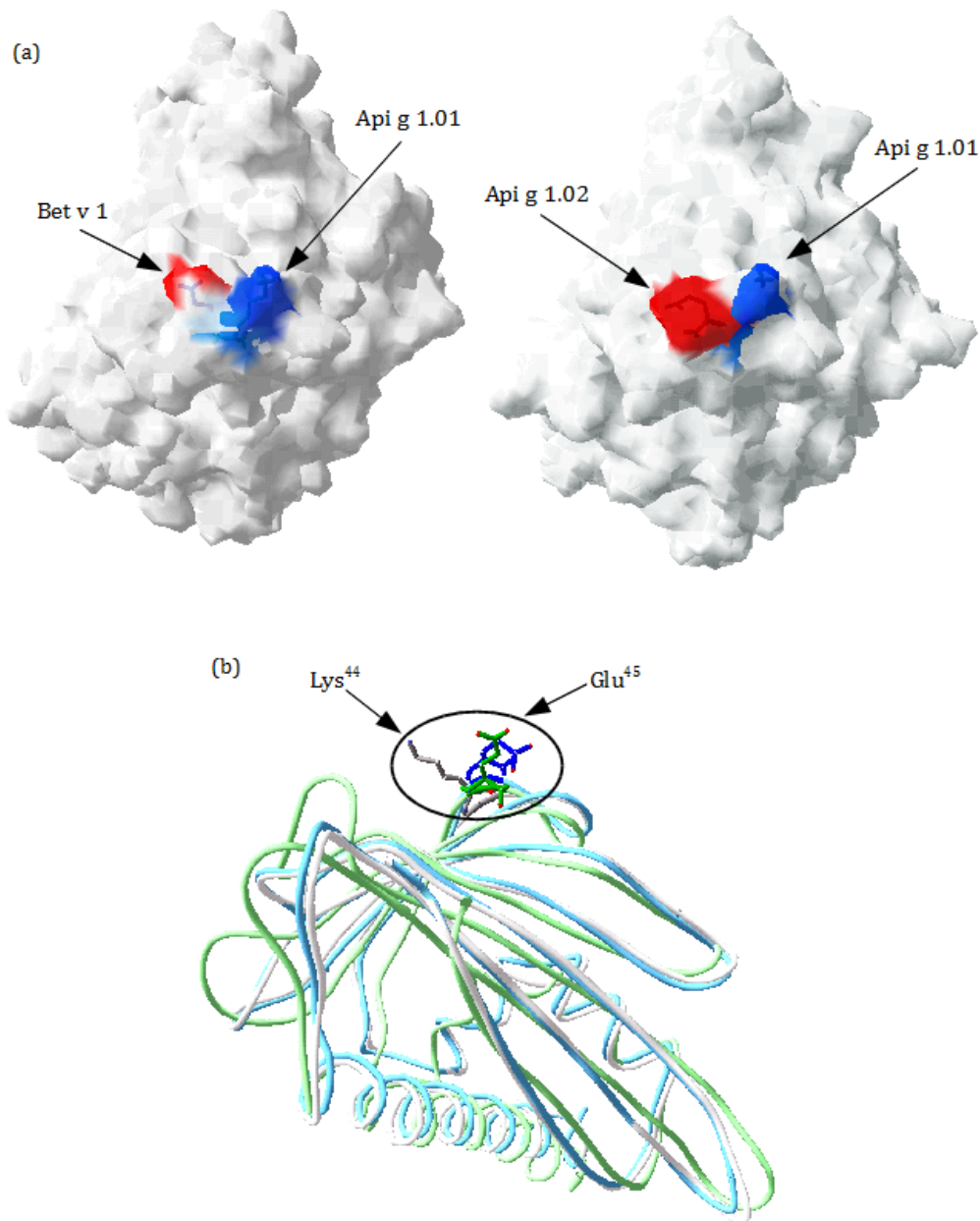


Abb. 5.6 Überlagerte Strukturen von Bet v 1 (pdb: 1BTV), Api g 1.01 (pdb: 2BK0) und Api g 1.02. (a) links: Oberflächenüberlagerung mit markierter Ladung an AS-Position 44/45 (rot: negative Ladung bei Bet v 1; blau: positive Ladung bei Api g 1.01); rechts: Oberflächenüberlagerung mit markierter Ladung an AS-Position 44 (rot: negative Ladung bei Api g 1.02; blau: positive Ladung bei Api g 1.01); (b) zeigt die Überlagerung der Proteinstruktur der drei Allergene; hervorgehoben ist die Orientierung der kritischen Aminosäure an Position 44/45 (blau: Bet v 1; grau: Api g 1.01; grün: Api g 1.02). Api g 1.02 wurde mittels SWISS-MODEL simuliert.

Um zu ermitteln, ob dieser Unterschied einen Einfluss auf die IgE-Reaktivität des Allergens hat, wurde in Api g 1.01 die Aminosäure Lysin an Position 44 durch Glutaminsäure ersetzt. Dazu wurde die DNA mittels spezieller Primer, die die Mutationen trugen, in einer PCR laut Angaben des Herstellers eingesetzt. Vorteil der Verwendung dieses „Kits“ ist, dass keine Klonierung mehr nötig ist, da das

expressionsfähige Plasmid direkt eingesetzt wird. Nach Beendigung der PCR, wurde das maternale Konstrukt über einen DpnI-Verdau abgebaut, so dass nur das durch die PCR mutierte Expressionsplasmid zurück blieb. Nach Transformation in XL1-Blue superkompetente *E. coli* Zellen wurde der korrekte Einbau der Mutation mittels Sequenzierung (Eurofins, Ebersberg) überprüft.

#### **5.4.2 Zerstörung der Struktur mittels gerichteter Mutation**

Des weiteren ist publiziert, dass eine Zerstörung der Konformation von Bet v 1 und homologen Nahrungsmittelallergenen zu einem Verlust der IgE-Reaktivität führt<sup>114</sup>. Die Zerstörung der Struktur wurde durch einen Austausch der Aminosäure Serin an Position 112 durch Prolin erwirkt. Prolin wirkt häufig als Strukturbrecher, da sein ringförmiger Aufbau und die cis-Amidbindung einen erheblichen Einfluss auf  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter ausüben können. Um möglichst viele verschiedene Ansätze der Veränderung von Epitopen auf den Einfluss der Allergenität zu untersuchen, wurde auch diese Mutation in die bereits klonierten Sellerie- und Karottenallergene eingefügt. Im Falle der Isoformen Api g 1.01 und Dau c 1.01 wurde, wie für Bet v 1 beschrieben, jeweils das Serin an Position 112 durch ein Prolin ersetzt. Bei den Isoformen Api g 1.02 und Dau c 1.02 befindet sich an Position 112 jeweils ein Cystein, welches auch hier durch Prolin ersetzt wurde. Gleiches wurde auch bei dem Fusionsprotein Dau c 1.01/1.02 durchgeführt. Der Austausch der Aminosäuren erfolgte ebenso wie der von Api g 1.02 K<sup>44</sup>E (Kap. 5.4.1) durch gerichtete Mutation mittels PCR durch Einsatz des Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Nach Überprüfung der korrekten Mutation mittels Sequenzierung wurden auch diese Plasmide in die Expressionszellen *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

### **5.5 Auflistung aller klonierten Proteine**

Zur Vereinfachung sind in Tabelle 17 nochmals alle klonierten und zur Expression bereitstehenden Allergenkonstrukte aufgeführt. Der Einfachheit halber wurden alle Konstrukte mit neuen Namen versehen, die in der letzten Spalte aufgeführt sind. Im folgenden werden in der Arbeit nur noch diese Benennungen angeführt.



Tabelle 17: Klonierte Allergene, Mutanten und Oligomere (FP: Fusionsprotein).

Plasmid	Mutation/ Oligomerisierung	Name des neuen Plasmids bzw. des exprimierten Proteins
Api g 1.01/pET11a	-	Api g 1.01
Api g 1.01K <sup>44</sup> E/pET11a	K <sup>44</sup> E	Api g 1.01K <sup>44</sup> E
Api g 1.01S <sup>111</sup> P/pET11a	S <sup>111</sup> P	Api g 1.01S <sup>111</sup> P
Api g 1.02/pET11a	-	Api g 1.02
Api g 1.02C <sup>112</sup> P/pET11a	C <sup>112</sup> P	Api g 1.02C <sup>112</sup> P
Dau c 1.0104/pET16b	-	Dau c 1.01
Dau c 1.0104S <sup>112</sup> P/pET16b	S <sup>112</sup> P	Dau c 1.01S <sup>112</sup> P
Dau c 1.0201/pET16b	-	Dau c 1.02
Dau c 1.0201C <sup>112</sup> P/pET16b	S <sup>112</sup> p	Dau c 1.02C <sup>112</sup> P
Dau c 1.0104- Dau c 1.0201FP/pET16b	Fusionskonstrukt	Dau c 1 FP
Dau c 1.0104S <sup>111</sup> P- Dau c 1.0201C <sup>111</sup> P FP/pET16b	Fusions- konstrukt <sup>111</sup> P	Dau c 1 FP <sup>111</sup> P
Dau c 1.0104 Trimer/pET16b	Trimer	Dau c 1 3x

## 5.6 Expression und Reinigung der Allergene aus Sellerie und Karotte

Die in Kapitel 5.3 und 5.4 beschriebenen klonierten Allergene und ihre Mutanten und Oligomere wurden mittels der Induktion mit IPTG zur Expression gebracht.

Um einen Klon zu finden, der eine gute Expressionsrate aufweist, wurden mehrere Bakterienkolonien gepickt und über Tag in 5ml LB-Medium kultiviert. Abends wurde 1 ml der Kultur als Negativkontrolle abgenommen und der Rest über Nacht mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1mM induziert. Zur Überprüfung der Expressionsrate und ob ein Klon überhaupt zur Expression der rekombinanten Proteine in der Lage ist, wurde sowohl von den uninduzierten, als auch von den induzierten Bakterienkulturen eine kleine Menge auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Beispiel für eine solche Überprüfung verschiedener Klone ist die Induktion von Api g 1.01K<sup>44</sup>E in Abb. 5.7 dargestellt.

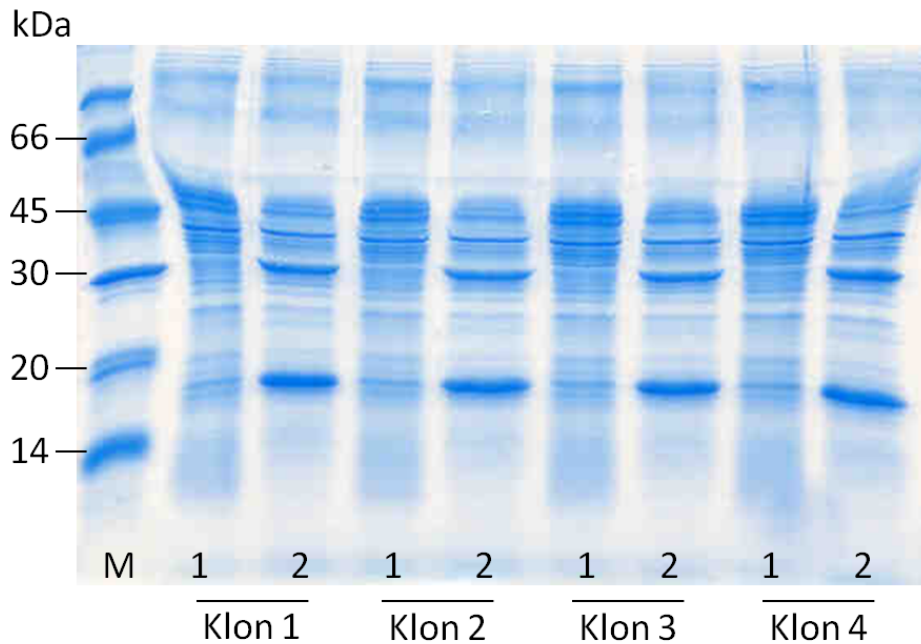


Abb. 5.7: Induktion mehrerer Klone von *Api g 1.01K<sup>44</sup>E*; M: LMW Marker, GE-Healthcare, Freiburg; 1: uninduziert; 2: induziert.

Hier ist eindeutig zu sehen, dass bei den nicht induzierten Bakterienkulturen, jeweils Spur 1, nur eine geringe Eigeninduktion erfolgt ist, während bei den über Nacht zur Proteinexpression angeregten Klonen, jeweils Spur 2, eine deutliche Proteinexpression bei etwa 17 kDa nachweisbar ist. Das theoretisch ermittelte Molekulargewicht von *Api g 1.01K<sup>44</sup>E* liegt bei 16 kDa, somit ist davon auszugehen, dass es sich bei dem exprimierten Protein um das Zielprotein *Api g 1.01K<sup>44</sup>E* handelt. Gleiche Ergebnisse wurden auch für die restlichen Allergene und Mutanten erzielt, die Daten werden hier aber nicht gezeigt.

### 5.6.1 Expression und Reinigung der Sellerieallergene

In einer vorhergehenden Studie wurde in Kooperation mit der Universität Bayreuth, Lehrstuhl für Biopolymere, bereits die Struktur der Isoform *Api g 1.0101* untersucht<sup>57</sup>, weshalb uns in dieser weiterführenden Studie 2 mg des Proteins durch Prof. Dr. Rösch zur Verfügung gestellt werden konnte. Da diese Isoform ohne His-Tag kloniert und gereinigt wurde, waren alle anderen Sellerieallergene ebenfalls ohne His-Tag zu reinigen. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rösch, wurden die Sellerieproteine nicht mittels Chromatofocusing, sondern

über präparative SDS-PAGE gereinigt. Daher musste gewährleistet werden, dass die unterschiedlichen Reinigungsstrategien keinen Einfluss auf die Struktur und IgE-Bindungsfähigkeit der Isoformen und Varianten hatte. Deshalb wurde auch kommerziell erhältliches Api g 1.01 (Fa. Biomay, Wien) mit den von uns eingesetzten Proteinen im IgE-ELISA und der CD-Spektroskopie verglichen (s. Kap. 5.6.1.1).

Nachdem für die klonierten Sellerieallergene und -mutanten ein geeigneter Expressionsklon gefunden wurde, sind diese im großen Maßstab exprimiert worden. Dazu wurden jeweils 1-Liter-Kulturen über Nacht bei 23°C mit Hilfe von IPTG induziert. Nach Gewinnung der Bakterienpellets wurden diese in Lysepuffer resuspendiert und unter Zugabe von Benzonase dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, was zum Aufschluss der Zellmembran führte. Das so erhaltene Bakterienlysate konnte nun zur Reinigung eingesetzt werden.

Durch das Fehlen eines His-Tags konnte hier nicht die in Kap 5.6.2.1 beschriebene Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose durchgeführt werden, weshalb die Sellerieallergene über präparative SDS-PAGE gereinigt (Kap. 4.2.3.1) wurden. Dazu wurden die Bakterienlysate der einzelnen Proteine jeweils mehrmals über eine 6 cm hohe 18%ige Polyacrylamidsäule gegeben. Durch Verwendung der PrepCell-Aparatur der Firma BioRad konnten die Proteine nach Durchwandern des Gels mittels Fraktionssammler der Größe nach aufgefangen werden.

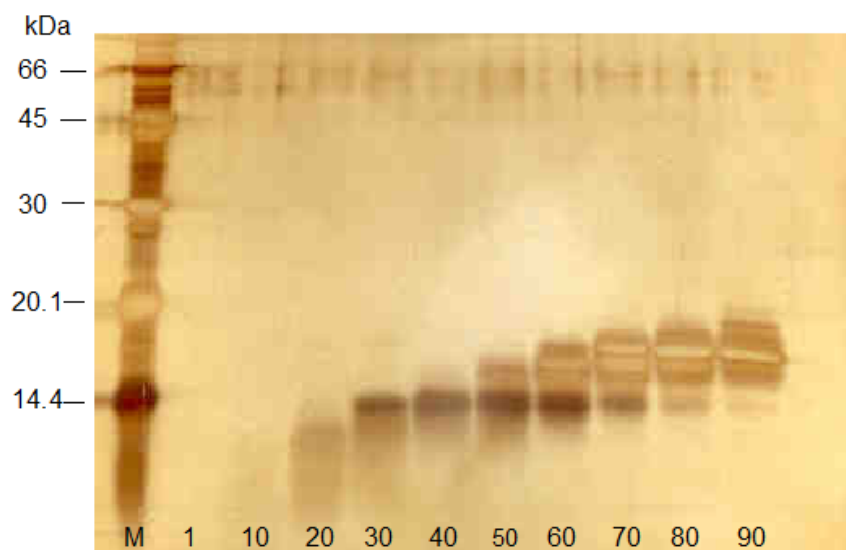


Abb. 5.8: SDS-PAGE von *Api-g-1.02C<sup>11</sup>P*-Fraktionen nach Reinigung mittels präparativer SDS-PAGE; M: LMW-Marker; 1-90 bezeichnet die jeweils aufgetragene Fraktion (Silberfärbung).

Die Fraktionen, die Proteine in der Größe um 14kDa enthielten (s. Beispiel Abb. 5.8) wurden gepoolt, einer zweiten PrepCell-Reinigung unterzogen und die Fraktionen, die das Zielprotein in reiner Form enthielten, ebenfalls mittels silbergefärbter SDS-PAGE bestimmt, vereint. Nach Acetonfällung (Kap. 4.2.3.3) wurden die rekombinanten Proteine in 1/10 PBS aufgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Mittels dieser Methode wurde aus einem Liter induzierter Bakterien im Mittel um die 5ml sehr reinen Proteins mit Konzentrationen um 250µg/ml erhalten.

#### **5.6.1.1 Vergleich der Isoformen und Mutanten von Api g 1**

Da der Expressionsgrad der Isoform Api g 1.02 auch nach verschiedenen Expressionsbedingungen zu niedrig war, und somit nur geringe Mengen rekombinantes Api g 1.02 gereinigt werden konnten, wurden uns 2 mg dieses Proteins von Dr. Jonas Lidholm (Thermo Fisher, Uppsala, Schweden) zur Verfügung gestellt. Allerdings lag diese Isoform nur als 6xHistidin-Fusionsprotein vor, weshalb sichergestellt werden musste, dass der His-Tag keinen Einfluss auf die IgE-Reaktivität hatte. Aus diesem Grund wurde das His-Tag-Api-g-1.02 mit den geringen Mengen des über PrepCell gereinigten Api g 1.02 mittels IgE-ELISA verglichen. Hier war kein Unterschied in der IgE-Bindungseigenschaft der beiden Proteine festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Gleiches galt für die Isoform Api g 1.01. Da die anderen Api-g-1-Mutanten, wie in Kapitel 5.6.1 beschrieben, mittels präparativer SDS-Page gereinigt wurden musste auch hier ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Reinigungsarten keinen Einfluss auf Faltung und IgE-Reaktivität haben. Dazu wurden die CD-Spektren und auch die IgE-Bindungseigenschaften von Api g 1.01 mit kommerziell erhältlichem Api g 1.01 der Fa. Biomay (Wien) verglichen. Sowohl CD-Spektren, als auch die IgE-Bindung im ELISA waren identisch (Daten nicht gezeigt).

Bevor die rekombinanten Sellerieallergene in weiteren Testsystemen eingesetzt wurden, wurde ihre Größe und Reinheit mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE überprüft. In Abb. 5.9 ist zu erkennen, dass alle rekombinanten Proteine eine hohe Reinheit (>95%) aufwiesen und auch in den erwarteten Größenbereichen lagen.

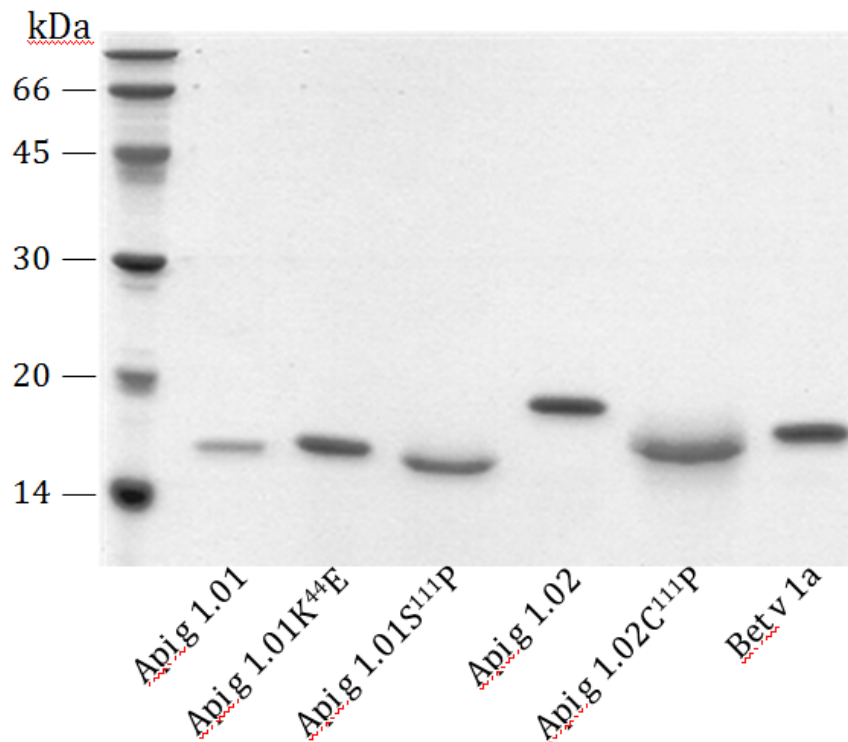


Abb. 5.9: Analyse der gereinigten Sellerieallergene mittels SDS-PAGE, 2µg/Spur Coomassie gefärbt; M: LMW Marker.

Um die rekombinant hergestellten Proteine mit einem kommerziell erhältlichen Allergen zu vergleichen, wurde auf das Gel auch das homologe Allergen aus Birke, rBet v 1 der Firma Biomay (Wien) aufgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass das Laufverhalten der Api-g-1-Proteine im Gel mit dem von rBet v 1 vergleichbar ist. Api g 1.02 zeigt eine leicht höhere molekulare Masse, als die anderen Proteine, was durch den zusätzlichen His-Tag zu erklären ist.

## 5.6.2 Expression und Reinigung der Karottenallergene

### 5.6.2.1 Native Reinigung von Dau c 1.01 und Dau c 1.02

Auch für die Expression der Karottenallergene, ihrer Mutanten und Oligomere wurde jeweils der Klon zur Expression gebracht, der bei Voruntersuchungen die beste Proteininduktion gezeigt hatte (Kap. 5.6.). Diese Klone wurden im 1 L Maßstab mittels IPTG über Nacht bei 23°C zur Proteininduktion angeregt und durch anschließende Zentrifugation die Bakterien in Form eines Pellets gewonnen. Der Aufschluss der Bakterienzellwände erfolgte durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff, was zur Freisetzung des in den Bakterien

produzierten Proteins führen sollte. Leider war das nur bei Dau c 1.01 und Dau c 1.02 der Fall, für die  $^{111}\text{P}$ -Mutanten und die Oligomere blieb das meiste Protein in Einschlusskörpern der Bakterien zurück (Kap. 5.6.2.2). Die Reinigung der in Lösung befindlichen rekombinanten Allergene Dau c 1.01 und 1.02 erfolgte anschließend über ein am N-terminus der Proteine angehängtes 10fach Histidin-Peptid (His-Tag), welches eine hohe Affinität zu Zwertigen Ionen aufweist (z.B.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ )<sup>130</sup>. Dazu wurden die Bakterienreste abzentrifugiert und der Überstand über eine Ni-NTA-Sepharose-Säule gegeben. Dabei bindet das rekombinante Protein über den His-Tag an die Nickelionen und kann nach mehrmaligem Waschen der Säule durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an Imidazol von der Säule eluiert werden. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert und die Fraktionen gepoolt, welche die gereinigten Proteine enthielten. Abb. 5.10 zeigt als Beispiel die Reinigung von Dau c 1.02. In Kap. 5.6.2.2, Abb. 5.12 sind die nativ gereinigten rekombinanten Karottenallergene Dau c 1.01 und 1.02 im Vergleich zu den denaturierend gereinigten Dau c 1 Oligomeren und Mutanten aufgetragen.

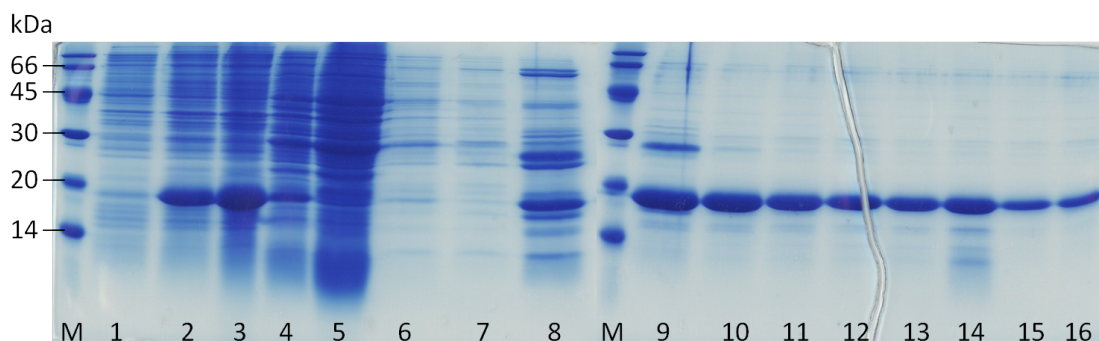


Abb. 5.10: Reinigung von Dau c 1.02; M: LMW-Molekular Marker, 1: Bakterienkultur vor Induktion der Expression, 2: Bakterienkultur nach Induktion der Expression, 3: Bakterienlysats nach 3x einfrieren und auftauen, 4: Überstand des Bakterienlysats, 5: Pellet des nativen Bakterienlysats, 6-7: Waschfraktionen der IMAC, 8-16: Elutionsfraktionen der IMAC; Auftrag je 10 $\mu\text{l}$ /Spur.

Mittels Proteinbestimmung nach Bradford wurde für Dau c 1.01 eine Gesamtproteinmenge von 2,5 mg und für Dau c 1.02 von 2,1 mg bestimmt.

### 5.6.2.2 Denaturierende Reinigung der Mutanten und Oligomere

Da die Mutanten und Oligomere von Dau c 1 nach der Expression in Einschlusskörpern (engl. „inclusion bodies“) der Bakterien vorlagen (Kap. 4.2.2.2),

wurden die gewonnenen Bakterienpellets für den Zellaufschluss eine Stunde in harnstoffhaltigem Puffer unter Rühren inkubiert. Dabei wurden die rekombinanten Proteine in den Puffer freigesetzt, so dass sie wie in Kap. 5.6.2.1 beschrieben mittels Ni-NTA-Sepharose gereinigt werden konnten. Allerdings werden durch die Behandlung der Bakterien mit Harnstoff auch die Proteine denaturiert, so dass zur Rückfaltung der rekombinanten Allergene eine schonende Entfernung des Harnstoffs aus der Proteinlösung notwendig war. Dazu wurde nach Bindung der His-Tag-Proteine an die Ni-NTA-Sepharose die Säule mit Puffern gewaschen, in denen Harnstoff in absteigenden Konzentrationen enthalten war. Nach mehrmaligem Waschen mit harnstofffreiem Puffer wurden die Proteine wie in Kap. 5.6.2.1 beschrieben, mittels imidazolhaltigem Puffer von der Säule eluiert und die Reinheit über SDS-Page überprüft. In Abb. 5.11 ist ein solcher Reinigungsablauf von Dau c 1.02C<sup>111</sup>P dargestellt. Hier ist gut zu sehen, dass nach denaturierender Lyse alles Protein im Lysat (Spur 3) enthalten ist, während nach nativer Lyse, wie in Abb. 5.10 (Spur 5) zu sehen noch einiges Protein im Bakterienpellet enthalten ist.

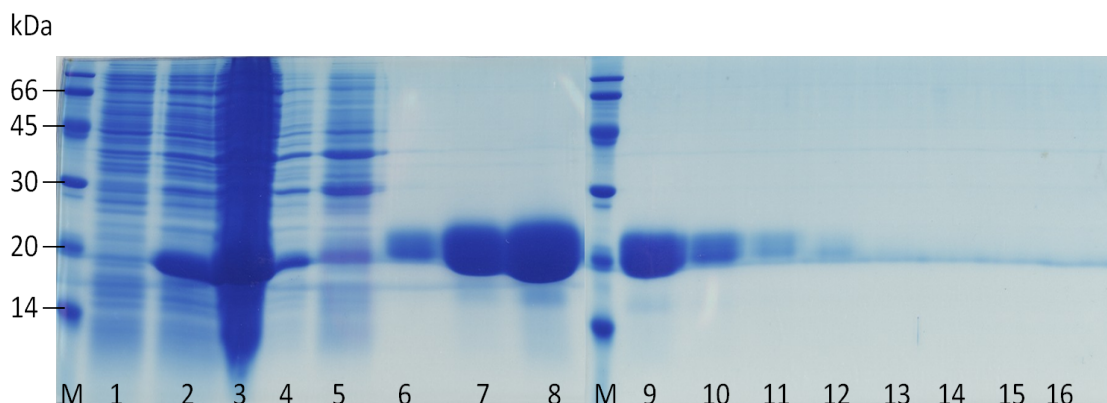


Abb. 5.11 Reinigung von Dau c 1.02C<sup>111</sup>P; M: LMW-Molekular Marker, 1: Bakterienkultur vor Induktion der Expression, 2: Bakterienkultur nach Induktion der Expression, 3: Bakterienlysats nach Lyse mit Harnstoff, 4: Pellet des denaturierten Bakterienlysats, 5-6: Waschfraktionen der IMAC, 7-16: Elutionsfraktionen der IMAC; Auftrag je 10µl/Spur.

Die Reinigung der anderen Mutanten und Oligomere verlief gleichermaßen und ergab vergleichbare SDS-Gel-Resultate, weshalb auf Abbildungen dieser Reinigungen verzichtet wird.

Nach Vereinigung aller Fraktionen, die sauberes Protein enthielten, wurde die Proteinkonzentration der gereinigten Allergene mittels Bradford bestimmt.



Da für die tierexperimentellen Arbeiten große Mengen an reinem Protein notwendig waren, wurden einige Proteine mehrmals exprimiert und gereinigt, um diese Mengen zu erhalten. Ein Vergleich aller gereinigten Allergene, Oligomere und Mutanten aus Karotte im Coomassie gefärbten SDS-Gel zeigt Abb. 5.12.

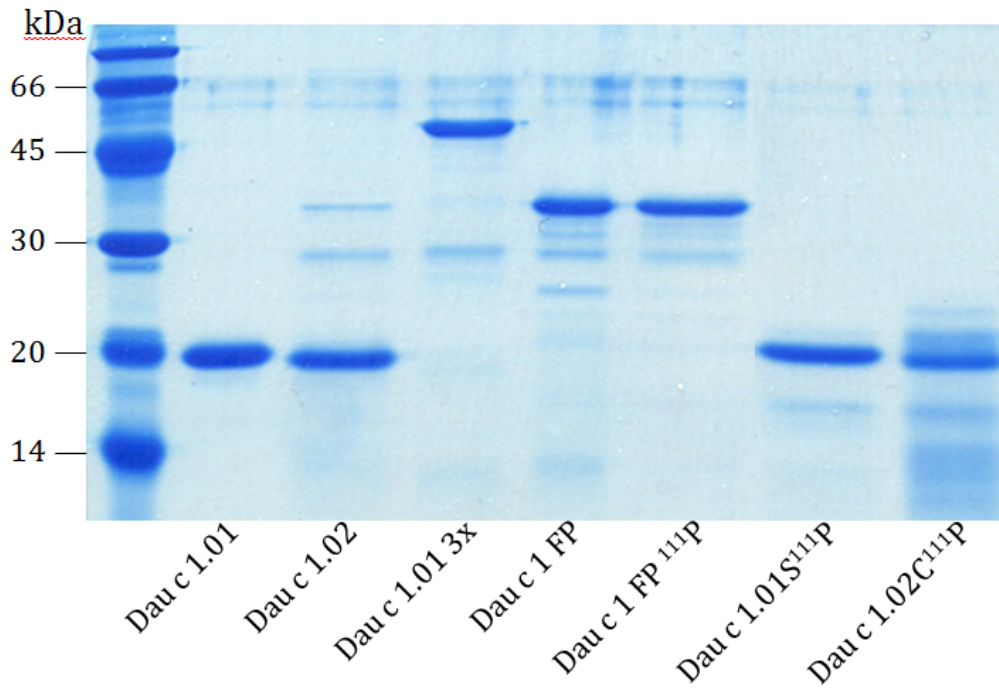


Abb. 5.12: SDS-PAGE aller rekombinanten Karottenproteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, 2µg/Spur, Coomassie Färbung; M: LMW-Marker (GE Healthcare).

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass alle rekombinanten Proteine bis auf Dau c 1.02C<sup>111</sup>P in ausreichender Reinheit vorliegen und eine dem theoretisch berechneten Molekulargewicht entsprechende Größe aufweisen. Im Vergleich zu Dau c 1.01 besitzt Dau c 1.02 ein Cystein an Position 111 in seiner Sequenz, was zu einer Dimerisierung mittels Disulfidbrückenbindungen führen kann. Da die SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, könnte dieses Dimer die Bande in Abb. 5.12 (Dau c 1.02 Spur) im Bereich von 40 kDa erklären, vorausgesetzt die Disulfidbindung ist so stark, dass sie der Behandlung mit SDS widersteht. Dau c 1.02C<sup>111</sup>P zeigt dieses Dimer nicht, da hier das Cystein zu Prolin mutiert wurde und somit auch keine Disulfidbrücken, mehr gebildet werden konnten. Dau c 1.02C<sup>111</sup>P zeigt einige niedermolekularen Verunreinigungen, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln könnte. Aus diesem Grund wurde dieses Protein ein weiteres mal gereinigt. In Abb. 5.11 Spuren 7-9 ist das Ergebnis der erneuten Reinigung dargestellt. Hier sind keine Verunreinigungen der



Proteinlösung zu erkennen, weshalb die neue Präparation für alle weiteren Versuche verwendet wurde.

## 5.7 Strukturelle Untersuchungen der rekombinanten Allergene aus Sellerie und Karotte mittels CD-Spektroskopie

Um die Studien mit rekombinanten Proteinen durchführen zu können, musste sichergestellt sein, dass sie eine intakte Struktur aufwiesen, bzw. für die Mutanten, deren Struktur gezielt zerstört werden sollte, keine Faltung vorlag. Dies ließ sich mittels CD-Spektroskopie nachweisen. Anhand der Stärke der Ablenkung von zirkular polarisiertem Licht durch die Proteine, konnten Aussagen über die Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine getroffen werden.

### 5.7.1 Sekundärstruktur der rekombinanten Sellerieallergene

Die gereinigten rekombinanten Sellerieallergene und Mutanten wurden wie in Kap. 4.2.6 beschrieben, mittels CD-Spektroskopie auf ihre Sekundärstruktur untersucht. Anhand der erhaltenen Kurven (Abb. 5.13) konnten Aussagen über ihre Struktur getroffen werden.

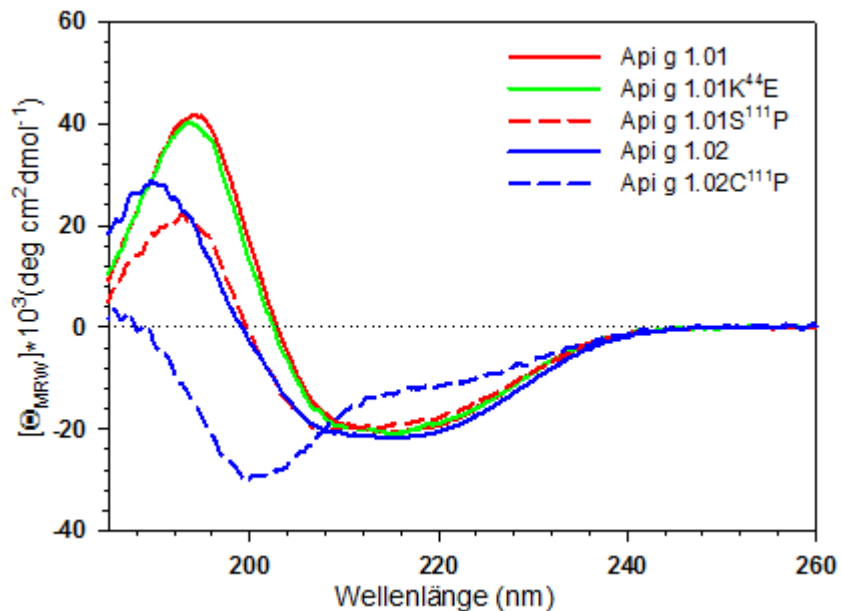


Abb. 5.13: CD-Spektren der rekombinanten Sellerieallergene.

Abb. 5.13 zeigt die CD-Spektren aller rekombinant hergestellten Sellerieproteine. Api g 1.01 und seine Mutante K<sup>44</sup>E zeigen einen Kurvenverlauf, welcher charakteristisch für Proteine mit vorhandener Sekundärstruktur ist. Auch die Isoform Api g 1.02 zeigt Sekundärstrukturen, allerdings ist die Kurve im Vergleich zur Isoform 1.01 verschoben, was auf andere Anteile an  $\alpha$ - und  $\beta$ - Faltblätter hinweist, oder auch auf Anteile ungefalteten Proteins. Wie erwartet ist die Sekundärstruktur von Api g 1.02C<sup>111</sup>P durch das Einführen des Helixbrechers Prolin an Position 111 zerstört worden.  $\alpha$ - und  $\beta$ - Faltblätter sind hier nicht mehr nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war dies bei der Isoform Api g 1.01S<sup>111</sup>P nicht der Fall. Hier konnten Anteile an vorhandener Sekundärstruktur nachgewiesen werden. Um zu zeigen, dass Api g 1.01 und seine Prolinmutante unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Faltung und Stabilität aufwiesen, wurden Denaturierungskurven (Kap. 4.2.6.2) der beiden Proteine im CD-Spektrometer aufgenommen (Abb. 5.14).

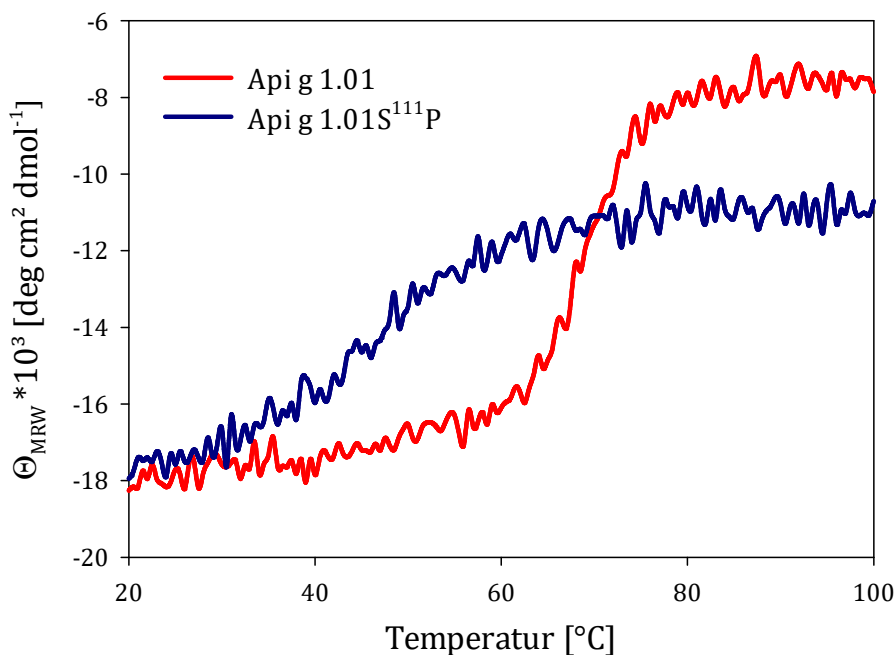


Abb. 5.14: Denaturierungskurven von rApi g 1.01 und seiner Prolinmutante.

Anhand der Denaturierungskurven, wie sie Abb. 5.14 zeigt, konnte nachgewiesen werden, dass das rekombinante Api g 1.01 mit der Prolin-Punktmutation bei einer niedrigeren Temperatur in einen ungefalteten Zustand überging, als das nicht

mutierte Protein. Die Kurve des wildtyp-Proteins hat ihren Wendepunkt bei etwa 70°C, was mit dem Übergang in den ungefalteten Zustand gleichzusetzen ist. Bei der Mutante ist dieser Punkt nicht eindeutig zu bestimmen, hier liegt der Übergang von gefaltetem in ungefalteten Zustand zwischen 40° und 50°C. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass rekombinantes Api g 1.01S<sup>111</sup>P strukturell weniger stabil ist und somit eine andere Faltung aufweist, als das Wildtyp-Protein.

### 5.7.2 Sekundärstruktur der rekombinanten Karottenallergene

Wie die Sellerieallergene wurden auch die gereinigten rekombinanten Karottenallergene und Mutanten mittels CD-Spektroskopie auf ihre Anteile an vorhandenen Sekundärstrukturen untersucht (Abb. 5.15).

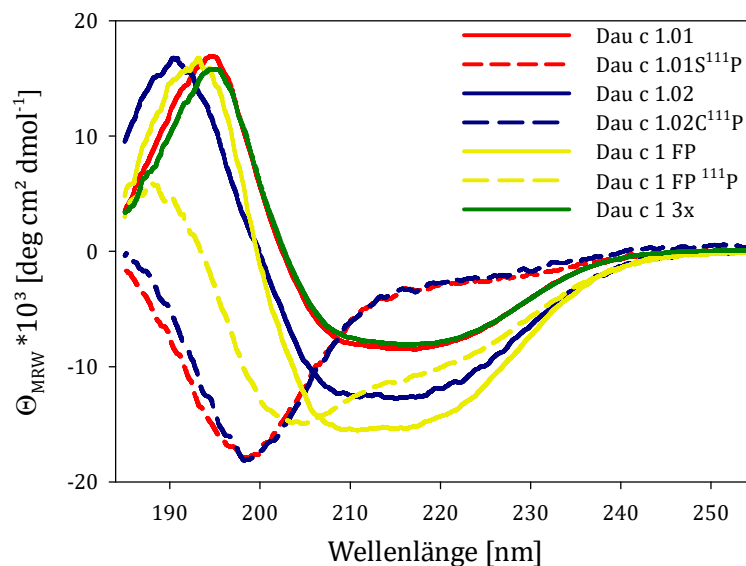


Abb. 5.15: CD-Spektren der rekombinanten Karottenproteine.

Die CD-Spektren der rekombinanten Karottenproteine, wie sie in Abb. 5.15 zu sehen sind, zeigen ähnliche Charakteristika wie die der Sellerieproteine. Dau c 1.02 zeigt die gleiche Verschiebung der Kurve gegenüber Dau c 1.01, wie Api g 1.02 gegenüber Api g 1.01, was zeigt, dass die beiden Proteine nicht nur eine hohe Sequenzidentität aufweisen, sondern auch eine sehr ähnliche Sekundärstruktur. Die Prolinmutanten der beiden Isoformen Dau c 1.01 und 1.02 zeigen wie erwartet

keinen Anteile an vorhandener Sekundärstruktur. Die Fusionierung der beiden Isoformen führt zu einem CD-Spektrum, was zwischen den Kurven der Monomere lag. Das bestätigt, dass beide Proteine ihre vorhandenen Sekundärstrukturen ausgebildet haben und zu ähnlichen Teilen einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Fusionsproteins ausüben. Der Durchgang des Spektrums von Dau c 1 FP durch die X-Achse ist jedoch identisch mit dem von Dau c 1.02 was darauf hindeuten könnte, dass Dau c 1.02 einen größeren Anteil an den vorhandenen Sekundärstruktur ausmacht, als Dau c 1.01. Die Fusion der beiden Prolinmutanten der Isoformen zeigen im Gegensatz zu den monomeren Mutanten, Anteile einer intakten Sekundärstruktur. Das Trimer aus Dau c 1.01 zeigt eine identische Sekundärstruktur wie das Monomer, somit scheint die Fusionierung einer Isoform keinen Einfluss auf dessen Struktur zu haben.

Mittels der CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass alle rekombinant hergestellten Allergene aus Sellerie und Karotte auf Ebene der vorhandenen Sekundärstrukturen in dem gewünschten strukturellen Zustand vorlagen und wurden somit wie vorgesehen in den immunologischen und tierexperimentellen Versuchen eingesetzt.

## **5.8 Immunologische Untersuchungen der Sellerieproteine**

Da nicht nur die korrekte Struktur für vergleichende Untersuchungen der rekombinanten Proteine wichtig ist, sondern auch deren immunologische Aktivität, wurden alle rekombinant hergestellten Proteine mittels ELISA (Kap. 4.3.1) untersucht.

### **5.8.1 Patientenkollektiv**

Um die Reaktivität der verschiedenen rekombinanten Proteine mit Seren von allergischen Patienten zu untersuchen, ist ein geeignetes Patientenkollektiv nötig. Wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, wurden hauptsächlich Seren von Schweizer Allergikern verwendet. Diese waren sehr gut charakterisiert, da ein Großteil mit dem sogenannten Goldstandard der Allergiediagnostik, der oralen doppelt verblindeten Placebo kontrollierten Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC), auf ihre Allergie getestet worden war. Für Sellerie wurden insgesamt 45 Allergiker in

die Studie eingeschlossen, 23 davon waren DBPCFC positiv auf Sellerie und 22 hatten eine Birkenpollenallergie ohne nachweisbare Sellerieallergie. Die Seren von 17 Nichtatopikern wurden als Kontrollen in der Studie verwendet. Detaillierte klinische Daten zu diesen Probanden wurden bereits durch Ballmer-Weber et al.<sup>33</sup>,<sup>38</sup> und Lüttkopf et al.<sup>131</sup> veröffentlicht.

### **5.8.2 Detektion der IgE-Bindungskapazität der Sellerieproteine mittels ELISA**

Die Eigenschaft der Sellerieproteine humanes IgE zu binden wurde mittels ELISA (Kap. 4.3.1.1) bestimmt. Dazu wurden die rekombinanten Proteine an eine Festphase gekoppelt und mit dem Serum aller 62 Patienten inkubiert. Die Bindung des IgE an die Proteine wurde über Verwendung eines polyklonalen anti-human-IgE-Antikörpers aus Ziege detektiert. Die Ergebnisse wurden in optischer Dichte (OD) angegeben, wobei alle Seren als positiv gewertet wurden, deren OD größer war als dreimal die OD der Nichtallergikerkontrolle. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse in optischer Dichte der einzelnen Seren auf die jeweiligen Proteine des Sellerie-IgE-ELISA.

## Ergebnisse

*Tabelle 18: Ergebnisse des Sellerie-IgE-ELISA angegeben in OD; Serum 1-23: DBPCFC positive Patienten; Serum 24-45: Birkenpollenallergiker ohne Sellerieallergie; Serum 46-62: Nichtatopiker.*

Serum Nr.	Api g 1.01	Api g 1.01S <sup>111</sup> P	Api g 1.01K <sup>44</sup> E	Api g 1.02	Api g 1.02C <sup>111</sup> P
1	1,73	0	2,27	0,11	0,19
2	2,69	0,07	2,87	0,02	0
3	0,44	0,00	0,26	0	0
4	3,39	0,23	3,12	0,01	0
5	0,02	0	0	0	0
6	0,00	0,01	0,00	0,01	0
7	0	0	0	0	0
8	0,38	0,03	0,48	0,20	0,32
9	0	0	0	0	0
10	0,34	0	0,39	0	0
11	2,01	0,03	2,16	0	0,14
12	3,11	0,62	2,64	0,32	0,34
13	2,35	0,30	2,63	0	0
14	0,84	0	1,16	0,01	0
15	1,11	0	1,78	0	0
16	2,04	2,71	2,13	1,80	2,71
17	0	0	0	0	0
18	3,57	1,24	3,46	2,71	3,23
19	2,47	0,15	1,96	0	0
20	0	0	0	0	0
21	1,78	2,27	1,92	0,09	0,11
22	0	0	0	0	0
23	0,01	0,08	0	0,07	0
24	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	0,61	0	0,54	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0
30	0,34	0	0,34	0	0
31	0,14	0	0,17	0	0
32	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0
34	0,36	0	0,47	0,11	0,12
35	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0
37	0,30	0	0,57	0,06	0,03
38	2,00	0	2,58	0	0
39	0,02	0,04	0,02	0	0
40	0,02	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0
43	0,55	0	0	0	0
44	0	0	0,76	0	0
45	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0
47	0	0,07	0,03	0	0
48	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0

Wie Tabelle 18 zu entnehmen ist, haben 74% der Sellerieallergiker (16/23) Api g 1.01 spezifisches IgE im Serum, dabei lag die gemessene optische Dichte in einem Bereich von 0,02 bis 3,57 und die mittlere optische Dichte ( $\bar{OD}$ ) bei 1,23 ( $OD$  0,02-3,57;  $\bar{OD}$  1,23). Die Anzahl der Patienten, deren IgE eine Bindung an Api g 1.02 zeigten war mit 48% (11/23) nicht nur kleiner ( $OD$  0,02-2,7;  $\bar{OD}$  0,233), sondern auch die Bindungskapazität war eindeutig geringer, als die auf Api g 1.01 (Abb. 5.16a). Die Durchführung der linearen Regression bestätigt dies, indem die Gerade eindeutig in Richtung Api g 1.01 verschoben ist und der Regressionskoeffizient nur bei 0,46 liegt. Dies korreliert mit den qualitativen Western-Blot-Daten von Hoffman-Sommergruber et al.<sup>56</sup>.

Ein vergleichbarer Unterschied in der Bindungskapazität wurde auch mit den Patienten beobachtet, die nur auf Birkenpollen reagierten. 41% (9/22) banden an Api g 1.01 ( $OD$  0,02-2;  $\bar{OD}$  0,197) und nur 14% an Api g 1.02 ( $OD$  0,001-0,11;  $\bar{OD}$  0,008). Auch die Bindungskapazitäten sind bei diesen Patienten ohne Sellerieallergie sehr gering. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Protein Bet v 1 aus Birkenpollen, auf welches diese Patienten primär sensibilisiert sind, nur 42% Identität zu Api g 1.01 aufweist und somit keine starke Kreuzreaktivität zu erwarten war. Verändert man allerdings das Api g 1.01 dahingehend, dass es an Aminosäureposition 44 dem Bet v 1 angeglichen wird (Api g 1.01K<sup>44</sup>E), so bleibt zwar der Prozentsatz an reaktiven Birkenpollenallergikern ohne Sellerieallergie in etwa gleich, aber die Bindungskapazität nimmt leicht zu ( $\bar{OD}$  0,248). In der Gruppe der Sellerieallergiker war dies auch der Fall (Abb. 5.16b). Hier nahm die Bindungskapazität ebenfalls leicht zu ( $\bar{OD}$  1,271). Allerdings besteht trotzdem eine hohe Korrelation zwischen den spezifischen IgE Bindungen an Api g 1.01 und Api g 1.01K<sup>44</sup>E ( $r=0,98$ ) in der Gruppe der Sellerieallergiker (Abb. 5.16).

Die Mutante mit destabilisierter Struktur Api g 1.01S<sup>111</sup>P zeigte im Vergleich zu Api g 1.01 eine eindeutig reduzierte IgE-Bindungseigenschaft mit den Seren der Sellerie positiven Patienten. Immerhin noch 52% (12/23) zeigten IgE-Bindung an diese Mutante, wenn auch mit einer reduzierten Intensität ( $OD$  0,01-2,7;  $\bar{OD}$  0,335;  $r=0,42$ ), was in Abb. 5.16c eindeutig zu sehen ist. Zwei der Patienten reagierten sogar stärker mit der Mutante, somit schien es sich in diesem Fall um die Erkennung von Sequenzepitopen zu handeln, oder diese Patienten hatten IgE gegen ein Epitop, das auch in der destabilisierten Form noch mit sehr hoher

Bindungsstärke erkannt wurde. Nicht auszuschließen ist allerdings auch, dass durch die strukturellen Veränderungen neue Epitope generiert werden, gegen die das IgE im Serum der Allergiker gerichtet ist.

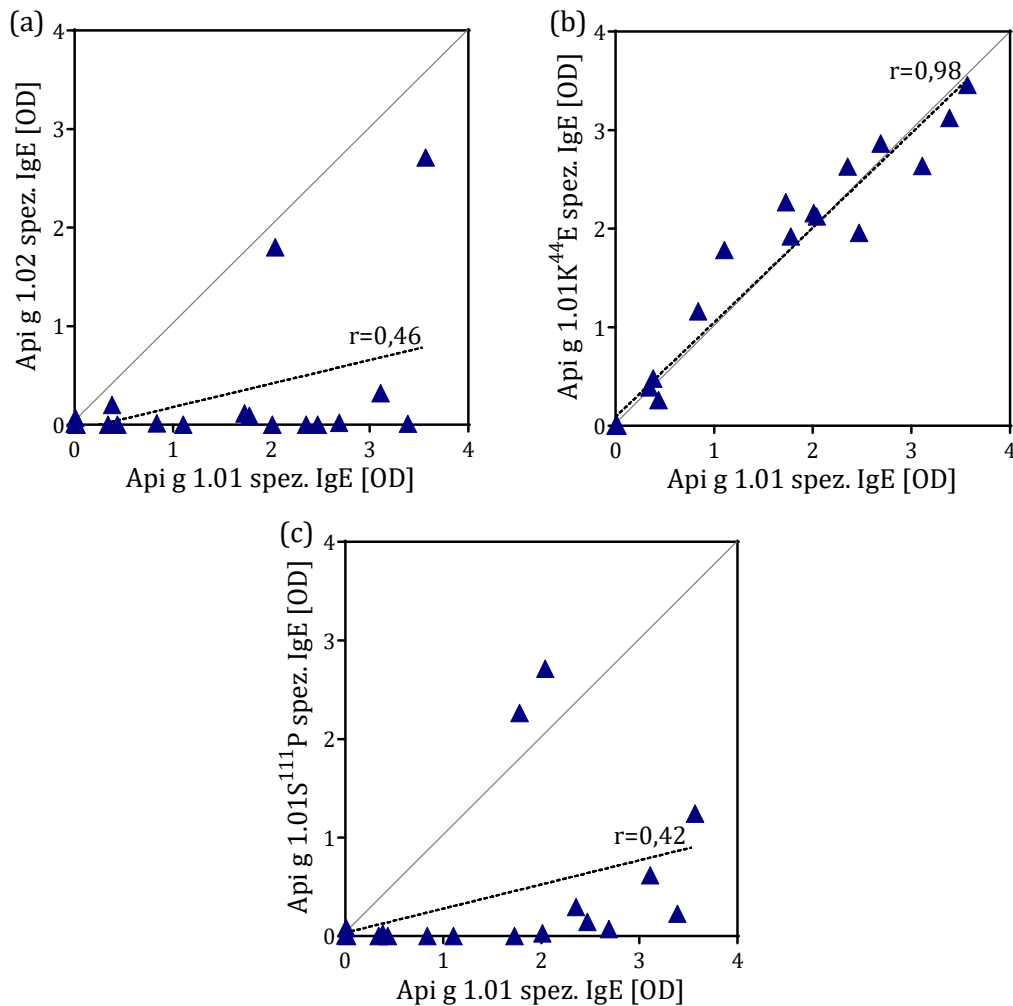


Abb. 5.16 Vergleich der IgE Bindungskapazität auf Api g 1. Isoformen und deren Mutanten, bestimmt über ELISA (ØOD) mit Sellerieallergikern. Vergleich: (a) 1.01 mit 1.02; (b) 1.01 mit 1.01K<sup>44E</sup>; (c) 1.01 mit 1.01S<sup>111P</sup>; schwarz gestrichelt ist die Gerade der linearen Regression mit  $r =$  Korrelationskoeffizient eingezeichnet.

Betrachtet man die Mutante Api g 1.02C<sup>111P</sup> genauer, so zeigt sich, dass eine Zerstörung der Struktur nicht zu einer eindeutigen Verringerung der Reaktivität im Vergleich zu Api g 1.02 führte, wie es für die Isoform Api g 1.01 der Fall war. 47% der Sellerieallergiker reagierten mit Api g 1.02 (OD 0,02-2,7; ØOD 0,233) und 30,4% mit der C<sup>111P</sup>-Mutante (OD 0,11-3,23; ØOD 0,306). Hier war die Bindungskapazität an das Protein mit zerstörter Struktur sogar leicht erhöht (Abb. 5.17). Api g 1.02 zeigte eine ØOD von 0,233 und Api g 1.02C<sup>111P</sup> eine ØOD von



0,306, was auch in Abb. 5.17a+b sehr gut zu sehen ist. Die Korrelation in der IgE-Bindungskapazität bleibt trotz Einführung des Prolins mit  $r=0,99$  sehr hoch.

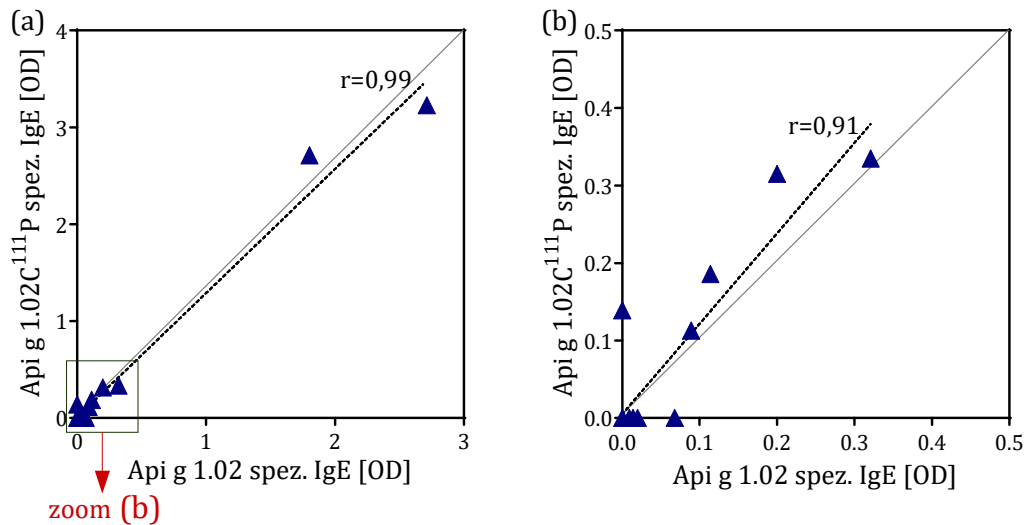


Abb. 5.17 Vergleich der IgE-Bindungskapazität auf Api g 1.02 und deren Mutante, bestimmt über ELISA ( $\emptyset$ OD) mit Sellerieallergikern. Vergleich: (a) 1.02 mit 1.02C<sup>111</sup>P; (b) Zoom von (a) im Bereich von OD 0-0,5; schwarz gestrichelt ist die Gerade der linearen Regression mit  $r =$  Korrelationskoeffizient eingezeichnet.

Die Seren der Patienten mit einer Birkenpollenallergie ohne Sellerieallergie zeigten ähnliche IgE-Bindungen auf die Isoformen und Mutanten von Api g 1, wie die Sellerieallergiker was Tab. 18 zu entnehmen ist. Auf die Darstellung der Diagramme, wie für die DBPCFC positiven Sellerieallergiker gezeigt, wird hier verzichtet. Bis auf einige geringe IgE-Bindungen (OD 0,02-0,07), zeigten die Nichtallergiker keine Reaktionen auf die rekombinanten Sellerieproteine.

### 5.8.3 ELISA-Inhibition

Um den Einfluss der Mutationen der Api-g-1-Isoformen auf die IgE-Bindungskapazität auch quantitativ zu bestimmen, wurden ELISA-Inhibitionsstudien durchgeführt.

Die Inhibition wurde entsprechend der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen ELISA-Inhibition durchgeführt. Zur Inhibition der Bindung von IgE an das Festphasenantigen wurde dem verwendeten Serum während der Inkubation auf der Platte ein weiteres Protein zugemischt, so dass beide Antigene um das

vorhandene IgE konkurrierten. Anhand des Prozentsatzes der Inhibition konnte abgeleitet werden, welches Antigen die höhere Bindungsstärke an IgE aufwies. Als Festphasenantigen wurden entweder wildtyp Api g 1.01 oder Api g 1.02 verwendet. Da die Seren nur in begrenzter Menge zur Verfügung standen, wurden für die ELISA-Inhibition zwei verschiedene Serumpools von Patienten mit unterschiedlichem Sensibilisierungsmuster verwendet. Pool 1 bestand aus vier Seren von Patienten, die laut IgE-ELISA (s. Tab. 18) nur auf Api g 1.01 sensibilisiert waren, der andere Pool (Pool 2) umfasste drei Seren, die auf beide Isoformen reagierten. Als Inhibitoren wurden alle rekombinant hergestellten Isoformen und Mutanten eingesetzt (Abb. 5.18). Um auszuschließen, dass ein Serum des Pools mehr IgE aufweist, als ein anderes, wurden alle Seren so verdünnt, dass sie im ELISA eine optische Dichte von 0,8 bis 1 erreichten (s. Kap. 4.3.2.1).

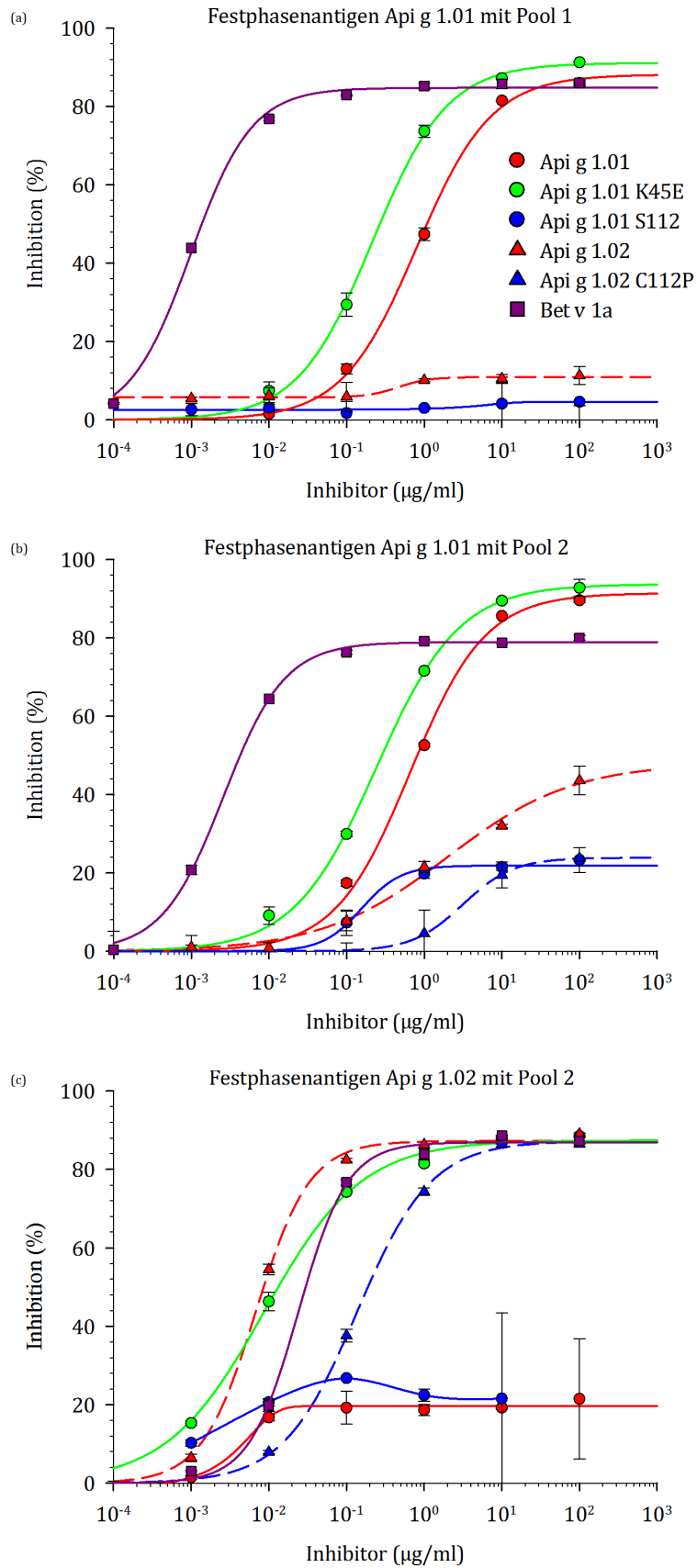


Abb. 5.18: Inhibition der IgE-Bindung an Api g 1.01 (a, b) und Api g 1.02 (c) mit unterschiedlichen Serumpools; (a) Pool 1, Patienten nur auf Api g 1.01 sensibilisiert, (b, c) Pool 2, Patienten auf beide Isoformen sensibilisiert.

Für Api g 1.01 als Festphasenantigen zeigte Bet v 1 die höchste Inhibitionskapazität, sowohl wenn Pool 1, als auch wenn Pool 2 eingesetzt wurde (Abb. 5.18a und b). Im Vergleich zu Api g 1.01, benötigte man ca. 1000 mal weniger Bet v 1, um die gleiche Inhibition zu erreichen, somit hat Bet v 1 bei diesen Seren eine wesentlich stärkere IgE-Bindungs Kapazität als Api g 1.01. Auch die Bindung von IgE an die Bet v 1 ähnliche Mutante Api g 1.01K<sup>44</sup>E scheint stärker als die an Api g 1.01 zu sein, da hier etwa 10 fach weniger Mutante nötig ist, um die gleiche Inhibitions Wirkung zu erreichen, wie mit Api g 1.01. Somit schien der mittels Zweistichproben t-Test ( $t=0,034$ ) bestimmte signifikante Unterschied der Wildtyp Isoform zu der Mutante doch größer zu sein, als durch die IgE-ELISA ermittelten Ergebnisse erwartet. Die in ihrer Struktur destabilisierte Mutante Api g 1.01S<sup>111</sup>P und die Isoform Api g 1.02 wiesen keine inhibitorischen Eigenschaften auf, wenn Patientenserum eingesetzt wurden, die auf Api g 1.01 monosensibilisiert (Pool 1) waren (Abb. 5.18a). Setzte man allerdings den Pool 2 ein, der Patientenserum enthielt, die sowohl auf Api g 1.01, als auch auf Api g 1.02 reagierten, so erhielt man mit dieser Isoform und der Mutante leichte Inhibitionen (Api g 1.02 ~40%; Api g 1.01S<sup>111</sup>P ~20%), allerdings mussten hier 10-100mal mehr Inhibitor zugegeben werden, als bei der Eigeninhibition mit Api g 1.01 (Abb. 5.18b). Auch die Api-g-1.02-Mutante mit zerstörter Struktur Api g 1.02C<sup>111</sup>P zeigte in diesem Fall eine Inhibition von circa 40%, allerdings erst bei hohen Konzentrationen. Die Inhibitionsstärke von Bet v 1 und Api g 1.01K<sup>44</sup>E, war bei Pool 2 und Api g 1.01 als Festphasenantigen vergleichbar zu der bei verwendetem Pool 1. Auch hier ist der Unterschied zwischen der Eigeninhibition mit Api g 1.01 und der Inhibition mit der Bet v 1 ähnlichen Mutante Api g 1.01K<sup>44</sup>E statistisch signifikant ( $t=0,017$ ) (Abb. 5.18b).

Abbildung 5.18c zeigt die Inhibition unter Verwendung von Pool 2 und der Isoform Api g 1.02 als Festphasenantigen. Hier war die Isoform Api g 1.02 als Eigeninhibitor das potenteste Inhibitorprotein. Eine ähnlich starke Inhibition konnte aber auch durch Einsatz der Bet v 1 ähnlichen Mutante Api g 1.01K<sup>44</sup>E erzielt werden, während die wildtyp Isoform Api g 1.01 nur eine geringe Inhibition von circa 20% hervorrufen konnte, wurde sie mit zehnfach höherer Konzentration als die Isoform Api g 1.02 eingesetzt. Bet v 1 zeigte wie die Api-g-1.01K<sup>44</sup>E-Mutante

eine vollständige Inhibition, allerdings musste es dazu in etwa vierfach höherer Konzentration eingesetzt werden.

Die Mutante der Isoform Api g 1.02 mit zerstörter Struktur, Api g 1.02C<sup>111</sup>P, konnte eine komplette Inhibition auslösen, wenn sie zehnfach höher konzentriert eingesetzt wurde, als das zugehörige Wildtypprotein Api g 1.02. Der Einsatz der Prolinmutante der Isoform Api g 1.01 (Api g 1.01S<sup>111</sup>P) führte bei gleicher Konzentration allerdings nur zu einer 20%igen Inhibition (Abb. 5.18c). Daraus konnte man schließen, dass im Fall von Api g 1.02 als Festphasenprotein die Struktur für die IgE-Bindung nicht von so großer Bedeutung ist, wie für Api g 1.01 als Festphasenantigen.

## **5.9 Untersuchung der Karottenproteine auf ihre allergene Potenz**

### **5.9.1 Patientenkollektiv Karotte**

Entsprechend der Selleriestudie wurden auch für die immunologische Charakterisierung der Karottenproteine hauptsächlich Patienten mit positivem DBPCFC verwendet. Um die Qualität der Studie zu erhöhen, wurde die Anzahl an Patienten erweitert, indem zusätzlich auch Patienten in das Kollektiv eingeschlossen wurden, die nur eine Anamnese auf Karotte aufwiesen. Insgesamt wurden Seren von 26 Karottenallergikern verwendet, von denen 18 eine positive DBPCFC auf Karotte hatten und acht einen positiven Anamnesebefund.

### **5.9.2 Immunologische Aktivität der Dau-c-Proteine im EAST**

Wie der ELISA ist der EAST (enzymkonjugierter Allergo-Sorbent-Test, Fa. Allergopharma, Reinbek, Deutschland) ein geeignetes Testverfahren, um spezifisches IgE in humanen Allergikerseren nachzuweisen (Kap. 4.3.3). Da hier im Vergleich zum ELISA mit standardisierten Allergenscheiben und zugehörigen Seren eine Eichgerade aufgenommen wurde, konnte die Menge an spezifischem IgE in internationalen Einheiten (IU/ml) angegeben werden. Um zu untersuchen, ob neben der Zerstörung von Epitopen auch die Oligomerisierung der Dau-c-Isoformen und Mutanten einen Einfluss auf die allergene Potenz hatte, wurden

diese Proteine mit den unveränderten Dau-c-Proteinen im EAST verglichen. Tabelle 19 zeigt alle Einzelergebnisse der IgE-Bindungskapazität in IU/ml.

*Tabelle 19 Ergebnisse der Reaktivität auf die verschiedenen Dau-c-1-Isoformen, -Mutanten und -Oligomere in IU/ml bestimmt mittels EAST; Serum 1-18: DBPCFC positiv, 19-26: Anamnese positiv, 27: Negativ Kontrolle; n.b.: nicht bestimmt.*

Serum Nr.	Dau c 1.01	Dau c 1.02	Dau c 1 FP	Dau c 1.01/1.02 Mix	Dau c 1 FP <sup>111</sup> P	Dau c 1 3x	Dau c 1.01/1.02 <sup>111</sup> P Mix
1	1,90	n.b.	2,25	1,17	0,25	2,01	n.b.
2	16,78	15,79	24,20	16,36	16,06	14,11	n.b.
3	0,25	0,25	0,46	0,25	0,25	0,51	n.b.
4	0,36	n.b.	0,56	0,25	0,25	0,45	n.b.
5	0,41	0,25	0,69	0,25	0,25	0,86	n.b.
6	2,76	2,11	4,12	1,82	0,57	2,68	n.b.
7	2,06	n.b.	2,72	2,93	0,25	2,23	n.b.
8	1,01	1,18	2,52	1,70	0,25	1,88	n.b.
9	0,25	n.b.	0,41	0,25	0,25	0,25	n.b.
10	0,59	1,09	2,55	1,00	0,25	0,97	n.b.
11	2,27	n.b.	3,42	1,59	0,35	2,95	n.b.
12	1,22	10,47	7,14	6,30	0,25	3,02	n.b.
13	0,64	0,49	0,89	0,60	0,25	0,77	n.b.
14	2,99	5,06	5,98	5,40	3,88	2,96	0,25
15	10,42	6,93	8,59	9,00	0,25	11,80	0,25
16	0,25	0,99	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
17	3,89	4,17	2,97	2,98	0,25	3,62	0,25
18	27,92	17,60	11,09	20,25	0,84	20,25	0,93
19	9,33	7,92	8,64	6,71	0,25	9,90	0,25
20	2,60	0,84	2,23	2,17	0,25	2,77	0,25
21	1,41	0,25	1,60	0,58	0,25	2,41	0,25
22	4,06	4,23	4,63	3,92	0,25	4,24	0,25
23	2,43	2,06	4,29	2,08	0,25	2,81	0,25
24	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	2,49	0,25
25	1,33	1,46	0,76	0,75	0,25	3,35	0,25
26	5,48	2,41	5,53	4,79	0,25	5,56	0,25
27	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse aus Tabelle 19 in Abb. 5.19 grafisch dargestellt.

*Abb. 5.19: Vergleich der IgE-Bindungskapazität an die verschiedenen Dau-c-Isoformen, -Mutanten und -Oligomere bestimmt mittels EAST (kU/ml) in Serum von Karottenallergikern. Vergleich: (a) Dau c FP mit Gemisch aus 1.01 und 1.02; (b) Dau c 1 3x mit 1.01; (c) Gemisch der mutierten Isoformen 1.01 mit Gemisch der Wildtyp-Isoformen; (d) Dau c 1 FP 111P mit wildtyp Dau c 1 FP; gestrichelt=Ausgleichskurve nach linearer Regression;*

Der Vergleich der IgE-Reaktivität mit dem Oligomer Dau c 1 FP zu der Reaktivität mit der Mischung der Einzelallergene Dau c 1.01 und Dau c 1.02, zeigt, wie in 5.19a gut zu erkennen, dass die Mehrzahl der Seren (92%; 24/26) eine erhöhte IgE-Bindung mit dem Oligomer Dau c 1 FP aufwiesen. Nur 77% (20/26) zeigten IgE-Bindung an die Mixtur der beiden Isoformen. Die durchschnittliche Reaktivität ( $\bar{\text{O}}\text{IU/ml}$ ) betrug beim Gemisch 3,5 (0-20,5 IU/ml) und beim Fusionsprotein 4,16 (0-24,2 IU/ml). Im Fall von Dau c 1 3x ist dies ähnlich (5.19b), allerdings ist die Tendenz hier weniger stark. 92% (24/26) der Seren wiesen spezifisches IgE gegen

das Trimer Dau c 1 3x auf (0-20,1 IU/ml; ØIU/ml: 4,0) während nur 85% (22/26) mit dem Monomer Dau c 1.01 reagierten (0-27,9 IU/ml; ØIU/ml 3,9).

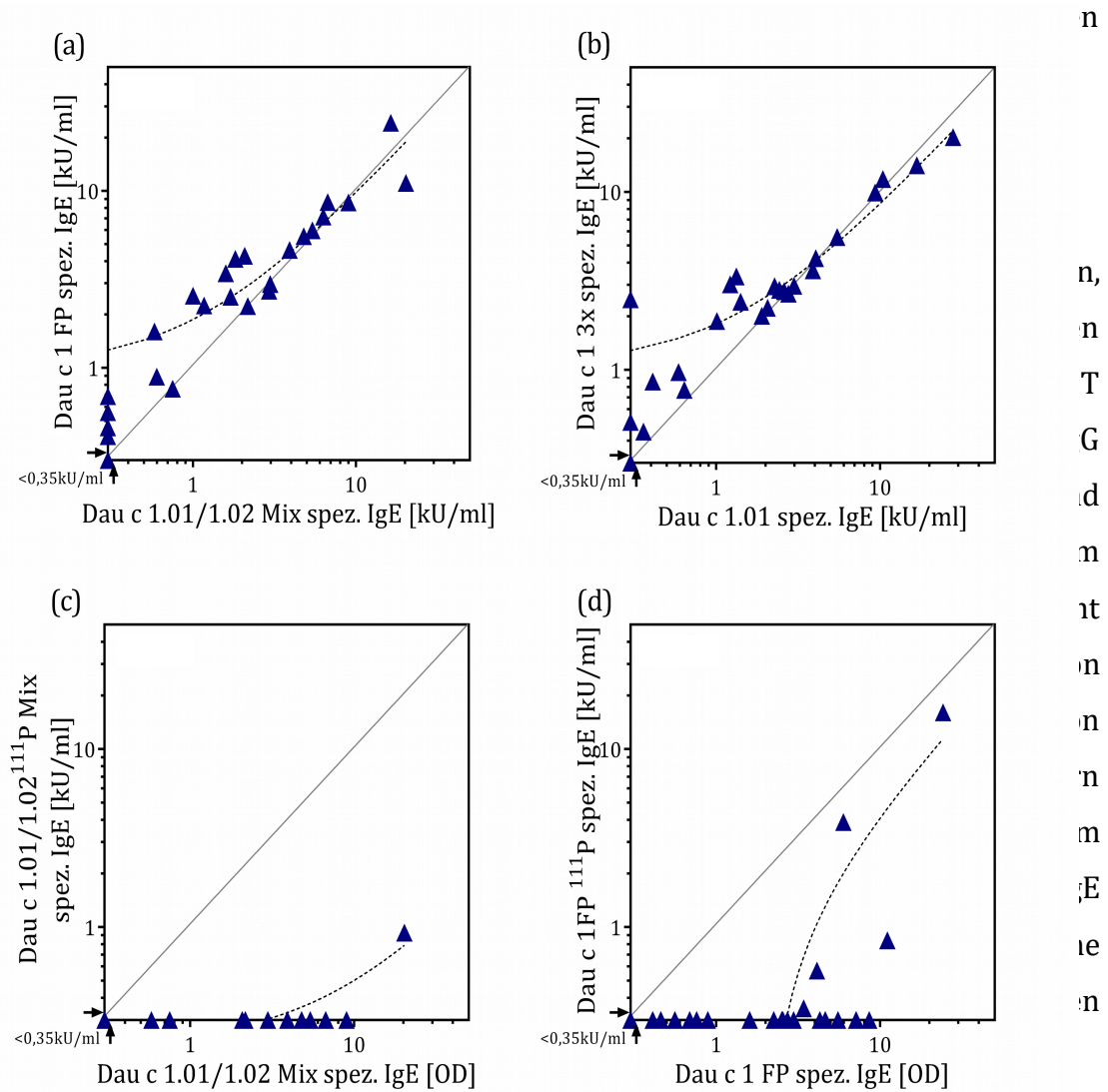
Um den Einfluss der Mutationen auf die Isoformen zu bestimmen, wurde auch die IgE-Bindung an ein Gemisch der beiden Dau-c-1-<sup>111</sup>P-Mutanten mit dem Gemisch der beiden unmutierten Isoformen verglichen. Leider konnten aufgrund von Serummangel nur zwölf Seren vermessen werden, eine eindeutige Tendenz ist allerdings trotzdem zu sehen. 5.19c zeigt, dass eine Zerstörung der Struktur zu einer fast vollständigen Aufhebung der IgE-Bindungseigenschaften führt. Lediglich ein Serum zeigte eine Reaktivität auf den Mix der <sup>111</sup>P-Mutanten (7,7%; 0-0,9 IU/ml; ØIU/ml 0,08), während in dieser Serumgruppe 83% (10/12) auf die Mischung der beiden Dau-c-Isoformen reagierten (0-20,3 IU/ml; ØIU/ml 4,4).

Interessanterweise führte die <sup>111</sup>P-Mutation des Dau-c-1-Fusionsproteins nicht zu einer vollständigen Zerstörung der Sekundärstruktur, was sich auch in den IgE bindenden Eigenschaften widerspiegelte. Zwar war die Stärke der IgE-Bindung an Dau c 1 FP <sup>111</sup>P schwächer (20%; 0-16,1IU/ml; ØIU/ml 0,9) im Vergleich zu der an Dau c 1 FP, allerdings gab es fünf Seren, die auch mit der Mutante gute IgE-Bindungsstärken zeigten, welche nur noch geringe Anteile an intakten Sekundärstrukturen aufwies (5.19d).

### 5.9.3 Bestimmung des Endotoxingehaltes der Karottenproteine

Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, die bei der Reinigung der rekombinanten Proteine herausgelöst werden können und somit in den Proteinlösungen vorliegen. In biologischen Systemen, wie dem RBL-Test und in Tiermodellen kann LPS zu unerwünschten Nebeneffekten führen, weshalb die Entfernung der Endotoxine aus den Lösungen für diese Testsysteme unbedingt notwendig ist. Da mit den rekombinanten Karottenproteinen Untersuchungen im Tiermodell durchgeführt werden sollte, musste die Konzentration an LPS immer geringer als 1µg/ml sein. Mittels des LAL-Tests s. 4.2.5.1 wurden nach der Reinigung der rekombinanten Karottenallerge aus *E. coli* in allen Proteinlösungen erhöhte Konzentrationen an LPS festgestellt. Mittels der Verwendung von Endo-Trap Säulen Kap. 4.2.5.2 wurden die Endotoxine erfolgreich





#### 5.9.4.1 Bestimmung des IgG-Gehalts in Seren immunisierter Mäuse mittels ELISA

Um die IgG Antikörperinduktion der in dieser Arbeit verwendeten Isoformen und Mutanten der Karottenallergene *in vivo* zu testen, wurden Mäuse mit diesen in verschiedenen Dosen immunisiert (s. Kap. 4.4.1). Nach Beendigung der Immunisierungsphase in Woche zwölf wurden die Mäuse final geblutet und der Gehalt an spezifischem IgG im Serum mittels ELISA-Titration bestimmt (s. Kap. 4.3.1.2). Neben der Titration der Einzelseren wurden auch gepoolte Seren einer Gruppe im ELISA untersucht. Die Ergebnisse dieser Titration mit vereinten Seren sind in Abb. 5.20 dargestellt. Die Antikörperantwort, die über die Immunisierung mit der Dosis von 0,1µg Protein erzielt wurde war sehr ähnlich der mit 1µg/Dosis, somit wurde darauf verzichtet diese Daten hier zu zeigen. Auch die Ergebnisse der

Einzelseren waren sehr vergleichbar mit Abb. 5.20, so dass nur die Titration der Poolseren (n=8) dargestellt ist. Die Abbildungen 5.20 A, C, E und G zeigen die Ergebnisse, die mit der Dosis von 1µg erzielt wurden, die rechte Seite (Abb. 5.20 B, D, F, H) die IgG-Antworten bei einer Immunisierungsdosis von 0,01µg Protein. Der Vergleich der eingesetzten Dosen zeigt, dass mit einer höheren Dosis in der Regel bessere IgG-Antikörperantworten erzielt werden konnten.

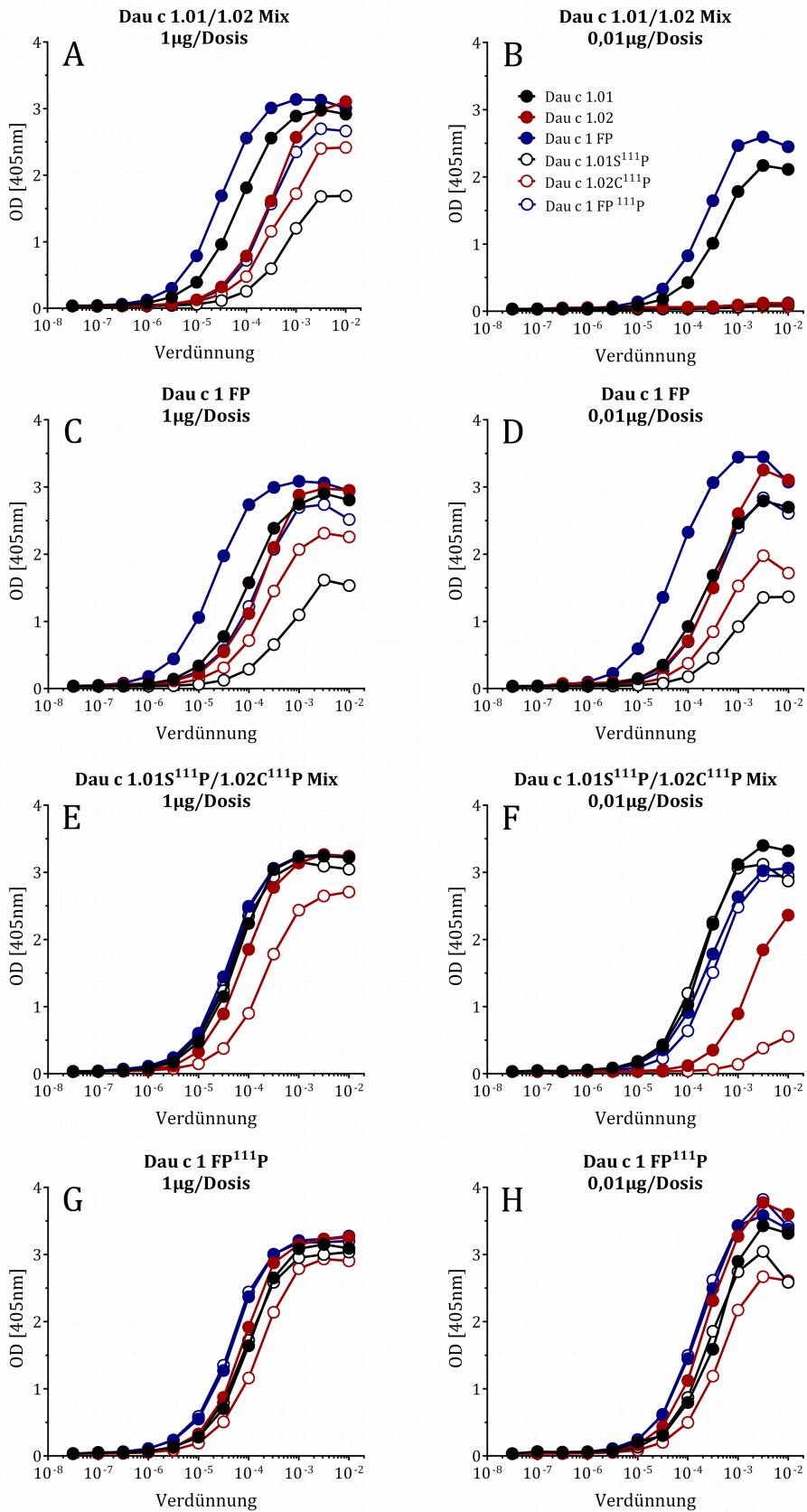


Abb. 5.20: IgG-Antikörper-Antwort der immunisierten Mäuse (n=8) mittels Titration im ELISA; Die Legende der Symbole, die das jeweilige Testantigen repräsentieren, ist in Abbildung B dargestellt; Ergebnisse gemessen in optischer Dichte (OD).

Abbildungen 5.20, A und B zeigen die IgG-Antikörperantwort der Gruppe von Mäusen, die mit der Mixtur aus Dau c 1.01 und Dau c 1.02 immunisiert wurden. Hier wurden IgG-Antikörper induziert, welche in der Lage waren mit allen Testantigenen zu reagieren. Die stärkste Bindung wurde mit dem Dimer aus den beiden Einzelallergenen Dau c 1 FP gemessen, während die Bindung an die Mutante des Einzelallergens Dau c 1.01S<sup>111</sup>P am schwächsten war. Die gleiche Immunisierung mit einer 100fach geringeren Dosis führte zu einer schwächeren Induktion von IgG-Antikörpern. Hier (Abb. 5.20, B) konnte lediglich eine Bindung an Dau c 1 FP und Dau c 1.01 gemessen werden (s. Tab. 19). Dies bestätigt die höhere B-Zell-Immunogenität von Dau c 1.01 im Vergleich zur Isoform Dau c 1.02, die auch bei Verwendung der höheren Immunisierungsdosen von 1µg und 0,1µg zu erkennen ist (Abb. 5.20, A). Vergleicht man die Wildtyp-Proteine mit ihren <sup>111</sup>P-Mutanten, so zeigen die Mutanten wie erwartet stets eine schwächere Antikörperbindung als die unveränderten Proteine.

Die Immunisierung mit dem Fusionsprotein Dau c 1 FP (Abb. 5.20, C) ergab eine ähnliche Antikörperantwort wie die Gabe von 1µg (Abb. 5.20, A) oder 0,1µg (Daten nicht gezeigt) der Mixtur der beiden Monomere. Im Vergleich der niedrigsten Dosis (0,01µg/Dosis) konnte allerdings gezeigt werden, dass sich die Fusion der beiden Isoformen positiv auf die Immunogenität auswirkte, da das Fusionsprotein eine deutlich höhere IgG-Antikörperantwort gegen alle Proteine auslösen konnte als die gleiche Dosis der Mixtur (Abb. 5.20, B und D).

Auch die mutierten Isoformen von Dau c 1 wurden in der Mixtur und als Fusionsprotein für die Immunisierung eingesetzt und konnten in beiden Fällen in den Dosen von 1µg und 0,1µg (Daten nicht gezeigt) eine vergleichbare IgG-Induktion gegen alle Immunogene auslösen (Abb. 5.20, E und G). Auch die niedrigste Gabe von 0,01µg pro Dosis löste eine gute Immunantwort aus. Lediglich die Bindung an Dau c 1.02C<sup>111</sup>P war in der Mixtur der Mutanten wesentlich schlechter als die des Fusionsproteins. Dies lässt darauf schließen, dass die Fusion der beiden Mutanten zu einer Erhöhung der Antigenität führt (Abb. 5.20, F und H). Im Vergleich zu den unveränderten Proteinen immunisierten die mutierten Isoformen und Dimere stets eine höhere IgG-Antwort auf die untersuchten Dau-c-1-Proteine. (z.B. Abb. 5.20, A und E; Abb. 5.20, D und H). Dieses Phänomen und die Tatsache, dass die Immunisierung mit den Mutanten zu einer Antikörperbildung führte, die

in der Lage war mit fast jedem Testantigen gleich zu reagieren, ließ darauf schließen, dass die durch die Mutanten induzierten IgG-Antikörper gegen andere Epitope gerichtet sind, als die von den Wildtyp-Proteinen gebildeten IgG-Antikörper. Da die Mutanten fast alle in einer zerstörten Sekundärstruktur vorlagen, kann davon ausgegangen werden, dass hier hauptsächlich lineare Epitope, oder andere Konformationsepitope für die Immunogenität verantwortlich waren, während bei den unveränderten Dau-c-1-Proteinen Konformationsepitope der intakten Struktur von den produzierten Antikörpern erkannt werden.

#### **5.9.4.2 Inhibition der Bindung von humanem spezifischem IgE an Karottenallergene mittels murinem Serum**

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, konnten bei der Immunisierung gute IgG-Antikörperantworten in den Mäusen erzielt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Antikörper als sogenannte blockierende Antikörper fungieren können. Dies wurde mittels ELISA-Inhibition (Kap. 4.3.2) bestimmt. Dazu wurde die IgE-Bindung eines Pools aus Serum von fünf DPBCFC positiven Karottenallergikern an Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02 mittels Zugabe von Mausserum unterbunden. Die Inhibitionskapazität der Mausseren ist in Abb. 5.21 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Mausseren (es wurden Pools der jeweiligen Gruppen verwendet) in der Lage waren, die Bindung des humanen IgE an die beiden Dau-c-1-Isoformen zu hemmen. Dieses Resultat war unabhängig davon, ob zur Immunisierung die Wildtyp-Allergene oder Mutanten, Monomere oder Dimere eingesetzt wurden. Lediglich der Serumpool, der IgG-Antikörper gegen eine Mischung der beiden Dau-c-Isoformen enthielt, musste im Vergleich zu den anderen Seren in einer dreifach höheren Konzentration eingesetzt werden (Abb. 5.21 B), um die Bindung an Dau c 1.02 als Festphasenantigen um 50% zu inhibieren. Um auszuschließen, dass ein Serum mit geringer IgG Konzentration die Gesamtreaktivität des Pools herabsetzt, wurden in den Pool nur Seren mit vergleichbaren spezifischen IgG Mengen aufgenommen (s. Kap. 5.9.4.1).

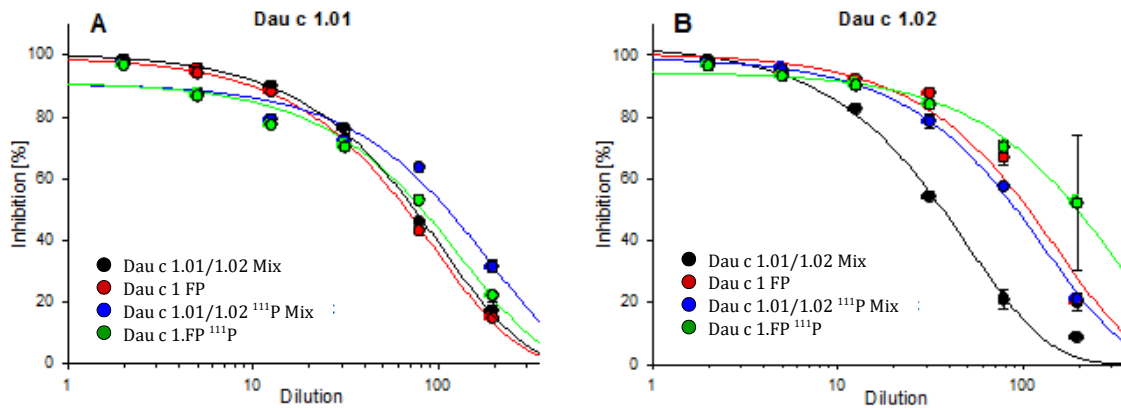


Abb. 5.21 Inhibition der Bindung von humanem IgE an Dau c 1.01 (A) und Dau c 1.02 (B) als Festphasenantigen durch murine IgG-Antikörper in Serumpools immunisierter Mäuse; die Legende gibt das Immunogen des jeweiligen Pools an.

### 5.9.4.3 Spezifische IgE-Antwort der immunisierten Mäuse

Hypoallergene Proteine sollen, wie zu Beginn des Abschnitts beschrieben, blockierende IgG-Antikörper induzieren. Gleichzeitig sollten diese Proteine nicht in der Lage sein eine IgE-Antikörperantwort auszulösen, um auszuschließen, dass ein Patient eine Allergie auf das hypoallergene Protein als Therapeutikum zu entwickeln. Aus diesem Grund wurde neben der Bildung von IgG-Antikörpern auch die spezifische IgE-Antwort der mit den Karottenallergenen, Mutanten und Multimeren immunisierten BALB/c-Mäuse, mittels murinem RBL-Mediatorfreisetzungstest (s. Kap. 4.3.4) bestimmt. Im Gegensatz zur Bestimmung des IgE-Titers oder -Gehalts mittels ELISA oder EAST, wird in diesem Test nur indirekt der Gehalt an funktionalem IgE bestimmt, welches in der Lage ist an den FcεRI-Rezeptor an der Oberfläche von basophilen Rattenzellen zu binden, um dann über die Zugabe des entsprechenden Allergens kreuzvernetzt zu werden. Gemessen wird anschließend die Menge an ausgeschüttetem Histamin, im Vergleich zur basalen Ausschüttung der Zellen. Da die prozentuale Mediatorausschüttung mit der Menge an IgE im Serum korreliert, kann somit indirekt auf den Gehalt an IgE-Antikörpern rückgeschlossen werden. Vorteil dieses Tests ist, dass mittels der Messung von Mediatorfreisetzung nur jenes IgE erfasst wird, welches auch tatsächlich an dieser Reaktion beteiligt ist. Somit wird indirekt nur der Gehalt an tatsächlich funktionalem IgE bestimmt. Der Vollständigkeit halber hätte auch die Gesamtmenge an spezifischem IgE mittels ELISA oder EAST

bestimmt werden müssen, was leider aufgrund der geringen Mengen an Serum, welches von Mäusen erhalten wurde, nicht möglich war. Abbildung 5.22 zeigt die Mediatorfreisetzungen der Seren der mit den Karottenallergenen, Mutanten und Oligomeren immunisierten Mäusen auf die entsprechenden Allergene. Getestet wurden Einzelseren, dargestellt ist allerdings nur der Mittelwert der Seren. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde verzichtet, da die Immunantworten der einzelnen Mäuse sehr unterschiedlich, der Verlauf der Einzelkurven aber vergleichbar war.

Korreliert man die Mediatorfreisetzung mit dem Gehalt an funktionellem IgE in den Seren der mit Wildtyp- und mutierten Karottenallergenen immunisierten Mäuse, so ist in Abb. 5.22 eindeutig zu sehen, dass die unveränderten Allergene eine stärkere IgE-Antwort ausgelöst haben, als die <sup>111</sup>P-Mutanten und zwar unabhängig davon, ob sie als Mix, oder als Fusionskonstrukt appliziert wurden. Die höchsten Mediatorausschüttungen wurden mit den Seren des Fusionskonstrukts erzielt, hier reichte sogar eine Immunisierungsdosis von 0,01µg/ml noch aus, um starke Immunantworten auszulösen, während diese Konzentration in allen anderen Fällen am wenigsten effektiv war.

Ziel dieser Studie war die Veränderung der Karottenallergene dahingehend, dass sie zwar noch eine IgG-Antwort, aber keine IgE-Antwort mehr auslösen. Dies ist für das mutierte Fusionskonstrukt eindeutig der Fall (Abb. 5.22 D). In der höchsten Immunisierungsdosis löste das Serum der Mäuse, welche mit den mutierten Fusionskonstrukten immunisiert wurden, nur bei hohen Antigenkonzentrationen eine maximale Mediatorfreisetzung von 20% aus, bei der niedrigen Immunisierungsdosis von 0,01µg war nur noch eine minimale Freisetzung messbar.



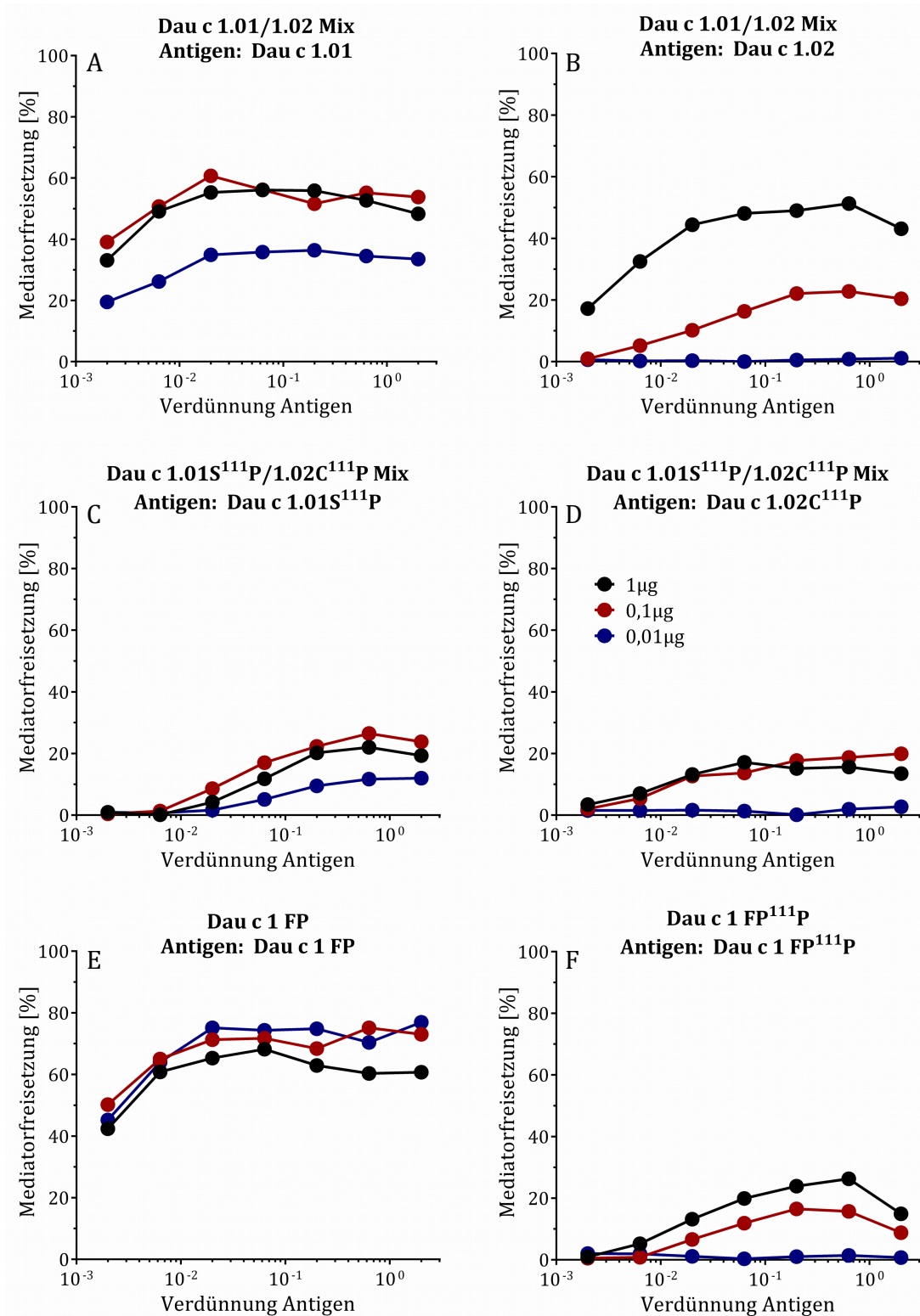


Abb. 5.22 Vergleich der IgE-Antikörperinduktion abhängig von der Immunisierungsdosis; schwarz: 1µg/ml; rot: 0,1µg/ml; blau: 0,01µg/ml; die Überschrift der jeweiligen Abbildung ist das Immunisierungsgens; als Antigen bezeichnet ist das Protein, welches zur Freisetzung der Mediatoren im RBL-Test eingesetzt wurde.



#### 5.9.4.4 Kreuzreaktivität der murinen IgE-Antikörper

Um zu testen, ob die von den Mutanten gebildeten IgE-Antikörper in der Lage sind, mit den Wildtyp-Allergenen kreuzreagieren zu können wurde die IgE-Reaktivität der verschiedenen Mausseren auch auf die Proteine untersucht, die nicht zur jeweiligen Immunisierung eingesetzt wurden.

Da bei Einsatz der mutierten Proteine nur die Immunisierungsdosis von 1µg zu einer leichten Induktion von IgE-Antikörpern führte, wurde die Titration im RBL-Mediatorfreisetzungstest (Kap. 4.3.4) auch nur mit den Seren dieser Dosis durchgeführt. Abbildung 5.23 A zeigt wie erwartet, dass durch die Mischung der Wildtyp-Allergene induzierte IgE-Antikörper in der Lage waren mit beiden Dau-c-1-Isoformen und dem Fusionsprotein eine Ausschüttung von Mediatoren im RBL-Test hervorzurufen, wobei auch hier die Isoform Dau c 1.02 das weniger reaktive Allergen war. Mit den mutierten Allergenen war ebenfalls, wenn diese in höheren Konzentrationen eingesetzt wurden, eine Ausschüttung messbar. Die durch Immunisierung mit dem Fusionsprotein gebildeten IgE-Antikörper zeigen ebenfalls noch eine hohe Mediatorfreisetzung mit der Isoform Dau c 1.01 und dem Fusionsprotein, lediglich die Reaktivität mit Dau c 1.02 ist sehr stark herabgesetzt (Abb. 5.23 B). Die Kreuzreaktivität dieser IgE-Antikörper mit den Mutanten war, wie für die Mischung, nur noch für Dau c 1.01S<sup>111</sup>P in hohen Konzentrationen messbar, für Dau c 1.02C<sup>111</sup>P und Dau c 1 FP<sup>111</sup>P liegt die Mediatorfreisetzung nur noch unterhalb von 20%. Wichtig für den Einsatz der mutierten Isoformen oder des veränderten Fusionsproteins, ist eine mögliche Kreuzreaktivität der bei der Immunisierung mit diesen Proteinen gebildeten IgE-Antikörper, mit denen der in der Karotte natürlich vorkommenden Dau c 1 Proteine. Um die Gefahr einer allergischen Reaktion während der Therapie mit diesen Proteinen auszuschließen, sollten hierbei gebildete IgE-Antikörper keine Mediatorfreisetzung mit den natürlichen Dau-c-1-Allergenen hervorrufen. Die Abbildungen 5.23 C und D zeigen, dass sowohl die Mischung aus den beiden mutierten Isoformen, als auch das mutierte Fusionsprotein keine IgE-Antikörper bilden, die mit der Isoform Dau c 1.0104 kreuzreagiert. Lediglich mit der für die Karottenallergie weniger relevanten Isoform Dau c 1.02 kann eine geringe Freisetzung von Mediatoren im RBL-Test beobachtet werden. Somit sind diese Proteine, vor allem in niedrigen

Konzentrationen und im Vergleich zum nicht mutierten Fusionsprotein, durchaus geeignete Kandidaten für eine Immuntherapie der Birkenpollen-assoziierten Karottenallergie.

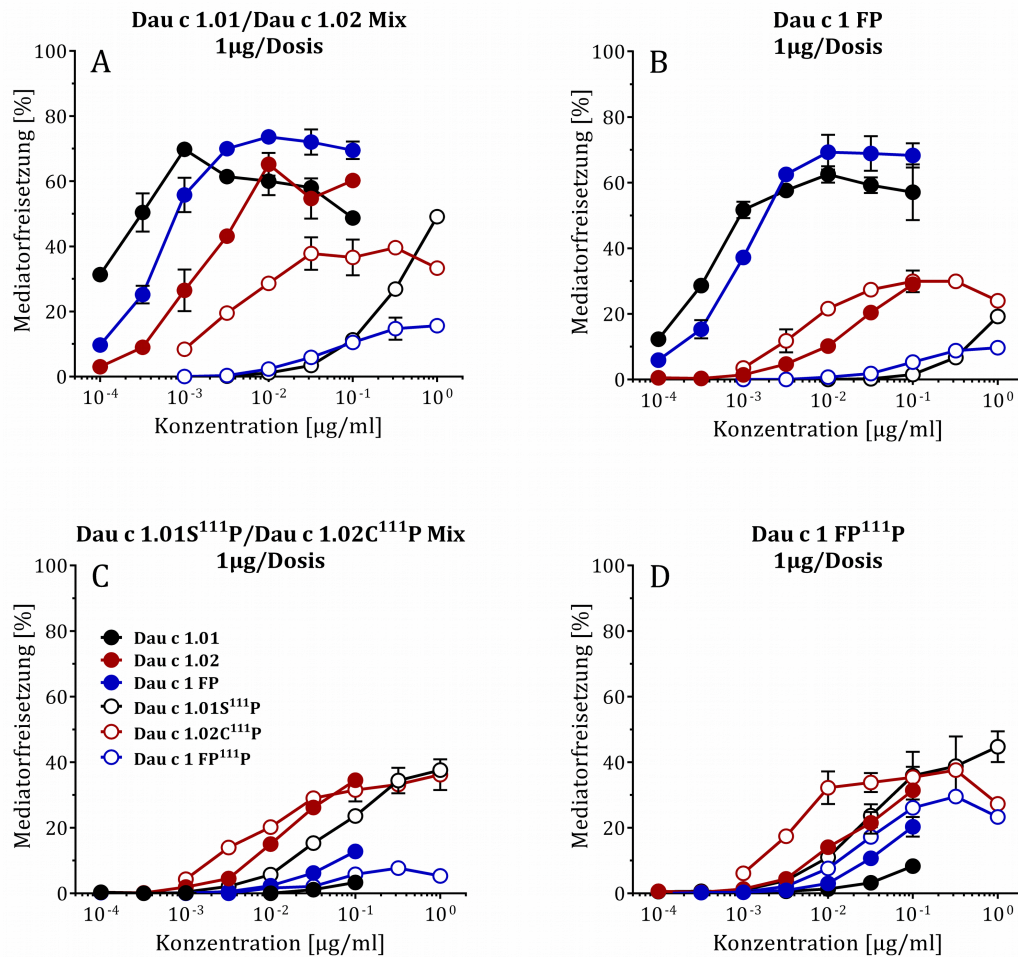


Abb. 5.23 IgE-Antikörper-Antwort der immunisierten Mäusen mittels Titration der Seren im Mediatorfreisetzungstest; verwendet wurden Pools aus Einzelseren der jeweiligen Immunisierungsgruppen; die Legende der Symbole, die das jeweilige Testantigen repräsentieren ist in Abbildung C dargestellt.

## **6 Diskussion**

Die Allergenität von Proteinen wird durch deren IgE bindende Strukturen (Epitope) bestimmt, weshalb eine gezielte Veränderung dieser Epitope zu einer stark veränderten IgE-Bindung führen kann. In vielen Studien wurden bereits hypoallergene Proteine untersucht, deren IgE bindenden Epitope zerstört oder verändert sind. Aus diesem Grund ist die Aufklärung solcher an Allergien beteiligter Epitope von großer Bedeutung. Ein weiterer essentieller Schritt zur Charakterisierung von hypoallergenen Proteinen ist deren Herstellung und Reinigung in rekombinanter Form mit zum Teil gezielt modifizierter Struktur.

### **6.1 Herstellung und Charakterisierung der Allergene und Allergenmutanten aus Sellerie und Karotte**

#### **6.1.1 Klonierung, Mutation und Oligomerisierung der Sellerie und Karottenproteine**

##### **6.1.1.1 Klonierung der Isoform Api g 1.0201**

Um einen genauen Vergleich zwischen Allergenen und deren möglicherweise hypoallergenen Varianten ziehen zu können, ist es wichtig, dass möglichst alle Isoformen der zu untersuchenden Allergene in der Studie eingesetzt werden. Ausserdem können so auch Unterschiede im IgE-Bindungsverhalten von Allergikern aufgezeigt werden. Im Falle von Sellerie sind bisher zwei Isoformen des Hauptallergens Api g 1 beschrieben. Die Isoform Api g 1.01 wurde schon in früheren Studien als rekombinantes Protein in der Arbeitsgruppe eingesetzt, weshalb hierfür keine weitere Optimierung der Herstellung und Reinigung erforderlich war. Für die zweite Isoform Api g 1.02 stand lediglich die Sequenzinformation aus der NCBI-Gendatenbank (Acc. No. Z75662) zur Verfügung. Da zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit synthetischen Gene sehr teuer waren, musste hier die zur Expression nötige kodierende DNA aus Sellerieknolle isoliert werden. Dies gelang erfolgreich mittels Verwendung genspezifischer Primer in einer PCR mit cDNA, welche aus Gesamt-RNA aus Sellerieknolle gereinigt wurde. Nach Analyse der Sequenz wurde eine 100%ige Übereinstimmung der

amplifizierten DNA mit der veröffentlichten Sequenz gefunden. Somit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass weitere Varianten von Api g 1.02 in der verwendeten Varietät des Selleries, welche leider nicht bekannt war, vorhanden sind. Allerdings ist durch die Verwendung von spezifischen Primern die Möglichkeit ausgeschlossen, dass DNA amplifiziert wird, welche sich im 5'- und 3'-Primerbereich von der publizierten Sequenz unterscheidet. Weiterhin ist auch möglich, dass die Verwendung einer anderen Sellerievarietät zu einer anderen Sequenz geführt hätte. Das Ziel dieser Arbeit war, die bisher bekannten Isoformen von Api g 1 und Mutanten dieser Proteine zu untersuchen, weshalb darauf verzichtet wurde nach weiteren Isoformen und Varianten von Api g 1 zu suchen. Sollte sich allerdings im Verlauf der Studie zeigen, dass weitere Isoformen für die Sellerieallergie von Bedeutung sind, so wäre z.B. das Screening einer cDNA-Phagen- oder Peptidbibliothek aus Sellerie ein geeigneter Ansatz zur Bestimmung relevanter IgE bindender Proteine in Sellerie.

### **6.1.1.2 Mutation der beiden Isoformen von Api g 1 und Dau c 1**

Zur Untersuchung struktureller Veränderungen und der Bedeutung einzelner Aminosäuren für die IgE-Bindungseigenschaften der Isoformen von Api g 1 sollte ein gezielter Austausch bestimmter Aminosäuren durchgeführt werden. Wie in den Kapiteln 1.2.4.1 und 5.4.1 beschrieben, ist die P-loop-Region um Aminosäureposition 45 bei Bet v 1 als ein IgE bindendes Epitop beschrieben<sup>59,60</sup>. Api g 1.01 nicht aber Api g 1.02 unterscheidet sich in dieser Region genau an einer Aminosäureposition von Bet v 1. Um diese Abweichung auszugleichen, sollte das Lysin an Position 44 durch Glutaminsäure ausgetauscht werden.

Der Einfluss der Zerstörung der dreidimensionalen Struktur auf die IgE-Bindung, sollte bei beiden Api g 1 und Dau c 1 Isoformen durch Einführen des Strukturbrechers Prolin an Aminosäureposition 111 anstelle des dort vorhandenen Serins, bei Api g 1.01 und Dau c 1.0104 bzw. Cysteins bei Api g 1.02 und Dau c 1.0201, untersucht werden.

Die Mutationen wurden auf DNA-Ebene mittels des Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Für die oben beschriebene Mutation in der P-loop-Region von Api g 1.01 war es ausreichend, nur eine Base zu verändern, während für die

Einführung von Prolin der Austausch zweier Basen notwendig war. Nach Durchführung der Mutations-PCR wurde direkt ein Plasmid erhalten, welches zur Expression in *E.-coli*-Bakterienzellen geeignet ist. Die Sequenzierung der Produkte ergab, dass in allen untersuchten Klonen die korrekte Sequenz eingebaut wurde. Somit ist die Methode der ortsspezifischen Mutation mittels PCR ein effektives und schnelles Verfahren zur gezielten Veränderung von DNA, welche Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und eventuell auch auf die dreidimensionale Struktur von rekombinanten Proteinen hat.

### **6.1.1.3 Multimerisierung der Karottenallergene**

Neben Mutanten von Allergenen, sind auch Oligomerisation eines Allergens oder Hybridisation mehrerer Allergene als Vakzine für die Immuntherapie von Allergien beschrieben<sup>128,129</sup>. Zur Untersuchung, welche der Verfahren besser zur Herstellung von Hypoallergenen geeignet ist, wurden neben den Prolinmutanten auch Oligomere der Dau c 1 Isoformen konstruiert. Zum einen ein Fusionsprotein (Hybrid) aus den beiden Isoformen Dau c 1.0104 und Dau c 1.0201 (Dau c 1 FP) und zum anderen ein Trimer aus Dau c 1.0104 (Dau c 1 3x).

Für das Dau c 1 FP wurde eine neue Methode etabliert, bei der mittels überlappender PCR-Produkte, diese in einem weiteren PCR-Schritt fusioniert wurden (Kap. 4.1.2.1, 5.3.1). Diese Methode ermöglicht die direkte Hybridisierung zweier codierender DNA-Sequenzen, ohne zusätzliche Basen, wie sie bei der Ligation nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen erhalten werden. Nach erfolgter Expression dieser hybridisierten Sequenzen wird ein Protein erhalten, welches einer direkten Fusion der beiden Isoformen entspricht. Bis auf den für die Reinigung erforderlichen Histidin-Anhang, sind keine zusätzlichen Aminosäuren enthalten, die zur Bildung zusätzlicher Epitope führen oder einen Einfluss auf die IgE-Reaktivität haben könnten.

Die Dreifachmutante von Dau c 1.0104 wurde nicht mittels dieser Methode konstruiert, sondern wie von Vrtala et al. für ein Bet-v-1-Trimer beschrieben mittels Ligation nach Einfügen von Restriktionsschnittstellen<sup>128</sup>. Diese Art der Klonierung wurde gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieses Oligomers mit denen des veröffentlichten Bet-v-1-Trimers zu erhalten. Im

Vergleich zu den anderen Dau-c-1-Allergenen, Mutanten und Oligomeren ist allerdings zu beachten, dass Dau c 1 3x dadurch zusätzliche Aminosäuren besitzt, welche einen Einfluss auf dessen Reaktivität haben können.

Beide Klonierungsmethoden wurden problemlos angewandt und führten zu schnellen Ergebnissen mit korrekten DNA-Sequenzen. Heutzutage sind solche DNA-Konstrukte auch kommerziell als künstliche Gene zu erhalten. Vorteil solcher Konstrukte ist die Möglichkeit diese Gene für die Expression in ihrem Codongebrauch an das verwendete System anzupassen. Gerade im Fall von Api g 1.02, welches eine schlechte Expressionsrate aufwies (Kap. 5.6.1) könnte die Verwendung eines solchen optimierten Gens zu einer erhöhten Expression führen, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

### **6.1.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Allergene und Allergenmutanten**

#### **6.1.2.1 Rekombinante Sellerieproteine**

Die Isoform Api g 1.01 lag bereits aus einer vorangegangenen Studie (Kap. 5.6.1) als gereinigtes Protein vor, weshalb nur die Isoform Api g 1.02 und alle Mutanten in *Escherichia coli* exprimiert werden mussten. Die Expressionsraten der Mutanten waren in etwa identisch und hoch genug, um diese in für die Studie ausreichender Menge zu reinigen. Das Einfügen eines Prolins, was zur Entfaltung des Proteins führt, scheint die Expressionsstärke in *E. coli* zu begünstigen, da im Vergleich zur Mutante Api g 1.02C<sup>111</sup>P, die Expressionsrate der Isoform Api g 1.02 sehr gering war (Kap. 5.6.1), so dass nicht genügend Material gereinigt werden konnte. Da Api g 1.02 zeitgleich in einer anderen Studie verwendet wurde, konnte für diese Studie auf das von Dr. Lidholm zur Verfügung gestellte Material zurückgegriffen werden, weshalb keine weiteren Untersuchungen zur Verbesserung der Expression von Api g 1.02 in *E. coli* durchgeführt wurden.

Da die Isoform Api g 1.01 als Protein ohne weiteren Aminosäureüberhang, wie den His-Tag zur Reinigung mittel Ni-NTA-Agarose, vorlag, sollten auch die anderen Sellerieproteine ohne zusätzlichen Überhang gereinigt werden. Dies erfolgte über präparative SDS-PAGE mittels des PrepCell-Systems der Firma BioRad. Diese Methode birgt einige Risiken, da die Auftrennung der Proteine mittels

Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS erfolgt. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine, um eine konstante negative Ladung aller Proteine zu erzeugen, und die Denaturierung durch Zugabe von DTT und Aufkochen liegen die gereinigten Proteine zunächst in entfaltetem Zustand vor. Die anschließende Rückfaltung und Abreicherung von SDS musste demnach unter sehr kontrollierten Bedingungen erfolgen. Die genaue Charakterisierung der so gereinigten Proteine durch Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie und der immunologischen Reaktivität unter physiologischen Bedingungen z.B. durch Mediatorfreisetzungstests ist hier essentiell.

Da die Ausbeuten an gereinigtem Protein mittels dieser Methode in der Regel eher gering sind, aber für die hier vorliegende Studie ausreichend waren, konnte auf eine Optimierung der Reinigungsstrategie verzichtet werden.

### **6.1.2.2 Rekombinante Karottenproteine**

Nach erfolgreicher Expression aller Dau-c-Konstrukte in *E. coli*, konnten nur die Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 unter nativen Bedingungen aus den Bakterienzellen gereinigt werden. Die Mutanten und Oligomere mussten unter denaturierenden Bedingungen aus den Bakterienzellen gewonnen werden. Wie bei der Reinigung der Sellerieproteine mittels präparativer SDS-PAGE bedeutet dies, dass die Rückfaltung unter kontrollierten Bedingungen erfolgen muss und auch hier eine anschließende genaue Charakterisierung der gereinigten Proteine notwendig ist.

Zur Untersuchung der immunologischen Eigenschaften der Karottenproteine *in vivo* waren weitaus größere Mengen an rekombinanten Proteinen notwendig, als es für die Selleriestudie der Fall war. Da die Expressionsstärke der Karottenproteine vergleichbar war mit der der Sellerieproteine, war hier eine Reinigungsstrategie notwendig, mit der effektiv das Protein aus den Bakterienlysaten zu reinigen ist. Aus diesem Grund wurden die klonierten Karottenallergene, Mutanten und Oligomere mit einem N-terminalen, sechsfachen Histidin-Rest versehen, welcher die Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglichte. In langjährigen Erfahrungen mit diesem Fusionsanteil in der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dieser

keine Auswirkungen auf die Faltung und IgE-Reaktivität der Proteinfamilie hat. Da in dieser Studie Api g 1.02 eingesetzt wurde, welches im Gegensatz zu den anderen Sellerieproteinen einen solchen His-Tag besass, wurde anhand dieses Allergens der Einfluss der zusätzlichen Histidine im direkten Vergleich mit einem Nichtfusionsprotein exemplarisch untersucht (Kap. 5.6.1.1). Es zeigte sich kein Unterschied in der IgE-Reaktivität, weshalb auch bei den Karottenproteinen davon ausgegangen wurde, dass der His-Tag keinen Einfluss auf die Reaktivität der Proteine hat.

Des Weiteren war es nötig, die rekombinanten Proteine aus Karotte für die *in vivo* Studien auf ihren Gehalt an bakteriellen Endotoxinen zu testen, welche in biologischen Systemen zu unerwünschten Nebeneffekten führen können. Alle aus *E. coli* gereinigten Proteine waren stark mit Endotoxinen belastet, so dass eine Entfernung der Proteine mittels Endo-Trap-Säulen erfolgen musste. Die Abreicherung war für alle Proteine erfolgreich, so dass Konzentrationen an Endotoxin von kleiner 1,5pg/ml erreicht werden konnte. Die Entfernung von Endotoxinen ging allerdings in der Regel mit einem hohen Verlust an Protein einher. Daher war der Aufwand für die Reinigung der rekombinanten Karottenallergene, Mutanten und Oligomere weitaus aufwendiger gegenüber der Sellerieproteine. In diesem Fall wäre die Strategie der Expression in Hefezellen von Vorteil, da neben der hohen Ausbeute auch keine Belastung der Proteine mit Endotoxinen erfolgt. Allerdings ist die Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in Hefe weitaus zeitaufwändiger, als die in bakteriellen Systemen.

### **6.1.3 Charakterisierung der rekombinanten Proteine**

Wie in Kap. 6.1.2 beschrieben, ist vor allem nach der Reinigung von Allergenen mittels präparativer SDS-PAGE oder der Reinigung aus Einschlusskörpern unter denaturierenden Bedingungen eine genaue Charakterisierung der so gewonnenen Proteine notwendig. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Faltung der Proteine. Für die Bindung an IgE sind intakte Epitope der Allergene notwendig. Meist handelt es sich hierbei um Konformationsepitope, welche nur bei einer korrekten Faltung der Proteine ausgebildet werden. Seltener sind auch Sequenzepitope beschrieben,



deren Reaktivität durch eine Zerstörung der Struktur nicht beeinflusst werden sollte. Da für die Auslösung einer allergischen Reaktion mindestens zwei reaktive IgE-Epitope notwendig sind, sollte ein Allergen, welches keine korrekte Faltung zeigt in der Regel nicht mehr in der Lage sein eine Allergie hervorzurufen<sup>132,133</sup>. Somit ist die Untersuchung der Faltung von rekombinanten Proteinen ein erstes Indiz dafür, ob diese für IgE-Bindungsstudien einsetzbar sind. Weiterhin sollte zusätzlich auch die IgE-Reaktivität der Proteine mittels immunologischer Untersuchungen, wie ELISA oder Mediatorfreisetzungstest, bestimmt werden.

### **6.1.3.1 Bestimmung der Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine**

Eine erste Aussage über die Struktur von Proteinen lässt sich über die Bestimmung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie machen. Intakte Proteine zeigen in der Regel sehr charakteristische Kurven, wenn die mittlere molare Eliptizität der Sekundärstrukturelemente gegen die Wellenlänge aufgetragen wird (Kap. 4.2.6). Rein  $\alpha$ -helikale Proteine zeigen zwei charakteristische Minima bei 208 und 222 nm und einen X-Achsen-Durchgang bei ca. 200 nm.  $\beta$ -Faltblattstrukturen besitzen ein Minimum bei 215 nm und die X-Achse wird bei ca. 208 nm geschnitten<sup>134</sup>. Natürliches Bet v 1, welches aus einem siebensträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und drei  $\alpha$ -Helices besteht (1.2.4.3), zeigt ein CD-Spektrum, dessen ausgedehntes Minimum bei ca. 218 nm liegt und das einen X-Achsen-Durchgang bei ca. 205 nm aufweist<sup>135</sup>. Bollen et. al haben die CD-Spektren von natürlichem Bet v 1, Api g 1 und Dau c 1 verglichen und sehen nahezu identische sekundäre Strukturelemente. Api g 1 und Dau c 1 zeigen ebenfalls ein Minimum bei 218 nm und einen X-Achsen-Durchgang bei 204 bzw. 205 nm<sup>135</sup>. Vergleiche dieser Spektren mit in dieser Arbeit hergestellten Allergenen zeigen, dass die rekombinanten Proteine Api g 1.01 und dessen K<sup>44</sup>E-Mutante, sowie Dau c 1.01 und Dau c 3x wahrscheinlich sehr ähnliche Sekundärstrukturen wie die natürlichen Proteine besitzen. Die Isoformen Api g 1.02 und Dau c 1.02 zeigen ein Spektrum mit einem breiteren Minimum und einem Richtung kurzwelligerem Licht verschobenen X-Achsen-Durchgang, was auf höhere Anteile an  $\alpha$ -helikalen Strukturen schließen lässt. Bublin et al. haben natürliches Api g 1 gereinigt, das einen hohen Anteil an Api g 1.02 enthält und sehen eine ähnliche Verschiebung der Kurve, wie es das rekombinante Api g 1.02

aus dieser Studie zeigt<sup>58</sup>. Da Api g 1.02 und Dau c 1.02 eine sehr hohe Aminosäuresequenzidentität von 95% aufweisen, ist zu erwarten, dass Dau c 1.02 eine ähnliche Struktur besitzt und somit auch ein vergleichbares CD-Spektrum. Überlappt man die beiden Kurven von Api g 1.02 und Dau c 1.02 in einem Diagramm, so ist dies der Fall (Daten nicht gezeigt). Auch Ballmer-Weber et al. zeigen ein vergleichbares Spektrum für Dau c 1.02<sup>42</sup>, so dass die Unterschiede der CD-Spektren der 1.02- Isoformen von Sellerie und Karotte im Vergleich zu den 1.01-Isoformen vermutlich auf tatsächliche Unterschiede der Sekundärstrukturen zurückzuführen sind und nicht auf eventuell vorkommende ungefaltete Anteile an Protein.

Das Fusionsprotein aus den beiden Dau c 1 Isoformen (Dau c 1 FP) zeigt ebenfalls ein Spektrum, welches auf intakte Sekundärstrukturen hinweist. Da die Kurve des Fusionsproteins genau zwischen den beiden Kurven der Einzelproteine liegt, kann man davon ausgehen, dass beide Proteine im Fusionsprotein ihre ursprüngliche Sekundärstruktur beibehalten. Somit ist zu erwarten, dass das Fusionsprotein Dau c 1 FP eine ähnliche IgE Bindung mit Serum von Karottenallergikern zeigt, wie die Mischung aus beiden Einzelproteinen. Wie in Abb. 5.19a gezeigt, korreliert die im EAST mit Serum von Karottenallergikern gemessene IgE-Bindungskapazität des Fusionsproteins tatsächlich sehr gut mit der der Mischung.

Neben den Isoformen der Hauptallergene von Sellerie und Karotte wurden auch Prolinmutanten dieser Proteine hergestellt, welche eine zerstörte Struktur aufweisen sollten. Proteine mit einer zufälligen ungeordneten Struktur zeigen im CD-Spektrum eine Kurve, welche rein im negativen Bereich verläuft, also keinen X-Achsen-Durchgang besitzt und deren ausgeprägtes Minimum bei ca. 198 nm verläuft<sup>134</sup>. Die Mutanten Api g 1.02C<sup>111</sup>P, Dau c 1.01S<sup>111</sup>P und Dau c 1.02C<sup>111</sup>P zeigen ein solches typisches CD-Spektrum, weshalb hier eindeutig von Allergenen mit zerstörter Sekundärstruktur ausgegangen werden kann.

Einzig die Prolinmutante der Isoform Api g 1.01 und des Fusionsproteins Dau c 1 FP zeigen geringe Anteile an intakten Strukturelementen. Um zu zeigen, dass Api g 1.01S<sup>111</sup>P weniger stabil als das ursprüngliche Protein ist, wurde mittels Aufnahme von Denaturierungskurven im CD-Spektrometer gezeigt, dass die Prolinmutante bereits bei 40°C in einen ungefalteten Zustand übergeht, während das bei Api g 1.01 erst bei 70°C der Fall ist (Kap. 5.7.1). Somit ist davon

auszugehen, dass mögliche IgE-Epitope auf der Oberfläche der Mutante instabiler sind, als die von Api g 1.01. Die Fusion der beiden Dau-c-1-Isoformen scheint ein Molekül zu bilden, welches weniger gut durch den Strukturbrecher Prolin angreifbar ist, da auch diese Prolinmutante Anteile einer intakten Struktur aufweist. Allerdings ist anhand der Kurve zu erkennen (Kap. 5.15), dass diese Anteile eher gering sind, da das CD-Spektrum des Fusionsproteins Dau c 1 FP einen X-Achsen-Durchgang weit unter 200 nm aufweist und die Kurve nur einen sehr geringen Ausschlag in den positiven Bereich erreicht.

Abschließend lässt sich somit die Aussage treffen, dass alle für die Studie notwendigen Allergene, Mutanten und Oligomere in ausreichender Menge und Reinheit gereinigt wurden und dass diese Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit auch die erforderlichen Strukturen aufwiesen.

## **6.2 Auswirkung der gerichteten Mutagenese von Allergenen auf deren Antikörper-Bindungskapazität**

Die Oberflächenstruktur von Proteinen ist ein relevanter Faktor in Bezug auf ihre biologische Aktivität mit möglichen Bindungspartnern. Im Fall der Allergie ist hier die Bindung von allergenen Proteinen an Immunglobulin E von großer Bedeutung. Epitope von Allergenen, welche IgE binden, sind für die klinische Reaktivität von hoher Relevanz und bereits geringe Veränderungen dieser IgE-Epitopstrukturen können zu starken Veränderungen in der IgE-Bindung von Allergenen führen. Im Fall der Hauptallergene von Sellerie und Karotte sind je zwei Isoformen (Dau c 1.01 und Api g 1.01) beschrieben, welche eine geringe Identität von nur 52% bzw. 50% aufweisen. Die bezüglich ihrer IgE-Bindungseigenschaften als weniger relevant beschriebenen Isoformen Api g 1.02 und Dau c 1.02<sup>42,56</sup> scheinen somit eine andere Epitopausbildung an ihrer Oberfläche zu haben, als die Isoformen Agi g 1.01 und Dau c 1.01. Eine gängige Methode, solche Epitope genauer zu untersuchen, ist der Austausch einzelner Aminosäuren in rekombinant hergestellten Allergenen. Das Wissen, um IgE bindende Epitope ist notwendig, um diese gezielt dahingehend zu verändern, dass die Allergene trotz verringerter IgE-Bindungskapazität eine noch intakte T-Zell-Reaktivität aufweisen und sich somit potentielle Immuntherapeutika mit verringerten allergischen Nebenwirkungen herstellen lassen.

### 6.2.1 IgE-Bindungseigenschaften der Sellerieallergene und Mutanten

In Mitteleuropa wird die Sellerieallergie in der Regel durch eine Kreuzreaktivität auf das sensibilisierende Agens Birkenpollen mit seinem Hauptallergen Bet v 1 hervorgerufen. Diese birkenpollenassoziierte Nahrungsmittelallergie ist für viele Gemüse und Früchte beschrieben, wie Karotte, Soja, Apfel und Kirsche, deren Allergene inzwischen sehr gut charakterisiert sind. Eine Reihe von Studien gibt auch Hinweise auf mögliche IgE bindenden Epitope dieser Allergene<sup>57,59,60,70</sup>. Solche Untersuchungen sind nur mit einer Auswahl sehr gut charakterisierter Patienten möglich. Für das Selleriehauptallergen gibt es bisher nur eine vergleichbare Studie zur Analyse der IgE-Bindungskapazität der beiden Isoformen von Api g 1<sup>56</sup>. In dieser Studie wurden jedoch nur zehn Seren verwendet, welche nach ihrer positiven Historie auf Sellerie ausgewählt wurden. Aus diesem Grund ist hier nur eine limitierte Aussage über die mittels IgE-Immundetektion im Western Blot bestimmte IgE-Bindungskapazitäten der einzelnen Isoformen möglich. In der hier vorliegenden Studie wurde ein Patientenkollektiv von 23 Birkenpollenallergikern eingesetzt, deren Sellerieallergie durch eine verblindete Provokation mit Sellerie (DBPCFC) abgesichert wurde, welche den „gold standard“ zum zweifelsfreien Nachweis einer Nahrungsmittelallergie darstellt<sup>14</sup>. Weiterhin wurden auch Seren von Birkenpollenallergikern ohne Sellerieallergie (n=22) und Nichtallergikern (n=17) in die Studie eingeschlossen. In beiden Allergikergruppen war die Häufigkeit und die Stärke der IgE-Bindung an Api g 1.01, welche mittels indirektem ELISA getestet wurde (Kap. 4.3.1.1), wesentlich höher, als die auf Api g 1.02. Dies bestätigt die Ergebnisse von Hoffmann-Sommerguber et al.<sup>56</sup>, welche Api g 1.02 als eine niedrig IgE-bindende Isoform beschreiben. Auch die Birkenpollenallergiker ohne Sellerieallergie zeigen im Vergleich zu Api g 1.02 eine häufigere IgE-Bindung an Api g 1.01, allerdings ist die Stärke der Bindung an Api g 1.02 wesentlich schwächer, als in der Gruppe der Sellerieallergiker. Dies lässt den Schluss zu, dass die Kreuzreaktivität von Bet v 1 spezifischem IgE mit Api g 1.02 geringer ausgeprägt ist, als die mit Api g 1.01. Dies steht im Widerspruch zur *in silico* Analyse der „P-Loop Region“, anhand derer die Isoform Api g 1.02 in dieser Region eine höhere Identität zu Bet v 1 aufweist, als die Isoform Api g 1.01. Demnach

scheinen noch andere relevante IgE-Epitope auf der Oberfläche von Api g 1.01 ausgebildet zu sein, die für die Kreuzreaktion mit Bet v 1 verantwortlich sind, die Api g 1.02 nicht besitzt. Ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Ergebnisse ist aber auch die Tatsache, dass der hier verwendete Test mit an der Festphase gekoppelten Proteinen arbeitet. Somit ist nicht auszuschließen, dass dadurch wichtige IgE-bindende Epitope blockiert werden. Um diese Einflüsse auszuschließen ist es besser mit Systemen zu arbeiten, bei denen die Proteine in ihrer ursprünglichen Faltung in Lösung vorliegen, wie es z.B. bei einem Mediator-freisetzungstest nach passiver Sensibilisierung von Effektorzellen (s. Kap. 4.3.4) der Fall ist. Leider ist die benötigte Menge an Humanserum in diesem Test in der Regele sehr hoch, weshalb im Falle der Sellerieallergene darauf verzichtet werden musste.

Von den in die Studie eingeschlossenen 23 Patienten mit einer positiven DBPCFC auf Sellerie hatten 8 Patienten einen negativen ImmunoCAP auf Sellerieextrakt. Sechs dieser Patienten waren auch negativ im direkten IgE-Test auf das Hauptallergen Api g 1.01, während bei zwei Patienten die Sellerieallergie durch eine positive Reaktion mit Api g 1.01 bestätigt wurde (Tabellen 12 und 18). Dies bedeutet, dass die Sensitivität der Diagnose der Sellerieallergie durch Verwendung der Einzelallergene, die sogenannte Component Resolved Diagnosis, leicht erhöht wird, dass aber bei den auf Sellerieextrakt und Api g 1 negativen Patienten noch andere Allergene eine Rolle spielen müssen, wie z.B. Profilin oder LTPs<sup>39,40,55</sup>. Ähnliches wurde auch von Bauermeister et al.<sup>55</sup> gezeigt, die vergleichbare aber umfassendere Untersuchungen anhand der Einzelallergene nicht mittels indirektem ELISA, sondern der besseren Vergleichbarkeit halber mittels ImmunoCAP durchgeführt haben.

Die Spezifität der in dieser Studie verwendeten Methode zur Bestimmung der IgE-Bindungseigenschaften, wurde durch das Mitführen einer relativ großen Gruppe von Nichtallergikern bestätigt.

Wie oben dargestellt sind für diverse Nahrungsmittel bereits IgE-bindende für die Kreuzreaktivität zu Bet v 1 verantwortliche Epitope beschrieben. Eine relevante Region, die als mögliches Epitop beschrieben ist, ist die Region um die Aminosäuren (AS) 41 bis 52, auch anhand der 3D Struktur als P-Loop-Region benannt<sup>59,65</sup>. Für die IgE-Bindung als besonders kritische Aminosäure beschrieben

ist das Glutamin an Position 44. Im Gegensatz zu Api g 1.01, besitzt die Isoform Api g 1.02 an dieser Position die identische Aminosäure wie Bet v 1. Von Hoffmann-Sommergruber et al.<sup>56</sup> und in dieser Studie wurde jedoch gezeigt, dass trotz dieses Sachverhaltes die Mehrzahl der Patienten eine stärkere Bindung an Api g 1.01 zeigen, wohingegen Api g 1.02 als die niedriger IgE bindende Isoform identifiziert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Epitopstruktur von Api g 1 von der des Bet v 1 abweicht. Eine Mutation der Aminosäure 44 von Api g 1.01 in Richtung Bet v 1 (Api g 1.01K<sup>44</sup>E) führte zu einer erhöhten IgE-Bindungskapazität im Vergleich zu dem Wildtyp-Allergen Api g 1.01, unabhängig davon, ob ein Patientenpool verwendet wird, welcher nur auf die Isoform Api g 1.01 sensibilisiert ist, oder ob die Patientenserum IgE gegen beide Isoformen zeigen (Abb. 5.18a und b). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer initialen Studie bereits von Neudecker et al.<sup>57</sup> beschrieben. Hier zeigte diese Mutante bei drei von neun Seren von Sellerieallergikern, die auf Api g 1.01 sensibilisiert sind, eine erhöhte IgE-Bindung gegenüber dem wildtyp Protein. Dies bestätigt, dass die Region um Aminosäure 44 ein für Sellerieallergiker, welche ursprünglich auf Bet v 1 sensibilisiert sind, wichtiges Epitop darstellt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass Birkenpollenallergiker ohne Sellerieallergie, vergleichbare IgE-Bindungseigenschaften in der IgE-Inhibition zeigen (Daten nicht gezeigt). Dies schließt aber nicht aus, dass noch weitere Epitope auf der Oberfläche von Api g 1.01 für die Kreuzreaktion mit Bet v 1 verantwortlich sind.

Im Vergleich der IgE-Bindungskapazität mit der Isoform Api g 1.02 als Festphasenantigen (Kap. 5.8.3, Abb. 5.18c), zeigt die Bet v 1 ähnlichere Mutante Api g 1.01K<sup>44</sup>E gleiche inhibitorische Eigenschaften wie Api g 1.02 selbst, während das Wildtyp-Protein Api g 1.01 nur eine geringe Kreuzreaktivität mit Api g 1.02 aufweist. Dieser Sachverhalt lässt darauf schließen, dass die P-Loop-Region bei Sellerieallergikern eine wichtige Rolle nur für die IgE-Bindung an Api g 1.02 spielt, während der Einfluss dieser Region bei der IgE-Bindung an Api g 1.01 nicht zum Tragen kommt. Die IgE-Bindungsepitope der beiden Api g 1 Isoformen sind folglich klar abgetrennt. Dies wird durch die Kreuzreaktionsversuche (Abb. 5.18 a und b) gefestigt, indem erst dann eine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Isoformen erkennbar ist, wenn auch Sellerieallergiker mit einer Reaktion auf Api g 1.02 in die Versuche eingeschlossen werden (Abb. 5.18a).

Für viele pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien, wie die auf Pru av 1, dem Hauptallergen der Kirsche, ist für die P-Loop-Region beschrieben, dass sie an einem kreuzreaktiven, IgE bindendem Epitop beteiligt ist. In dieser Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass im Fall der allergischen Reaktion auf Sellerie, im Besonderen auf die stärker reaktive Isoform Api g 1.01, diese Region kein für die IgE-Antikörperbindung relevantes Epitop darstellt. Dies ist auch anhand der Daten der IgE-Bindung, welche mittels des direkten ELISA bestimmt wurden (Kap. 5.8.2), zu sehen. Hier zeigt auch die Gruppe der Birkenpollenallergiker ohne Sellerieallergie kaum Reaktivität auf die Isoform Api g 1.02, obwohl diese in der P-Loop-Region zu Bet v 1 eine höhere Homologie aufweist. Auch Hoffmann-Sommergruber et al. haben in ihrer Studie zeigen können, dass rBet v 1a nicht in der Lage ist die IgE-Bindung an Api g 1.02 komplett zu inhibieren, während natürlich gereinigtes Bet v 1, welches aus vielen Isoformen besteht, dazu in der Lage ist<sup>56</sup>. An der Kreuzreaktivität zwischen Sellerie und Birke scheinen somit auch andere Isoformen von Bet v 1 von Bedeutung zu sein, während die P-Loop-Region eher eine geringerer Rolle spielt. Somit müssen noch weitere IgE-Epitope an der Kreuzreaktion zwischen Bet v 1 und Api g 1 beteiligt sein.

Bohle et al.<sup>136</sup> konnten auf humoraler und auch auf zellulärer Ebene zeigen, dass Bet v 1 der Auslöser für die Sensibilisierung auf Api g 1 ist, weshalb sowohl Api g 1.01, als auch Bet v 1 ein oder mehrere für die IgE Bindung relevante Epitope besitzen müssen. Im Fall von Api g 1.02 scheint dies die P-Loop-Region zu sein, allerdings ist nur ein geringer Anteil der Sellerieallergiker auf diese Isoform sensibilisiert, weshalb die Relevanz dieses Epitops für die Sellerieallergie und die Kreuzreaktivität zu Bet v 1 eher gering ist<sup>56</sup>. Weitere IgE Epitope, welche für die Kreuzreaktion zu Bet v 1 relevant sein können, sind die Regionen um AS 109-126 auf Api g 1.01<sup>136</sup> und die um AS 28 auf Pru av 1<sup>137</sup>. Da beide Api g 1 Isoformen an AS-Position 28 und auch in deren Umgebung kaum Ähnlichkeit zu Bet v 1 aufweisen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Epitop auch für Sellerie eine Rolle spielt eher gering. Mittels Verwendung rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, welche aus Sequenzinformationen von peripheren mononucleären Blutzellen von Allergikern gewonnen wurden, konnten Hecker et al.<sup>138</sup> zeigen, dass die C-terminale Helixstruktur der PR10-Proteine im Bereich um die Aminosäuren 132-154 und insbesondere die Position 149 eine entscheidende

Rolle an der Kreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Mal d 1 spielt. Auf Aminosäureebene zeigen Bet v 1 und die Api g 1-Isoformen keine sehr großen Sequenzidentitäten in dieser Region, jedoch wäre es möglich, dass auf der Ebene der 3D-Struktur einige der übereinstimmenden Aminosäuren einen wichtigen Anteil an IgE-bindenden Epitopen haben. Kürzlich haben Berkner et al.<sup>139</sup> ein Modellprotein, die Noroclaurine Synthase (NCS), veröffentlicht, das eine Bet v 1 homologe Oberflächenstruktur aufweist, aber kein Bet v 1 reaktives IgE bindet. Mittels diverser Aminosäureaustausche haben sie gezielt Epitopveränderungen in NCS eingebaut, so dass eine NCS-Variante mit Bet v 1 spezifischem IgE aus dem Serum von Birkenpollenallergikern reagiert. Dadurch konnten sie für Bet v 1 den Bereich um Aminosäure 55 als ein wichtiges IgE-bindendes Epitop indentifizieren, welches aber nur eine schwache Kreuzreaktion mit Api g 1.01 und Dau c 1.01 aufweist. Jedoch könnte genau dieses Modellprotein herangezogen werden, um die noch nicht aufgeklärten Epitope zu bestimmen, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Kreuzreaktivität von Bet v 1 und den homologen Proteinen aus Sellerie und Karotte haben. Somit hat die Gruppe um Berkner ein geeignetes Instrument zur Untersuchung von IgE-Epitopen der Bet v 1 homologen Proteine geschaffen.

Um den Einfluss der Gesamtstruktur auf die IgE-Bindung zu untersuchen, wurden neben der Bet v 1 ähnlichen Mutante Api g 1.01K<sup>44</sup>E, von beiden Isoformen auch Mutanten mit zerstörter Struktur hergestellt. Für die Hauptallergene aus Apfel und Kirsche, Mal d 1 bzw. Pru av 1 ist bereits beschrieben, dass ein Austausch der Aminosäure an Position 111 nach Prolin zu einem nahezu kompletten Verlust der IgE-Reaktivität führt, was im Fall von Pru av 1 auf eine zerstörte Sekundärstruktur zurückzuführen ist<sup>57,114</sup>. Aus diesem Grund wurde auch bei den beiden Api g 1-Isoformen an Aminosäureposition 111 ein Austausch zu Prolin durchgeführt, so dass diese eine zerstörte Struktur aufweisen sollten. Im Fall von Api g 1.02C<sup>111</sup>P war dies erfolgreich, da das rekombinante Protein im CD-Spektrum eine zerstörte Sekundärstruktur zeigte. Die Mutante Api g 1.01S<sup>111</sup>P hingegen enthielt noch Anteile an intakten Sekundärstrukturen (Abb. 5.14). Trotzdem konnte für diese Mutante eine eindeutig reduzierte IgE-Bindung im Vergleich zu Api g 1.01 gezeigt werden, was durch eine destabilisierte Sekundärstruktur, die Api g 1.01S<sup>111</sup>P in der Denaturierungskurve zeigte (Abb. 5.15), zu erklären ist.



Der Austausch von C<sup>111</sup>P in Api g 1.02 hingegen hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die IgE-Bindungskapazität dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein Api g 1.02. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl in der indirekten Messung der IgE-Bindung, als auch in IgE-Inhibitionsexperimenten (Abb. 5.16 bis 5.18). Die Patientengruppe der Sellerieallergiker mit einer Monosensibilisierung auf Api g 1.01 wies keine IgE-Reaktivität auf eine der beiden Prolinmutanten (Api g 1.01S<sup>111</sup>P und Api g 1.02C<sup>111</sup>P) (Tab. 18) auf und es konnte auch keine relevante Inhibition der IgE-Bindung mit einer der beiden Mutanten an Api g 1.01 als Festphasenantigen nachgewiesen werden (Abb. 5.18a). Wurden Seren von Sellerieallergikern eingesetzt, welche auf beide Api g 1 Isoformen sensibilisiert waren, so zeigten Api g 1.01S<sup>111</sup>P und Api g 1.02C<sup>111</sup>P eine partielle Inhibition, wenn Api g 1.01 an die Festphase gekoppelt war (Abb. 5.18b). Des Weiteren ist die Prolinmutante von Api g 1.02 in der Lage die IgE-Bindung an Api g 1.02 als Festphasenantigen komplett zu inhibieren, allerdings war die Eigeninhibition mit dem wildtyp Protein um ein 20-faches stärker, als die Inhibition mit der ungefalteten Mutante (Abb. 5.18c). Dieser Sachverhalt lässt sich, wie für die Prolinmutante von Api g 1.01, mit den strukturellen Daten, die mittels CD-Spektroskopie gewonnen wurden erklären.

Api g 1.02C<sup>111</sup>P zeigt nach Aufnahme eines CD-Spektrums (Abb. 5.13) eine typische Kurve, welche für Proteine mit zerstörter Sekundärstruktur beschrieben sind. Die IgE-Bindung und die inhibitorische Wirkung bleiben allerdings trotz dieser strukturellen Veränderung fast komplett unverändert gegenüber der Wildtyp-Isoform. Möglich wäre, dass das gereinigte Material mit minimalen Mengen an gefaltetem Protein verunreinigt war. Husslik et al. haben den Einfluss von Anteilen einer ungefalteten Bet v 1-Variante in einem Gemisch mit Bet v 1 auf dessen CD-Spektrum, IgG- und IgE-Bindung systematisch untersucht<sup>140</sup>. Sie konnten zeigen, dass bereits bei einem Verhältnis von 20% gefaltetem Protein zu 80% ungefaltetem Material die Kurve der mittleren residualen Elliptizität nahezu identisch ist mit der, der 100% ungefalteten Bet v 1-Variante. Somit kann das Vorhandensein von, im CD-Spektrum kaum detektierbaren, transienten, intakten Sekundärstrukturen nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Grund für die bestehende IgE-Reaktivität von Api g 1.02C<sup>111</sup>P könnte sein, dass Api g 1.02 Sequenzepitope besitzt, die durch die Zerstörung der Sekundärstruktur nicht beeinflusst werden.

Bisher sind einige lineare Epitope auf Nahrungsmittelallergenen beschrieben, allerdings wird die Relevanz solcher Sequenzepitope in der Literatur sehr kontrovers diskutiert und man nimmt an, dass lineare IgE bindende Strukturen eher an der Bildung von diskontinuierlichen Epitopen beteiligt sind, als dass sie ein eigenes Epitop ausbilden können<sup>141-144</sup>. Im Fall von Api g 1.02 könnte also der Bereich um AS 111 eine Rolle bei der Ausbildung eines IgE Epitops spielen, welches auch Bet v 1 spezifische IgE Antikörper binden kann, wie es bereits für Bet v 1 und Mal d 1 beschrieben ist<sup>114,145</sup>. Aus diesem Grund wären weitere Untersuchungen in Folgeexperimenten interessant.

### **6.2.2 Auswirkung der Mutagenese von Dau c 1 auf dessen IgE-Bindungseigenschaften**

Neben Untersuchungen des Einflusses von Mutation und Oligomerisierung des Hauptallergens von Karotte, Dau c 1 auf dessen Struktur, war ein weiteres Ziel dieser Studie die Evaluierung ob Zerstörung der Struktur, die Oligomerisierung oder die Verwendung oligomerisierter Allergene mit nicht intakten Strukturen ein besseres Werkzeug zur Herstellung hypoallergener Varianten dieser Allergene sind. Bisher veröffentlichte Studien zur Oligomerisierung von Bet v 1<sup>128,146</sup> haben berichtet, dass dies eine Strategie zur Herstellung von hypoallergenen Proteinen darstellt. Da in diesen Konstrukten, sofern diese nach der Oligomerisierung eine intakte Struktur aufweisen, die T- und B-Zell-Epitope aufrecht erhalten bleiben, zeigen diese nach wie vor eine IgE-Bindung mit Seren von Birkenpollenallergikern. Gleiches konnte in dieser Arbeit für des Fusionsproteins aus den beiden Dau-c-1-Isoformen gezeigt werden. IgE-Antikörperreaktivitäten, gemessen mittels EAST (s. 4.3.3) mit Seren von Karottenallergikern, korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie (Kap. 4.2.6, Abb. 5.15). Strukturell intakte und gefaltete Proteine, wie die beiden Dau c 1 Isoformen, das Dau c 1-Fusionsprotein und das -Trimer zeigen IgE-Reaktivität mit den Seren der Karottenallergikern. Im Fall des Dimers ist die Reaktivität im Vergleich zur Mischung der Einzelallergene sogar leicht erhöht, was durch Einzeichnen der Kurve nach linearer Regression ( $r=0,87$ ) gut veranschaulicht wird. Vor allem im Bereich kleiner 5kU/ml verschiebt sich die Kurve in Richtung des Fusionsproteins (Abb.

5.19). Gerade erhöhte IgE-Bindungsaktivitäten sind für die Immuntherapie negative Effekte, da dadurch mit unerwünschten Nebenwirkungen bei der Verabreichung des Therapeutikums zu rechnen ist. Dahingegen zeigen die ungefalteten Dau-c-1-<sup>111</sup>P-Mutanten nur noch geringe bis keine IgE-Bindungskapazität mehr, was für die Verwendung als hypoallergenes Therapeutikum spricht, da hier die unerwünschten Nebenwirkungen durch IgE vermittelte Ausschüttung von Mediatoren ausgeschlossen ist. Allerdings muss für solche Proteine eine funktionierende Aktivierung des Immunsystems, die Bildung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort und Induktion von blockierenden IgG-Antikörpern nachgewiesen werden.

Mutationen an Position 111 zur Aminosäure Prolin, wie auch in dieser Studie für Api g 1 und Dau c 1 eingeführt, sind bereits für Bet v 1 und einige Bet v 1 homologe Proteine, als eine für die Faltung kritische Position beschrieben worden<sup>57,114,115</sup>. In der Literatur wird die Verwendung von Allergenen mit zerstörter Struktur als hypoallergenes Protein kontrovers diskutiert, da diese nicht in der Lage sein sollen sogenannte blockierende IgG Antikörper zu induzieren, welche die Allergen-induzierte-Histaminausschüttung von Basophilen verhindern können<sup>147</sup>. Aus diesem Grund verfolgen einige Studien die Strategie Moleküle zu erzeugen, deren Oberflächenstruktur erhalten, die allergene Aktivität allerdings reduziert ist. Es scheint jedoch schwer zu sein, solche hypoallergenen Proteine herzustellen, welche in der Lage sind blockierende IgG Antikörper auf korrekt gefaltete Allergene zu induzieren, die gleichzeitig aber auch eine reduzierte IgE-Bindungskapazität aufweisen, um eventuelle Nebenwirkungen bei der spezifischen Immuntherapie zu umgehen.

In einer Studie von Holm et al.<sup>148</sup> wurden Bet v 1 Mutanten mit 4 (N28T, K32Q, E45S, P108G) oder neun Mutationen (Y5V, E42S, E45S, N78K, K103V, K123I, K134E, D156H, +160N) hergestellt, welche eine komplett intakte Oberflächenstruktur besitzen. Diese zeigen im Vergleich zum unmutierten Bet v 1 allerdings nur eine leicht reduzierte IgE-Bindungskapazität. Da diese Mutanten aber eine gute Induktion von blockierenden IgG-Antikörpern aufweisen, werden sie von Holm et al. als ein geeigneter Kompromiss zwischen erniedrigter IgE-Bindung, bei gleichzeitiger intakter Fähigkeit zur Stimulation des Immunsystems, IgG Antikörper zu induzieren, angesehen.

Zwei weitere Studien<sup>145,149</sup>, die Mutationen an Bet v 1 und dem homologen Allergen aus Apfel, Mal d 1, untersuchen, legen nahe, dass lediglich 6 Aminosäurepositionen (T10P, F30V, S57N, S112C, I113V, D125) für Bet v 1 und 5 für Mal d 1 (T10P, I30V, T57N, T112C, I113V) maßgeblich für die IgE-Antikörperbindung verantwortlich sind. Auch hier zeigen die strukturell intakten Mutanten eine leichte, bei manchen Patienten auch starke Reduktion der IgE-Bindung. Bolhar et al.<sup>102</sup>, die erstmals diese 5-fach Mutante von Mal d 1 untersucht haben, konnten jedoch nur eine schwache Reduktion der IgE-Bindung im Immunoblot nachweisen, wohingegen in Skin-Prick-Test Untersuchungen 13 von 14 Patienten, welche alle positiv auf das wildtyp Mal d 1 reagierten, keine Reaktion auf das 5-fach mutierte Mal d 1 gezeigt haben. Dies lässt darauf schließen, dass zum einen die IgE-Bindung an die Mutante sehr stark von der IgE-Antwort des einzelnen Patienten abhängt. Ferner scheinen zwischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen relevante Unterschiede zu bestehen. Für ein anderes Bet v 1 homologes Allergen aus Kirsche, Pru av 1, wurden ebenfalls Mutationsstudien durchgeführt, um relevante IgE-bindende Epitope zu bestimmen. Hier konnten Wiche et al.<sup>137</sup> zeigen, dass, bei intakter Faltung der Pru-av-1-Mutante, die beiden Mutationen an den Aminosäurepositionen N<sup>28</sup>K und P<sup>108</sup>A die allergene Potenz zwar erniedrigen aber nicht komplett aufheben. In Vorexperimenten in unserem Labor mit den veränderten Dau c 1 Allergenen wurde die durch diese Proteine induzierte Histaminausschüttung *in vitro* mit Basophilen von Karottenallergikern gemessen. Auch hier wurde bereits gezeigt, dass die Oligomerisierung allein, die allergene Potenz nicht herabsetzt, wohingegen die strukturell veränderten Monomere und Dimere eine bis zu 1000fach reduzierte biologische Aktivität aufwiesen (Daten nicht gezeigt,<sup>150</sup>) Zusammenfassend zeigen all diese Studien, dass Allergenvarianten, mit zum Teil mehreren Mutationen, keine idealen Kandidaten für eine Immuntherapie darstellen, wenn deren Struktur weiterhin intakt ist, da dadurch in allen hier gezeigten Fällen die allergene Potenz der Proteine nicht komplett aufgehoben war. Durch die polyklonalität der IgE-Antworten und die individuellen IgE-Antworten von Allergikern, scheint es sehr schwer zu sein ein Allergen mittels Mutation in eine hypoallergene Variante zu verändern, so dass eine komplette Aufhebung der IgE-Bindung von Seren allergischer Patienten mit diesen Proteinen erfolgt. Allerdings haben all diese

Studien einen großen Beitrag zum Verständnis der Allergenität von Proteinen auf molekularer Ebene geleistet.

Proteine mit zerstörter Struktur, wie sie hier in der Studie verwendet wurden, scheinen somit besser geeignete Kandidaten für eine Immuntherapie zu sein, da hier durch die aufgehobenen IgE-Bindungseigenschaften kaum allergene Potenz vorhanden ist und somit auch keine allergischen Nebenreaktionen bei der Therapie zu erwarten sind. Durch die Zerstörung der Struktur besteht allerdings auch immer die Gefahr, dass die für die Immuntherapie wichtige Erhaltung der T-Zell-Reaktivität aufgehoben wird. Hier ist sicher von Vorteil, wenn die Zerstörung der Allergenstruktur durch möglichst wenige Mutationen hervorgerufen werden, damit eventuell wichtige lineare T-Zell-Epitope erhalten bleiben. Solche veränderten Allergen werden bereits in der SIT in Form von Allergoiden angewandt. Hierbei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, bei denen die Allergene durch Glutaraldehyd polymerisiert werden. Auch hier sind die B-Zell Epitope reduziert, die T-Zell Epitope aber bleiben erhalten<sup>77</sup>.

Ein anderer Ansatz der Immuntherapie mittels Induktion von blockierenden Antikörpern wurde im letzten Jahr von Focke-Tejkl et al. beschrieben<sup>151,152</sup>. Im Gegensatz zur bisher herrschenden Meinung, wurde hier auf die Erhaltung von linearen T-Zell-Epitopen verzichtet. Die hypoallergenen Peptide der wichtigsten Graspollenallergene mit reduzierter T-Zell Aktivität, wurden in diesem Fall mit einem nicht allergenen Trägermoleküle, der PreS-Domäne des Hepatitis B Virus, gekoppelt. Dieses, als Peptid-Träger-Technologie bezeichnete Verfahren, wurde bereits erfolgreich zur Herstellung von sicheren und effektiven Hepatitis B Vakzinen verwendet. Die PreS Domäne soll hier der Stimulierung von T-Zellen zur Bildung von blockierenden allergen-spezifische IgG Antikörper dienen. Obwohl keine T-Zell-Aktivität der eingesetzten Allergenpeptide mehr vorlag, konnten die Autoren *in vivo*, nach Immunsierung von Mäusen mit dem PreS-Peptid-Komplex eine eindeutige Bildung allergen-spezifischer blockierender IgG Antikörper nachweisen.

Somit ist neben der Erhaltung der T-Zell Reaktivität auch die Verwendung von T-Zell stimulierenden Trägermolekülen zur Generierung hypoallergener Moleküle für die spezifische Immuntherapie möglich. Wichtig ist allerdings, dass die hypoallergenen Moleküle neben der Testung auf ihre nicht vorhandene allergene

Potenz, auch auf deren Immunogenität, z.B. wie in dieser Studie *in vivo* in einem Tiermodell, zu untersuchen sind.

### 6.2.3 Immunogenität von Dau c 1, dessen Isoformen und Mutanten

Für die Generierung von hypoallergenen Proteinen ist neben der Aufhebung der allergenen Potenz, die Aufrechterhaltung der Immunogenität, wie die Induktion von blockierenden IgG-Antikörpern gegen das native Allergen essentiell. Aus diesem Grund wurden die in dieser Studie verwendeten Mutanten und Dimere des Hauptallergens aus Karotte, Dau c 1, auch in Untersuchungen im Mausmodell eingesetzt. Dazu wurden BALB/c-Mäuse 6 mal im zwei Wochenintervall mit verschiedenen Dosen (0,01µg, 0,1µg und 1µg pro Dosis und Maus) aller hergestellten rekombinanten Dau c 1 Proteine (Tab. 17), bis auf das Trimer, immunisiert. Die Seren der finalen Blutentnahmen wurden auf serologische Parameter, wie die Antikörperinduktion untersucht. Gerade im Hinblick auf die Induktion von blockierenden IgG-Antikörpern, konnte gezeigt werden, dass auch die <sup>111</sup>P-Mutanten, trotz zerstörter Struktur immer noch in der Lage sind IgG-Antikörper zu induzieren, welche mit den nativen Proteinen eine Bindung eingehen können. Das Bindungsverhalten dieser IgG-Antikörper an die wildtyp-Allergene in einem indirekten ELISA-System gemessen, ergibt ein vergleichbares Bild, wie die Bindung, der von den Wildtyp-Proteinen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 induziert IgG-Antikörper (s. Abb. 5.20). Es zeigte sich außerdem, dass eine Fusion der Proteine sich positiv auf die Immunogenität auswirkt. Sogar die niedrigste Dosis (0,01µg) des mutierten Fusionsproteins löste eine gute Immunantwort gegen alle verwendeten Proteine aus (s. Abb. 5.21H). Anhand der hier erhaltenen Daten, sollte das Dimer den Monomeren vorgezogen werden, da die Dimerisierung einen positiven Effekt auf die Immunogenität, gerade bei niedrigen verabreichten Dosen hat. Ein weiterer beabsichtigter Vorteil der Verwendung des Dimers ist, dass dieses beide Dau-c-1-Isoformen, Dau c 1.01 und Dau c 1.02, in einem Therapeutikum kombiniert und somit auch das T-Zell-Epitop Repertoire beider Isoformen beinhaltet.

Zur Überprüfung, ob die mittels mutierten Proteinen induzierten IgG-Antikörper in der Lage sind, mit humanen IgE-Antikörpern um die Bindungsstellen auf den

Dau c 1 Allergenen zu konkurrieren, wurden Inhibitionsstudien mit den Mausseren und Seren von Karottenallergikern durchgeführt (s. Kap. 4.3.2). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Antikörper, welche gegen die mutierten Proteine gebildet wurden, ebenso in der Lage waren die IgE-Antikörperbindung an die Wildtyp-Isoformen Dau c 1.01 und 1.02 zu inhibieren, wie jene, die durch die Wildtyp-Proteine gebildet wurden (Abb. 5.21). Dies ist ein Hinweis darauf, dass doch ein erheblicher Anteil der mittels mutierter Proteine induzierten IgG-Antikörper an die native Form von Dau c 1 bindet und somit Bereiche auf dem Molekül erkennen, die auch von humanem IgE als Bindungsstellen erkannt werden. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, warum fehlerhaft gefaltete Proteine in der Lage sind Antikörper hervorzurufen, welche an native Allergen binden können. Eine mögliche Erklärung wäre, dass vor allem das mutierte Fusionsprotein noch Anteile an intakten Sekundärstrukturen (Abb. 5.15) aufwies. Gerade für das Fusionsprotein kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass dies der Fall ist. Eine weitere Erklärung ist, dass für die Induktion von kreuzreaktiven IgG-Antikörpern sequentielle Epitope verantwortlich sind, die durch die Mutation an Aminosäureposition 111 nicht beeinflusst werden. Diese Hypothese jedoch müsste dahingehend untersucht werden, dass die Epitope, welche von den in den Mäusen gebildeten Antikörper erkannt werden, auch von Seren von Karottenallergikern gebunden werden, welche sich einer Immuntherapie mit Karottenallergenen unterzogen haben. Ein geeigneter Ansatz für eine detailgenaue Untersuchung, welche Epitope genau von den Mausseren im Vergleich zu den Seren von Karottenallergikern erkannt werden, wäre z.B. der Einsatz einer Phage-Display-Library, wie sie von Mittag et al. erfolgreich für die Charakterisierung von Konformationsepitopen auf Bet v 1 und homologe Proteine eingesetzt wurde<sup>153</sup>.

Ein weiteres wichtiges Kriterium der Verwendung von hypoallergenen Proteinen ist neben der erfolgreichen Induktion von blockierenden Antikörpern und der geringen IgE-Bindungskapazität *in vitro* die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort auf das Therapeutikum *in vivo*. Dies bedeutet, dass das Hypoallergen möglichst selber keine IgE-Antikörperbildung induziert. Aus diesem Grund wurde neben der Induktion von IgG auch der Gehalt an gebildetem Dau c 1 spezifischem IgE gemessen. Werden BALB/c Mäuse in Gegenwart von Alum immunisiert, so bilden diese in der Regel IgE-Antikörper gegen das Immunogen, es kann also von einem

Milieu ausgegangen werden, wie es auch in einem Allergiker vorliegt. Immunisiert man die Mäuse mit den nativen Isoformen von Dau c 1, oder dem nicht mutierten Fusionsprotein aus den beiden Isoformen, so werden mit diesen Proteinen auch bei niedrigen Dosen von 0,01µg/ml IgE-Antikörper auf das entsprechende Antigen gebildet (Abb. 5.22A, B, E). Die mutierten Allergene hingegen zeigten unter diesen Bedingungen nur in hohen Immunisierungsdosen eine Induktion von IgE-Antikörpern. Bei der niedrigen Dosis von 0,01µg/ml war nur noch eine geringe Mediatorfreisetzung bei Verwendung dieser Seren messbar, was darauf schließen lässt, dass kaum IgE in den Seren vorhanden ist, welches mit dem Immunogen eine Reaktion eingehen kann (Abb. 5.22C, D, F). Dies entspricht der Dosis, bei der die IgG-Bildung des mutierten Fusionsproteins noch ausreichend hoch war. Wichtig für die Immuntherapie ist, dass eventuell gebildete IgE-Antikörper nicht mit den natürlichen Proteinen kreuzreagieren. Untersuchungen der Reaktivität der auf die mutierten Proteine gebildeten IgE-Antikörper (Immunisierungsdosis 1µg/ml) mit den Wildtyp-Proteinen zeigen, dass nur dann eine Mediatorfreisetzung messbar ist, wenn diese Seren, in höheren Konzentrationen im RBL-Test eingesetzt werden (Abb. 5.23). Da vor allem bei Nahrungsmittelallergien die Nebenwirkungen einer Immuntherapie mit dem auslösenden Agens, wie sie erfolgreich für Bienengiftallergie, oder auch Graspollen, angewandt werden<sup>76,77</sup>, sehr hoch sind, ist die Therapie mit einem hypoallergenem Protein, das nicht in der Lage ist mit dem IgE des natürlich vorkommenden Allergens kreuz zu reagieren und auch selber nicht in der Lage ist IgE zu bilden, von Vorteil.

Schlussfolgernd lässt sich zu den *in vivo* Ergebnissen mit den Karottenallergenen sagen, dass die wildtyp-Isoformen und das Fusionsprotein in der Lage waren IgG-Antikörper gegen alle Dau c 1 Proteine zu bilden. Im Vergleich zu den Monomeren, waren das Wildtyp- und das mutierte Fusionsprotein stärkere Immunogene, als die Monomere, da bei ihnen auch die niedrigen Dosen von 0,01µg zur Induktion von spezifischen IgG-Antikörpern auf alle Dau c 1 Isoformen geführt hat, was bei den Monomeren nur bei der hohen Dosis der Fall war. Weiterhin enthielten alle Mausseren, egal ob sie mit Dau-c-1-Wildtyp, -Mutante oder -Dimer immunisiert wurden, IgG-Antikörper, die spezifisch für Epitope der humanen IgE-Bindung an Dau c 1 waren. Dies weist darauf hin, dass ungefaltete Antigene in niedrigen Dosen blockierende Antikörper induzieren können, aber keine IgE-Antikörper bilden.



Somit ist die Zerstörung der nativen Struktur von Allergenen durch Einführung möglichst weniger Mutationen eine bessere Strategie zur Entwicklung neuer Reagenzien für die klassische Immuntherapie, als die Oligomerisierung von Wildtyp-Proteinen.

### 6.3 Ausblick

In dieser Arbeit sollte der Einfluss struktureller Veränderungen an Allergenen am Beispiel von Sellerie und Karotte auf deren allergenes Potential und Immunogenität untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass gerade die Aufhebung der Struktur mittels der Einführung eines Prolins als Strukturbrecher an Aminosäureposition 111, ein geeignetes Werkzeug zur Herstellung von hypoallergenen Mutanten für die Immuntherapie darstellen kann. Für das Hauptallergen aus Karotte Dau c 1 konnte bereits gezeigt werden, dass diese Proteine nicht nur eine geringere IgE-Bindungskapazität aufweisen, sondern auch *in vivo*, alle Voraussetzungen für ein geeignetes Therapeutikum mitbringen, indem sie blockierende Antikörper induzieren, selber aber nur noch eine sehr geringe IgE-Bildung auslösen. Für das Hauptallergen aus Sellerie Api g 1 müssten solche *in vivo* Mausversuche noch erfolgen, um eine bessere Aussage bezüglich deren Immunogenität machen zu können.

Für Dau c 1 wurde weiterhin gezeigt, dass eine Dimerisierung der mutierten Isoformen die Effekte bezüglich der Immunogenität verstärkt. Da inzwischen noch eine dritte Isoform Dau c 1.03 für das Hauptallergen aus Karotte beschrieben ist<sup>62</sup> wäre zu überlegen, ob ein Trimer aus allen drei Isoformen die therapeutischen Effekte noch besser abdecken könnte. Auch für das Hauptallergen aus Sellerie sind bisher zwei Isoformen Api g 1.01 und 1.02 beschrieben, so dass auch hier ein Fusionsprotein aus den beiden mutierten Isoformen denkbar wäre. Da die Homologie und Kreuzreaktivität zwischen den Hauptallergenen von Karotte und Sellerie sehr hoch sind, ist zu erwarten, dass für *in vivo* Studien mit Api g 1 ähnliche Ergebnisse wie in dieser Studie für Karotte erhalten werden könnten. Interessant wäre auch, ob die durch das mutierte Fusionsprotein gebildeten blockierenden IgG-Antikörper vielleicht sogar mit humanen IgE-Antikörpern aus Serum von

Sellerieallergikern kreuzreagieren und somit nur eines dieser hypoallergenen Proteine nötig ist, um damit Allergien auf homologe Proteine zu therapieren<sup>154</sup>.

Um möglichst viele Bet v 1 homologe Proteine in einem Therapeutikum abzudecken, wäre es auch denkbar ein multimeres Protein aus verschiedenen Allergenen herzustellen. Da das mutierte Dimer aus den beiden Dau c 1 Isoformen blockierende Antikörper gegen beide Isoformen bildet, wäre es durchaus möglich ein Multimer aus diversen Bet v 1 homologen Proteinen unterschiedlicher Spezies, wie Pollen, Gemüse und Obst, z.B. Bet v 1 (Birke), Dau c 1 (Karotte), Mal d 1 (Apfel), Pru av 1 (Kirsche) und Pru p 1 (Pfirsich) herzustellen. Ein ähnliches Protein, bei dem niedrig IgE-bindende Epitope von Bet v 1 und den Bet v 1 ähnlichen Allergenen aus Haselnuss (Cor a 1), Erle (Aln g 1), Hainbuche (Car b 1) und der weißen Eiche (Que a 1) zu einem Molekül zusammen gesetzt sind, was exakt die gleiche Aminosäurelänge, eine vergleichbare Sekundärstruktur und den selben hydrodynamischen Radius wie Bet v 1 aufweist, haben Pichler et al.<sup>155</sup> bereits näher untersucht. Sie haben dieses Molekül ebenfalls mit einer Faltungsvariante verglichen, die eine veränderte Sekundärstruktur mit einem höheren Anteil an ungeordneter Struktur aufweist. Mittels der Verwendung eines prophylaktischen Mausmodells konnten sie zeigen, dass beide Moleküle in der Lage waren vor einer Allergie gegen die wildtyp Allergene zu schützen. Vor allem die erhöhte Sicherheit bei Verwendung der niedrig IgE-bindenden Faltungsvariante unterstreicht das klinische Potential solcher Proteine als mögliche Vakzinkandidaten.

Für bessere Einschätzungen der therapeutischen Wirkung eines solchen hypoallergenen Proteins sind aber *in vivo* Studien nötig, die über die hier durchgeführten Versuche hinausgehen. Denkbar wäre ein Modell, wie es Burggraf et al.<sup>156</sup> für Nahrungsmittelinduzierte intestinale Allergien veröffentlicht haben, welches um die prophylaktische und therapeutische Wirkung von Vakzinen erweitert wird.

Weiterhin sind auch Studien mit Zellen von allergischen Patienten denkbar, um die immunologischen Parameter, wie Zytokine, solcher Therapeutika auch im humanen System zu untersuchen.

Um endgültige Aussagen über solche Therapeutika zu machen sind allerdings klinische Prüfungen an allergischen Patienten nötig, was in Deutschland aber nur mit Proteinen möglich ist, die unter kontrollierten (GMP engl. „good manufacturing

practice“) Bedingungen hergestellt wurden, also einem Maßstab, wie er in einem Forschungslabor nicht möglich ist.

## 7 Zusammenfassung

Eine spezifische Immuntherapie der Allergie, wie sie für die Pollen- und Bienengiftallergie angewandt wird, ist für Nahrungsmittelallergien wegen des hohen Risikos lebensbedrohlicher Nebenwirkungen und fehlender Wirksamkeit nicht etabliert. Somit bleibt vielen Nahrungsmittelallergikern nur die Vermeidung der allergieauslösenden Lebensmittel zur Prävention allergischer Reaktionen.

Neuartige Ansätze zur Immuntherapie von Allergien beschreiben unter anderem die Verwendung sogenannter hypoallergener Proteine. Diese sind meist Allergene, deren Struktur dahingehend verändert wurde, dass sie trotz intakter Immunogenität eine reduzierte IgE-Bindungseigenschaft und damit eine verminderte Allergenität aufweisen. Studien am Hauptallergen der Birke haben gezeigt, dass sowohl die Mutation von IgE relevanten Epitopen, als auch Multimerisierungen der Birkenpollenallergene zu solchen Hypoallergenen führen.

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich solche gezielten Mutationen und Oligomerisierungen auf die Hauptallergene von Sellerie und Karotte übertragen lassen. Ein weiterer Punkt der Studie lag darin, zu untersuchen, ob Oligomerisierung allein oder in Kombination mit Mutationen einen größeren Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften bewirkt.

Wichtig für die Konzeption hypoallergener Proteine ist das Wissen, um wichtige IgE bindende Epitope auf Allergenen. Für das Hauptallergen aus Birke (Bet v 1) ist die exponierte P-Loop-Region als wichtiges Epitop beschrieben. Die Sellerieallergie ist in Mitteleuropa oft auf eine IgE-Kreuzreaktivität mit Bet v 1 zurückzuführen, weshalb auch das Hauptallergen aus Sellerie (Api g 1), von welchem zwei Isoformen beschrieben sind, näher im Bereich der P-Loop-Region untersucht wurde. Die in dieser Arbeit als stärker IgE bindende bestätigte Isoform Api g 1.01 zeigt allerdings genau in dieser Region eine wichtige Abweichung von Bet v 1, weshalb eine Mutante hergestellt wurde, welche in diesem Bereich dem Bet v 1 angepasst wurde. Mit Hilfe von IgE-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass diese Veränderung zu einer Verstärkung der Bindung von IgE aus Seren von Birkenpollenallergikern führte, während Seren von Sellerieallergikern, die ausschließlich auf die Isoform Api g 1.01 sensibilisiert waren, eher eine

unveränderte IgE-Bindung an diese Mutante zeigten. Seren von Patienten, die auf beide Isoformen sensibilisiert waren, zeigten wie die Birkenpollenallergiker eine erhöhte Reaktivität auf diese Mutante. Da die zweite Isoform, Api g 1.02, allerdings nur eine geringe Relevanz bei der Sellerieallergie spielt, kann durch die Ergebnisse mit dieser Mutante gefolgert werden, dass die P-Loop-Region für die birkenpollenassoziierte Sellerieallergie ein weniger wichtiges IgE-Epitop ist, als für das homologe Birkenpollenallergen. Die gerichtete Mutation der P-Loop-Region kann somit bei Api g 1.01 nicht als Strategie zur Herstellung hypoallergener Derivate in Betracht gezogen werden. Weiterführende Studien bezüglich der relevanten IgE-Epitope des Hauptallergens aus Sellerie sind demnach nötig.

Ein weiterer wichtiger Ansatz zur Herstellung hypoallergener Mutanten ist die Zerstörung der dreidimensionalen Struktur von allergenen Proteinen, so dass keine Konformationsepitope mehr vorhanden sind, welche hauptsächlich für die IgE-Bindung verantwortlich sind. In der Regel sind solche Proteine nicht mehr in der Lage IgE im Patientenserum zu binden, können aber *in vivo* eine zelluläre Immunogenität auslösen.

Dazu wurden neben den jeweiligen Isoformen der Hauptallergene von Sellerie (Api g 1) und Karotte (Dau c 1) auch <sup>111</sup>P-Mutanten dieser Proteine rekombinant hergestellt, welche eine zerstörte Sekundärstruktur aufwiesen. Sowohl für Sellerie als auch für Karotte, waren die mutierten Proteine nicht mehr in der Lage, die jeweiligen spezifischen IgE-Antikörper in Patientenserum zu erkennen. Sie wiesen somit eine reduzierte Allergenität auf, was sie zu möglichen geeigneten Kandidaten für eine Immuntherapie machen. Wichtig für einen Mechanismus zur effektiven Immuntherapie ist aber auch die Induktion von blockierenden IgG-Antikörpern, welche unter anderem das Allergen binden und somit verhindern, dass es zu einer Kreuzvernetzung von IgE kommt, welches über den FcεRI-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden ist. In dieser Studie konnte mittels eines Mausmodells *in vivo* gezeigt werden, dass die beiden Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 des Hauptallergens aus Karotte, welche keine intakten IgE-Epitope mehr aufwiesen trotzdem noch in der Lage waren solche blockierenden Antikörper zu induzieren. Die Funktionalität dieser Antikörper mit IgE um das Allergen zu

konkurrieren, wurde mittels Inhibition der Bindung von humanem IgE an das entsprechende Allergen durch Zugabe der entsprechenden Mausseren, welche die gebildeten IgG Antikörper enthielten, nachgewiesen und war vergleichbar mit der Inhibitionswirkung von Seren der Mäuse, die mit den Wildtyp-Allergenen immunisiert wurden. Wurden Proteine eingesetzt, die nicht nur eine zerstörte Struktur aufwiesen, sondern auch noch als Dimer der beiden Dau c 1 Isoformen mit zerstörter Struktur vorlagen (Dau c 1FP<sup>111</sup>P), so konnte eine verstärkte Induktion von blockierenden Antikörpern mit erhöhter IgE-Inhibitionswirkung beobachtet werden. Somit ist die Multimerisierung von Allergenen bei gleichzeitiger Zerstörung der Struktur ein geeigneter Ansatz zur Herstellung von hypoallergenen Proteinen.

Da Immuntherapeutika möglichst nicht in der Lage sein sollten allergische Reaktionen auszulösen, indem sie mit bestehenden IgE-Antikörpern kreuzreagieren, wurden die hier untersuchten hypoallergenen Proteine auch in Kreuzreaktivitätsstudien eingesetzt. Diese haben gezeigt, dass nur hohe Immunisierungsdosen zur Induktion von IgE führten, welches mit den Wildtyp-Allergenen kreuzreaktiv war. Da aber zur Induktion von blockierenden IgG-Antikörpern bereits eine geringe Dosis an verändertem Allergen ausreichend war, ist dies zu vernachlässigen.

Mittels Untersuchungen von IgE-bindenden-Epitopen und gezielter Veränderung von Allergenen, konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass nicht nur die Zerstörung der Struktur oder die Oligomerisierung von Allergenen, sondern die Kombination der beiden Methoden eine geeignete Strategie zur Entwicklung neuer Reagenzien für die klassische spezifische Immuntherapie der Lebensmittelallergie darstellen kann.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kay A. Allergy and Allergic Diseases (Part I). *N Engl J Med* 2001;344:30–7.
2. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S116–25.
3. VON PIRQUET C. Allergie. *Ann Allergy* 4:388–90.
4. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832–6.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology* 6th Edition. Elsevier; 2007.
6. Jäger L, Wüthrich B, Ballmer-Weber BK, Vieths S. *Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen*. 3. Auflage. Elsevier; 2008.
7. Corry DB. Emerging immune targets for the therapy of allergic asthma. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:55–64.
8. Dykewicz MS, Hamilos DL. Rhinitis and sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S103–15.
9. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999;402:B24–30.
10. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker H a, et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003;21:579–628.
11. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931–72.
12. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749–86.
13. Puglisi G, Frieri M. Update on hidden food allergens and food labeling. *Allergy Asthma Proc* 2007;28:634–9.
14. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004;59:690–7.

## Literaturverzeichnis

15. Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Conti A, Dubakiene R, Fernandez-Rivas M, et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:135–47.
16. Chafen JJS, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttorp MJ, et al. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *Jama J Am Med Assoc* 2010;303:1848–56.
17. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:594–602.
18. Jenkins JA, Breiteneder H, Mills ENC. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1399–405.
19. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:847–52.e7.
20. Wang J, Sampson HA. Food allergy. *J Clin Invest* 2011;121:827–35.
21. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:821–30; quiz 831.
22. Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills ENC. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:163–70.
23. Radauer C, Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:518–25.
24. Gamboa PM, Cáceres O, Antepará I, Sánchez-Monge R, Ahrazem O, Salcedo G, et al. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy* 2007;62:408–14.
25. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:962–9.
26. Etesamifar M, Wüthrich B. IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien bei 383 Patienten unter Berücksichtigung des oralen Allergie-Syndroms. *Allergologie* 1998;21:451–7.
27. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 2002;964:47–68.



## Literaturverzeichnis

28. Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:82–6.
29. Bohle B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy* 2007;62:3–10.
30. Mari A, Ballmer-Weber BK, Vieths S. The oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:267–73.
31. Jankiewicz A, Aulepp H, Baltés W, Bögl KW, Dehne LI, Zuberbier T, et al. Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen-sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:268–78.
32. Burney P, Summers C, Chinn S, Hooper R, van Ree R, Lidholm J. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* 2010;65:1182–8.
33. Ballmer-Weber BK, Vieths S, Lüttkopf D, Heuschmann P, Wüthrich B. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:373–8.
34. Ballmer-Weber BK, Wüthrich B, Wangorsch A, Fötisch K, Altmann F, Vieths S. Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:301–7.
35. Wüthrich B, Ballmer-Weber BK. Food-induced anaphylaxis. *Allergy* 2001;56 Suppl 6:102–4.
36. Wüthrich B, Dietschi R. [The celery-carrot-mugwort-condiment syndrome: skin test and RAST results]. *Schweiz Med Wochenschr* 1985;115:258–64.
37. Wüthrich B, Stäger J, Johansson SG. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990;45:566–71.
38. Ballmer-Weber BK, Hoffmann a., Wuthrich B, Luttkopf D, Pompei C, Wangorsch a., et al. Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Allergy* 2002;57:228–35.
39. Gadermaier G, Egger M, Girbl T, Erler A, Harrer A, Vejvar E, et al. Molecular characterization of Api g 2, a novel allergenic member of the lipid-transfer protein 1 family from celery stalks. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:568–77.

## Literaturverzeichnis

40. Vejvar E, Himly M, Briza P, Eichhorn S, Ebner C, Hemmer W, et al. Allergenic relevance of nonspecific lipid transfer proteins 2: Identification and characterization of Api g 6 from celery tuber as representative of a novel IgE-binding protein family. *Mol Nutr Food Res* 2013;
41. Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, Wüthrich B, Pichler C, Fritsch R, et al. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1161–70.
42. Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kündig T, Fötisch K, et al. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin Exp Allergy* 2005;35:970–8.
43. Bohle B, Zwölfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, et al. Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:242–9.
44. Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts-Mills TA. Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ* 1986;64:767–74.
45. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:224–33.
46. Radauer C, Nandy A, Ferreira F, Goodman RE, Larsen JN, Lidholm J, et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy* 2014;69:413–9.
47. Chapman MD. Allergen nomenclature. *Clin Allergy Immunol* 2008;21:47–58.
48. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:414–20.
49. Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, O’Riordain G, Susani M, Ahorn H, Ebner C, et al. Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur J Biochem* 1995;233:484–9.
50. Hoffmann-Sommergruber K, O’Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, Pühringer H, et al. Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin Exp Allergy* 1999;29:840–7.

## Literaturverzeichnis

51. Lüttkopf D, Ballmer-Weber BK, Wüthrich B, Vieths S. Celery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:390–9.
52. Gadermaier G, Hauser M, Egger M, Ferrara R, Briza P, Souza Santos K, et al. Sensitization Prevalence, Antibody Cross-Reactivity and Immunogenic Peptide Profile of Api g 2, the Non-Specific Lipid Transfer Protein 1 of Celery. *PLoS One* 2011;6:e24150.
53. Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *IntArchAllergy Immunol* 2007;142:99–115.
54. Bublin M, Radauer C, Wilson IBH, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H, et al. Cross-reactive N-glycans of Api g 5, a high molecular weight glycoprotein allergen from celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients. *FASEB J* 2003;17:1697–9.
55. Bauermeister K, Ballmer-Weber BK, Bublin M, Fritsche P, Hanschmann K-MO, Hoffmann-Sommergruber K, et al. Assessment of component-resolved in vitro diagnosis of celeriac allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1273–81.e2.
56. Hoffmann-Sommergruber K, Ferris R, Pec M, Radauer C, O’Riordain G, Laimer Da Camara Machado M, et al. Characterization of api g 1.0201, a new member of the Api g 1 family of celery allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:115–23.
57. Neudecker P, Lehmann K, Nerkamp J, Haase T, Wangorsch A, Fötisch K, et al. Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *Biochem J* 2003;376:97–107.
58. Bublin M, Lauer I, Oberhuber C, Alessandri S, Briza P, Radauer C, et al. Production and characterization of an allergen panel for component-resolved diagnosis of celery allergy. *Mol Nutr Food Res* 2008;52 Suppl 2:S241–50.
59. Mirza O, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Wissenbach M, Spangfort MD, et al. 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.
60. Spangfort MD, Mirza O, Ipsen H, Van Neerven RJJ, Gajhede M, Larsen JN. Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *J Immunol* 2003;171:3084–90.

## Literaturverzeichnis

61. Schirmer T, Hoffmann-Sommergruber K, Susani M, Breiteneder H, Marković-Housley Z. Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity. *J Mol Biol* 2005;351:1101–9.
62. Wangorsch A, Weigand D, Peters S, Mahler V, Fötisch K, Reuter A, et al. Identification of a Dauc PRPlike protein (Dauc 1.03) as a new allergenic isoform in carrots (cultivar Rodelika). *Clin Exp Allergy* 2011;
63. Moreno-Ancillo A, Gil-Adrados AC, Domínguez-Noche C, Cosmes PM, Pineda F. Occupational asthma due to carrot in a cook. *Allergol Immunopathol (Madr)* 33:288–90.
64. Moreno-Ancillo A, Gil-Adrados AC, Cosmes PM, Domínguez-Noche C, Pineda F. Role of Dauc 1 in three different patterns of carrot-induced asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)* 34:116–20.
65. Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 1996;3:1040–5.
66. Markovic-Housley Z, Basle A, Padavattan S, Maderegger B, Schirmer T, Hoffmann-Sommergruber K. Structure of the major carrot allergen Dauc 1. *Acta Crystallogr DBiolCrystallogr* 2009;65:1206–12.
67. Neudecker P, Schweimer K, Nerkamp J, Scheurer S, Vieths S, Sticht H, et al. Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J Biol Chem* 2001;276:22756–63.
68. Mogensen JE, Wimmer R, Larsen JN, Spangfort MD, Otzen DE. The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J Biol Chem* 2002;277:23684–92.
69. Lorenz AR, Scheurer S, Haustein D, Vieths S. Recombinant food allergens. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;756:255–79.
70. Bohle B. T-cell epitopes of food allergens. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006;30:97–108.
71. Noon L. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. *Lancet* 1911;177:1572–3.
72. Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2011;66:725–32.
73. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Specific immunotherapy and turning off the T cell: how does it work? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;107:381–92.

## Literaturverzeichnis

74. Calderón M, Cardona V, Demoly P. One hundred years of allergen immunotherapy European Academy of Allergy and Clinical Immunology celebration: review of unanswered questions. *Allergy* 2012;
75. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761–71.
76. Matsuoka T, Shamji MH, Durham SR. Allergen immunotherapy and tolerance. *Allergol Int* 2013;62:403–13.
77. Rolland JM, Prickett S, Gardner LM, O’Hehir RE. T cell targeted strategies for improved efficacy and safety of specific immunotherapy for allergic disease. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2013;12:201–22.
78. Schöll I, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E. Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy. *J Control Release* 2005;104:1–27.
79. Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S306–13.
80. Frew AJ. Hundred years of allergen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1221–5.
81. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:18–27; quiz 28–9.
82. Deifl S, Bohle B. Factors influencing the allergenicity and adjuvanticity of allergens. *Immunotherapy* 2011;3:881–93.
83. Niederberger V. Allergen-specific immunotherapy. *Immunol Lett* 2009;122:131–3.
84. Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:654–60.
85. Lieberman JA, Nowak-Węgrzyn A. Vaccines and immunomodulatory therapies for food allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012;12:55–63.
86. Clark AT, Islam S, King Y, Deighton J, Anagnostou K, Ewan PW. Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy. *Allergy* 2009;64:1218–20.
87. Pajno GB, Caminiti L, Ruggeri P, De Luca R, Vita D, La Rosa M, et al. Oral immunotherapy for cow’s milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;105:376–81.

## Literaturverzeichnis

88. Vickery BP, Pons L, Kulis M, Steele P, Jones SM, Burks AW. Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;105:444–50.
89. Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:744–51.
90. Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:558–73; quiz 574–5.
91. Cummings AJ, Knibb RC, King RM, Lucas JS. The psychosocial impact of food allergy and food hypersensitivity in children, adolescents and their families: a review. *Allergy* 2010;65:933–45.
92. Marsh DG, Lichtenstein LM, Campbell DH. Studies on “allergoids” prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* 1970;18:705–22.
93. Norman PS, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Marsh DG. Controlled evaluation of allergoid in the immunotherapy of ragweed hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 1982;70:248–60.
94. Focke M, Swoboda I, Marth K, Valenta R. Developments in allergen-specific immunotherapy: from allergen extracts to allergy vaccines bypassing allergen-specific immunoglobulin E and T cell reactivity. *Clin Exp Allergy* 2010;40:385–97.
95. Kamdar T, Bryce PJ. Immunotherapy in food allergy. *Immunotherapy* 2010;2:329–38.
96. Rancitelli P, Hofmann A, Burks AW. Vaccine approaches for food allergy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;352:55–69.
97. Yang M, Yang C, Mine Y. Multiple T cell epitope peptides suppress allergic responses in an egg allergy mouse model by the elicitation of forkhead box transcription factor 3- and transforming growth factor-beta-associated mechanisms. *Clin Exp Allergy* 2010;40:668–78.
98. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1211–8.e3.
99. Cromwell O, Häfner D, Nandy A. Recombinant allergens for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:865–72.

## Literaturverzeichnis

100. Valenta R, Linhart B, Swoboda I, Niederberger V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy* 2011;66:775–83.
101. Bannon GA, Cockrell G, Connaughton C, West CM, Helm R, Stanley JS, et al. Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:70–2.
102. Bolhaar STHP, Zuidmeer L, Ma Y, Ferreira F, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Hoffmann-Sommergruber K, et al. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1638–44.
103. Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, et al. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *J Immunol* 2007;178:6290–6.
104. Toda M, Reese G, Gadermaier G, Schulten V, Lauer I, Egger M, et al. Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:1022–30.e1–7.
105. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 1999;5:387–91.
106. Li F, Wang L, Jin X-M, Yan C-H, Jiang S, Shen X-M. The immunologic effect of TGF-beta1 chitosan nanoparticle plasmids on ovalbumin-induced allergic BALB/c mice. *Immunobiology* 2009;214:87–99.
107. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med* 2009;60:261–77.
108. Li XM, Srivastava K, Huleatt JW, Bottomly K, Burks AW, Sampson HA. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed *Listeria monocytogenes* coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J Immunol* 2003;170:3289–95.
109. Gerstmayr M, Ilk N, Schabussova I, Jahn-Schmid B, Egelseer EM, Sleytr UB, et al. A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant allergen-S-layer fusion protein rSbsC-Bet v 1 matures dendritic cells that prime Th0/Th1 and IL-10-producing regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179:7270–5.

## Literaturverzeichnis

110. Schülke S, Burggraf M, Waibler Z, Wangorsch A, Wolfheimer S, Kalinke U, et al. A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:1340–8.e12.
111. Albrecht M, Suezer Y, Staib C, Sutter G, Vieths S, Reese G. Vaccination with a Modified Vaccinia Virus Ankara-based vaccine protects mice from allergic sensitization. *J Gene Med* 2008;10:1324–33.
112. Bohnen C, Wangorsch A, Schülke S, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Burggraf M, et al. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara prevents the onset of intestinal allergy in mice. *Allergy* 2013;
113. Mahler V, Vrtala S, Kuss O, Diepgen TL, Suck R, Cromwell O, et al. Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Clin Exp Allergy* 2004;34:115–22.
114. Son DY, Scheurer S, Hoffmann A, Hausteiner D, Vieths S. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr* 1999;38:201–15.
115. Scheurer S, Son DY, Boehm M, Karamloo F, Franke S, Hoffmann A, et al. Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol* 1999;36:155–67.
116. Reese G, Viebranz J, Leong-Kee SM, Plante M, Lauer I, Randow S, et al. Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *J Immunol* 2005;175:8354–64.
117. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350–4.
118. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557–80.
119. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
120. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.



## Literaturverzeichnis

121. Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988;9:28–32.
122. Johnson WC. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 1990;7:205–14.
123. Peitsch MC. Protein Modeling by E-mail. *Biotechnology* 1995;13:658–60.
124. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology. *Bioinformatics* 2006;
125. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D387–92.
126. Siraganian RP, McGivney A, Barsumian EL, Crews FT, Hirata F, Axelrod J. Variants of the rat basophilic leukemia cell line for the study of histamine release. *Fed Proc* 1982;41:30–4.
127. Kaul S, Scheurer S, Danz N, Schicktanz S, Vieths S, Hoffmann A. Monoclonal IgE antibodies against birch pollen allergens: novel tools for biological characterization and standardization of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1262–8.
128. Vrtala S, Hirtenlehner K, Susani M, Akdis M, Kussebi F, Akdis CA, et al. Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. *FASEB J* 2001;15:2045–7.
129. van Hage-Hamsten M, Johansson E, Roquet A, Peterson C, Andersson M, Greiff L, et al. Nasal challenges with recombinant derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1 induce fewer symptoms and lower mediator release than rBet v 1 wild-type in patients with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1448–53.
130. Smith MC, Furman TC, Ingolia TD, Pidgeon C. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *J Biol Chem* 1988;263:7211–5.
131. Luttkopf D, Ballmer-Weber BK, Wuthrich B, Vieths S. Celery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:390–9.
132. Schöll I, Kalkura N, Shedziankova Y, Bergmann A, Verdino P, Knittelfelder R, et al. Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice. *J Immunol* 2005;175:6645–50.

133. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int* 2015;64:332–43.
134. Brahms S, Brahms J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* 1980;138:149–78.
135. Bollen MA, Garcia A, Cordewener JH, Wichers HJ, Helsper JP, Savelkoul HF, et al. Purification and characterization of natural Bet v 1 from birch pollen and related allergens from carrot and celery. *MolNutrFood Res* 2007;51:1527–36.
136. Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Hoffmann-Sommergruber K, Fischer GF, Ebner C. Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *EurJImmunol* 2003;33:3303–10.
137. Wiche R, Gubesch M, König H, Fotisch K, Hoffmann A, Wangorsch A, et al. Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen. *BiochemJ* 2005;385:319–27.
138. Hecker J, Diethers A, Schulz D, Sabri A, Plum M, Michel Y, et al. An IgE epitope of Bet v 1 and fagales PR10 proteins as defined by a human monoclonal IgE. *Allergy* 2012;67:1530–7.
139. Berkner H, Seutter von Loetzen C, Hartl M, Randow S, Gubesch M, Vogel L, et al. Enlarging the toolbox for allergen epitope definition with an allergen-type model protein. *PLoS One* 2014;9:e111691.
140. Husslik F, Hanschmann K-M, Krämer A, Seutter von Loetzen C, Schweimer K, Bellinghausen I, et al. Folded or Not? Tracking Bet v 1 Conformation in Recombinant Allergen Preparations. *PLoS One* 2015;10:e0132956.
141. Bannon GA. What makes a food protein an allergen? *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4:43–6.
142. Bannon GA, Ogawa T. Evaluation of available IgE-binding epitope data and its utility in bioinformatics. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:638–44.
143. Albrecht M, Kühne Y, Ballmer-Weber BK, Becker W-M, Holzhauser T, Lauer I, et al. Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:328–36, 336.e1–6.
144. Dall'antonia F, Pavkov-Keller T, Zangger K, Keller W. Structure of allergens and structure based epitope predictions. *Methods* 2014;66:3–21.

## Literaturverzeichnis

145. Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ, et al. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J* 1998;12:231–42.
146. Gafvelin G, Thunberg S, Kronqvist M, Grönlund H, Grönneberg R, Troye-Blomberg M, et al. Cytokine and antibody responses in birch-pollen-allergic patients treated with genetically modified derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:59–66.
147. Linhart B, Valenta R. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine* 2012;30:4328–35.
148. Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, et al. Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. *J Immunol* 2004;173:5258–67.
149. Ma Y, Gadermaier G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, et al. Mutational analysis of amino acid positions crucial for IgE-binding epitopes of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:53–62.
150. Reese G, Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Randow S, Vieths S. Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: Destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2007;
151. Focke-Tejkl M, Weber M, Niespodziana K, Neubauer A, Huber H, Henning R, et al. Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1207–7.e1–11.
152. Niederberger V, Marth K, Eckl-Dorna J, Focke-Tejkl M, Weber M, Hemmer W, et al. Skin test evaluation of a novel peptide carrier-based vaccine, BM32, in grass pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1101–3.e8.
153. Mittag D, Batori V, Neudecker P, Wiche R, Friis EP, Ballmer-Weber BK, et al. A novel approach for investigation of specific and cross-reactive IgE epitopes on Bet v 1 and homologous food allergens in individual patients. *Mol Immunol* 2006;43:268–78.
154. Vrtala S, Ball T, Spitzauer S, Pandjaitan B, Suphioglu C, Knox B, et al. Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation. *J Immunol* 1998;160:6137–44.

## Literaturverzeichnis

155. Pichler U, Hauser M, Hofer H, Himly M, Hoflehner E, Steiner M, et al. Allergen hybrids - next generation vaccines for Fagales pollen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2014;44:438-49.
156. Burggraf M, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Ilchmann A, Pemberton AD, Kiyono H, et al. Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse model of food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:1475-83.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurereste
b-ME	beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare (engl. „basepairs“)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. „bovine serum albumin“)
CCD	kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (engl. „cross-reactive carbohydrate determinants“)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „deoxyribonucleic acid“)
DBPCFC	doppelt verblindete Placebo kontrollierte Nahrungsmittelprovokation (engl. „double blind placebo controlled food challenge“)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (engl. „deoxyribonucleotidetriphosphates“)
EAST	Enzymkonjugierter Allergo-Sorbent-Test
ELISA	Enzymkonjugierter Immun-Sorbent-Test (engl. „enzyme linked immunosorbent assay“)
His-Tag	Histidin-Anhang
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. „horseradish peroxidase“)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPTG	Isopropylthiogalaktosidase
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus Amöbocyten Lysat
MW	Molekulargewicht
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (engl. „nitrilotriacetic acid“)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. „nuclear magnetic resonance spectroscopy“)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. „polymerase chain reaction“)
PDB-ID	Protein-Datenbank-Identifikationsnummer ( <a href="http://www.pdb.org">www.pdb.org</a> )

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. „phosphate buffered saline“)
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
RBL	Ratten basophile Leukämiezelllinie (engl. „rat basophilic leukemia cellline“)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. „ribonucleic acid“)
mRNA	Boten-RNA (engl. „messenger RNA“)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. „sodium dodecyl sulfate“)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Pufferlösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF	Tumornekrosefaktor
w/v	Gewichtseinheit pro Volumen (engl. „weight per volume“)

## 9.2 Sequenzen und Plasmidkarten

### 9.2.1 Sequenzen

```

      M G V Q   T H V L   E L T S   S V S A   E K I F
1  ATGGGAGTGCAG ACACATGTGTTG GAGCTCACCTCC TCAGTCTCAGCT GAGAAAATATTC

      Q G F V   I D V D   T V L P   K A A P   G A Y K
61 CAGGGCTTTGTC ATTGATGTTGAC ACAGTCCTTCCC AAGGCTGCGCCT GGAGCTTACAAG

      S V E I   K G D G   G P G T   L K I I   T L P D
121 AGTGTGCGAAATC AAGGGAGATGGT GGACCTGGAACC CTCAAAATTATT ACTCTTCCCGAT

      G G P I   T T M T   L R I D   G V N K   E A L T
181 GGTGGCCCGATT ACCACAATGACC CTTAGAATTGAT GGAGTTAACAAG GAGGCATTGACA

      F D Y S   V I D G   D I L L   G F I E   S I E N
241 TTTGATTACAGC GTGATCGACGGA GACATCCTCTTG GGATTTATCGAA TCCATTGAAAAC

      H V V L   V P T A   D G G S   I C K T   T A I F
301 CATGTTGTACTA GTGCCAACTGCT GATGGAGGAAGC ATTTGCAAGACC ACTGCCATCTTT

      H T K G   D A V V   P E E N   I K Y A   N E Q N
361 CACACCAAAGGT GATGCTGTGGTT CCAGAAGAGAAT ATCAAGTATGCC AATGAGCAGAAC

      T A L F   K A L E   A Y L I   A N *
421 ACTGCTCTTTTC AAGGCTCTCGAG GCCTATCTCATC GCTAATTAA

```

Abb. 9.1: Sequenz von *Api g 1.01* (Acc. No. Z48967); die Positionen  $K^{44}$  und  $S^{111}$ , welche mutiert wurden, sind in rot kursiv dargestellt

```

      M G V Q   K T V V   E A P S   T V S A   E K M Y
1  ATGGGTGTCCAA AAGACCGTGGTT GAGGTCCTTCT ACCGTGTCTGCG GAGAAAATGTAT

      Q G F L   L D M D   T V F P   K V L P   Q L I K
61 CAGGGATTTCTC CTTGATATGGAC ACTGTTTTTCTT AAAGTTCTTCTC CAGCTTATCAAG

      S V E I   L E G D   G G V G   T V K L   V H L G
121 AGTGTGCGAAAT CTTGAGGGCGAT GGTGGCGTTGGA ACCGTCAAGCTC GTCCATCTTGGC

      E A T E   Y T T M   K Q K V   D V I D   K A G L
181 GAAGCTACTGAA TATACCACCATG AAGCAAAAGGTG GATGTGATTGAC AAGGCTGGATTG

      A Y T Y   T T I G   G D I L   V D V L   E S V V
241 GCTTACACTTAC ACCACCATCGGA GGCACATTTTGG GTGGACGTACTC GAGTCAGTGGTG

      N E F V   V V P T   D G G C   I V K N   T T I Y
301 AATGAATTCGTT GTTGTGCCAACC GACGGAGTTTGC ATAGTGAAGAAC ACCACCATTTAC

      N T K G   D A V L   P E D K   I K E A   T E K S
361 AACACCAAAGGC GACGCTGTGCTC CCCGAAGACAAG ATCAAGGAAGCT ACTGAGAAGTCT

      A L A F   K A V E   A Y L L   A N L Q   F L A *
421 GCTCTGGCCTTC AAAGCTGTTGAA GCTTACCTCCTA GCAAACCTGCAG TTTCTTGCTTGA

```

Abb. 9.2: Sequenz von *Api g 1.02* (Acc. No. Z75662); die Position  $C^{111}$ , welche mutiert wurde, ist in rot kursiv dargestellt

```

M G A Q S H S L E I T S S V S A E K I F
1 ATGGGTGCCAG AGCCATTCACCTC GAGATCACTTCT TCCGTCTCAGCA GAGAAAATATTC

S G I V L D V D T V I P K A A P G A Y K
61 AGCGCATTGTC CTTGATGTTGAT ACAGTTATCCCC AAGGCTGCCCCCT GGAGCTTACAAG

S V D V K G D G G A G T V R I I T L P E
121 AGTGTGCATGTT AAAGGAGATGGT GGAGCTGGGACC GTCAGAATTATC ACCCTTCCCGAA

G S P I T S M T V R T D A V N K E A L T
181 GGTAGCCCGATC ACCTCAATGACG GTTAGAACTGAT GCAGTCAACAAG GAGGCCTTGACA

Y D S T V I D G D I L L G F I E S I E T
241 TACGACTCCACC GTTATTGATGGA GACATCCTTTTA GGCTTCATCGAA TCCATTGAAACC

H L V V V P T A D G G S I T K T T A I F
301 CATCTTGTCTGTT GTGCCAACTGCT GATGGGGTAGC ATTACCAAGACC ACGGCCATATTC

H T K G D A V V P E E N I K F A D E Q N
361 CACACTAAAGGT GATGCCGTCGTT CCTGAAGAGAAC ATCAAGTTTGCC GATGAGCAGAAC

T A L F K A I E A Y L I A N *
421 ACTGCTCTTTTC AAGGCTATTGAG GCCTACCTCATT GCTAATTAA

```

Abb. 9.3: Sequenz von *Dau c 1.0104* (Acc. No. Z81362); die Position  $S^{11}$ , welche mutiert wurde, ist in rot kursiv dargestellt

```

M G V Q K T E V E A P S T V S A E K M Y
1 ATGGGTGTCCAA AAGACTGAGGTT GAGGTCCTTCC ACCGTGTCAGCA GAGAAAATGTAT

Q G F L L D M D T V F P K V L P Q L I K
61 CAGGGATTTCTC CTTGATATGGAC ACTGTTTTCCCC AAGGTTCTTCTC CAGCTTATCAAG

S V E I L E G D G G V G T V R L V H L G
121 AGTGTGCAGATT CTTGAGGGCGAT GGTGGTGTGGGA ACCGTGAGACTC GTCCATCTTGGC

E A T E Y T T M K Q K V D V I D K A G L
181 GAAGCAACTGAA TATACCACAATG AAGCAAAAGGTA GACGTAATCGAC AAGCCCGGATTA

G Y T Y T T I G G D I L V E G L E S V V
241 GGCTACACCTAC ACCACCATCGGA GGTGACATCCTC GTGGAAGGACTC GAATCCGTGGTG

N Q F V V V P T D G G C I V K N T T I Y
301 AATCAATTCGTT GTTGTGCCAACA GATGGAGGCTGC ATTGTGAAGAAC ACCACCATTTAC

N T K G D A V L P E D K V K E A T E K S
361 AACACCAAAGGC GATGCTGTGCTC CCCGAAGACAAG GTGAAGGAAGCC ACCGAAAAGTCT

A L A F K A V E A Y L L A N *
421 GCCCTGGCCTTC AAAGCTGTTGAG GCTTACCTCCTA GCAAATAA

```

Abb. 9.4: Sequenz von *Dau c 1.0201* (Acc. No. AF456481); die Position  $C^{11}$ , welche mutiert wurde, ist in rot kursiv dargestellt



## Anhang

---

```

M G A Q S H S L E I T S S V S A E K I F
1 ATGGGTGCCAG AGCCATTCACTC GAGATCACTTCT TCCGTCTCAGCA GAGAAAATATTC

S G I V L D V D T V I P K A A P G A Y K
61 AGCGGCATTGTC CTTGATGTTGAT ACAGTTATCCCC AAGGCTGCCCCCT GGAGCTTACAAG

S V D V K G D G G A G T V R I I T L P E
121 AGTGTGCATGTT AAAGGAGATGTT GGAGCTGGGACC GTCAGAATTATC ACCCTTCCCGAA

G S P I T S M T V R T D A V N K E A L T
181 GGTAGCCCGATC ACCTCAATGACG GTTAGAACTGAT GCAGTCAACAAG GAGGCCTTGACA

Y D S T V I D G D I L L G F I E S I E T
241 TACGACTCCACC GTTATTGATGGA GACATCCTTTTA GGCTTCATCGAA TCCATTGAAACC

H L V V V P T A D G G S I T K T T A I F
301 CATCTTGTGCGT GTGCCAACTGCT GATGGGGTAGC ATTACCAAGACC ACGGCCATATTC

H T K G D A V V P E E N I K F A D E Q N
361 CACACTAAAGGT GATGCCGTCGTT CCTGAAGAGAAC ATCAAGTTTGCC GATGAGCAGAAC

T A L F K A I E A Y L I A N G V Q K T E
421 ACTGCTCTTTTC AAGGCTATTGAG GCCTACCTCATT GCTAATGGTGTG CAAAAGACTGAG

V E A P S T V S A E K M Y Q G F L L D M
481 GTTGAGGCTCCT TCCACCGTGTC GCAGAGAAAATG TATCAGGGATTT CTCCTTGATATG

D T V F P K V L P Q L I K S V E I L E G
541 GACACTGTTTTTC CCAAGGTTCTT CCTCAGCTTATC AAGAGTGTGCGAG ATTCTTGAGGGC

D G G V G T V R L V H L G E A T E Y T T
601 GATGGTGGTGTG GGAACCGTCAGA CTCGTCCATCTT GCGAAGCAACT GAATATAACCACA

M K Q K V D V I D K A G L G Y T Y T T I
661 ATGAAGCAAAAAG GTAGACGTAATC GACAAGGCCGGA TTAGGCTACACC TACACCACCATC

G G D I L V E G L E S V V N Q F V V V P
721 GGAGGTGACATC CTCGTGGAAGGA CTCGAATCCGTG GTGAATCAATTC GTTGTGTGCCA

T D G G C I V K N T T I Y N T K G D A V
781 ACAGATGGAGGC TGCATTGTGAAG AACACCACCATT TACAACACCAA GCGATGCTGTG

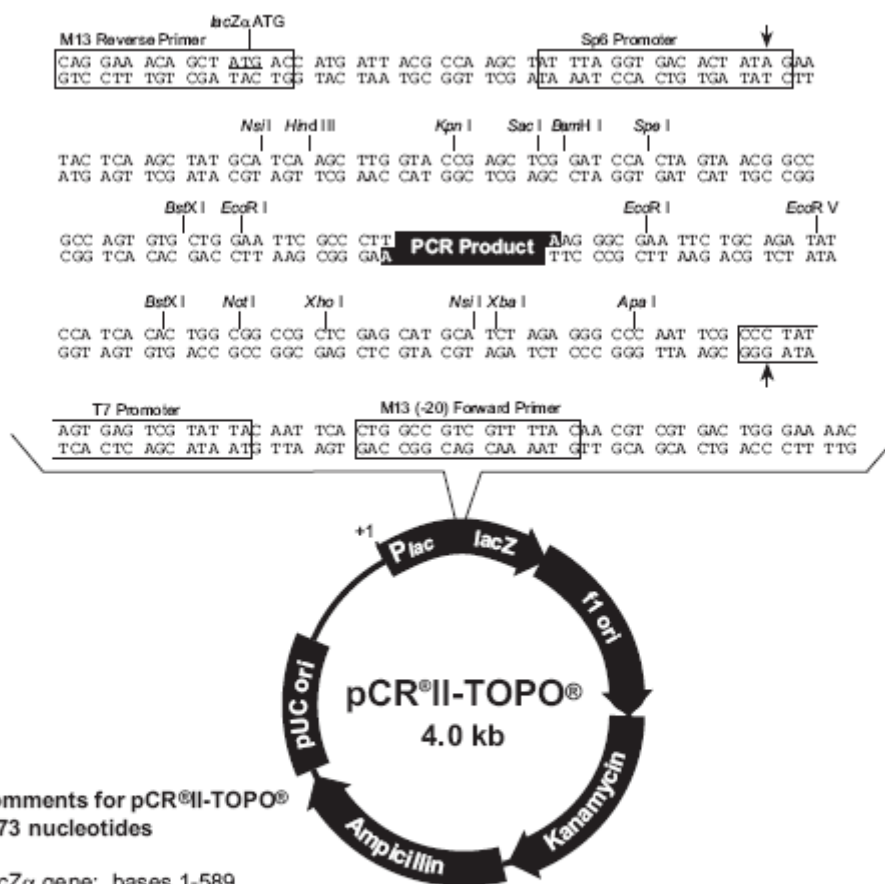
L P E D K V K E A T E K S A L A F K A V
841 CTCCCCGAAGAC AAGGTGAAGGAA GCCACGAAAAG TCTGCCCTGGCC TTCAAAGCTGTT

E A Y L L A N *
901 GAGGCTTACCTC CTAGCAAATAA

```

Abb. 9.5: Sequenz von *Dau c 1 FP*; in schwarz die Sequenz von *Dau c 1.01*, in blau die von *Dau c 1.02*; die Positionen  $S^{111}$  und  $C^{111}$ , welche mutiert wurden, sind in rot kursiv dargestellt.

## 9.2.2 Plasmidkarten



Comments for pCR®II-TOPO®  
3973 nucleotides

- LacZα gene: bases 1-589
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-383
- T7 promoter: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- f1 origin: bases 590-1027
- Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
- Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
- pUC origin: bases 3178-3851

Abb. 9.6 Plasmidkarte und Sequenz des Klonierungsabschnitts von pCR®II-TOPO®

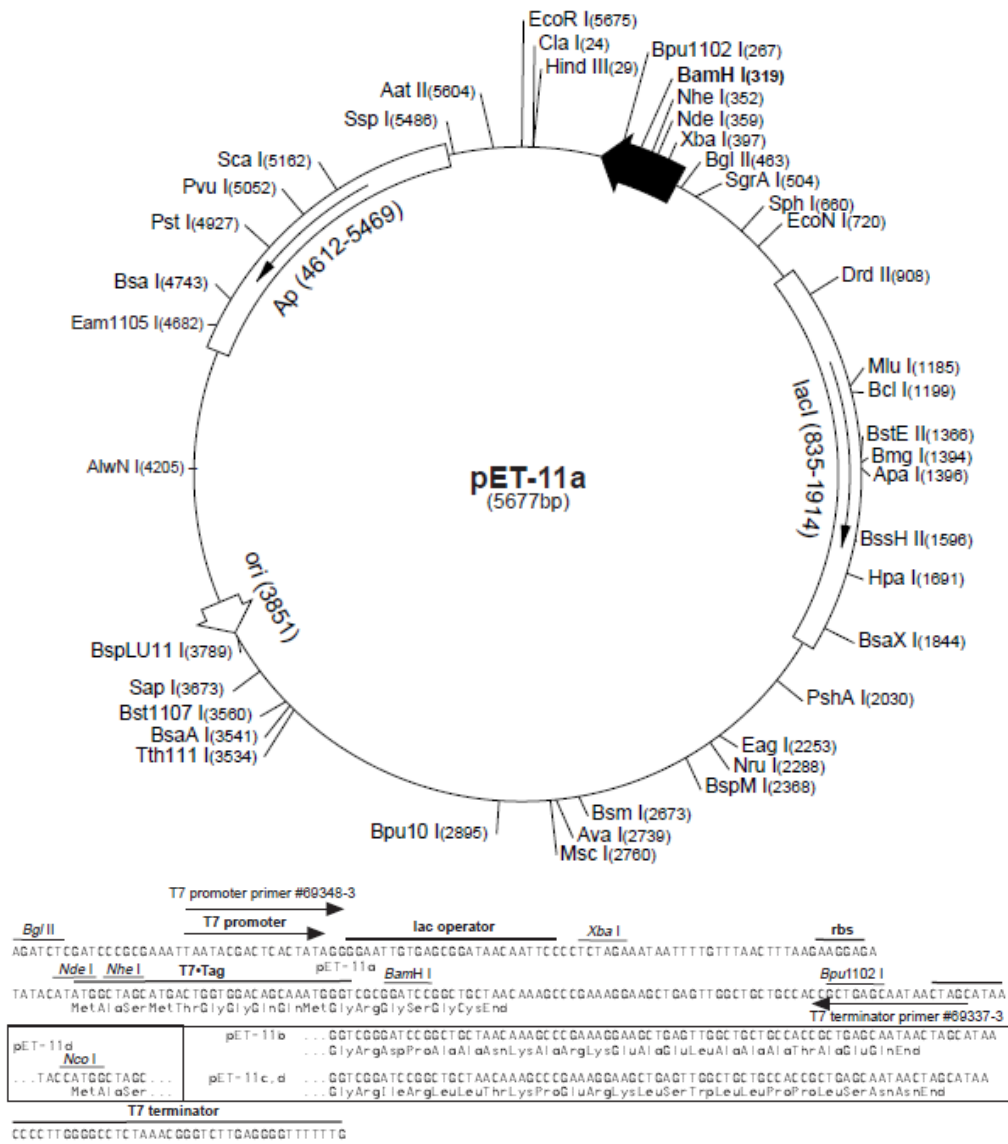


Abb. 9.7 Plasmidkarte und Sequenz des Klonierungsabschnitts von pET11a.



### 9.3 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Dingermann für die Übernahme der externen Betreuung und der Unterstützung bei der Anerkennung als Doktorandin an der Uni Frankfurt bedanken.

Herrn Prof. Dr. Vieths danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und dass er mir die Anfertigung der Arbeit im PEI ermöglicht hat. Er war jederzeit bereit mich auf dem Abenteuer Promotion zu unterstützen und ich freue mich, dass ich auch nach fast 20 Jahren unter seiner Federführung noch immer viel Spaß an meiner Arbeit im PEI habe.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Gerald Reese, der stets an mich geglaubt hat und unter dessen Anleitung ich die Scheu vor der für diese Arbeit notwendigen Arbeit mit Tieren verloren habe. Ich denke auch heute noch oft an die vielen langen sehr fruchtbaren Gespräche an der Straßenecke nach einem Biergartenbesuch.

Frau Prof. Dr. Ballmer-Weber möchte ich ganz herzlich für die Bereitstellung der Patientenseren danken. Ich kann sehr gut erahnen, wie viel Arbeit es bedeutet Patienten immer wieder zur Blutspende zu ermuntern und erst recht auch die DBP-kontrollierten Nahrungsmittelprovokationen sind sehr zeitaufwendig, sowohl für Arzt, Arzthelfer und Patient. Deshalb möchte ich auch ein großes Dankeschön an all die bereitwilligen Allergiker sagen, die diese Prozedur über sich haben ergehen lassen.

Prof. Dr. Paul Rösch danke ich für die Überlassung des rekombinanten Api g 1.01 und Dr. Jonas Lidholm für die Bereitstellung von Api g 1.02, ohne die ich sicher an der Expression der Proteine verzweifelt wäre.

Bei Dr. Thomas Holzhauser bedanke ich mich für die Betreuung des Sellerie-Teils dieser Arbeit, der Hilfe bei Problemen praktischer und theoretischer Art und die Hilfe beim Schreiben meiner ersten Veröffentlichung.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Dr. Christian Schörner, ohne den das ganze Abenteuer überhaupt nicht stattgefunden hätte. Ich gebe zu ab und zu habe ich

Dich verflucht, wenn ich wieder mal meine heilige Freizeit für das „Pamphlet“ opfern musste. Aber jetzt bin ich Dir unendlich dankbar!

Ebenso dankbar bin ich Dr. Stephan Scheurer, der mich immer wieder angetrieben hat und sich die Zeit genommen hat die Arbeit zu korrigieren, obwohl er nicht in die eigentliche Betreuung involviert war.

Stefanie „Steffi“ Randow gilt ein ganz besonders großer Dank und ich kann mich glücklich schätzen, dass ich mit ihr zusammen die vielen Release- und ELISA-Tests durchführen konnte. Ich habe dabei so viel gelernt!! Ohne ihre Unterstützung wäre ich im Platten-Chaos sicherlich untergegangen. Nebenbei hatte sie, ebenso wie Maren Krause, auch bei allen anderen Problemen, ob beruflicher oder privater Art, stets ein offenes Ohr für mich und ich freue mich sehr, dass wir über unserer Arbeit zu richtig guten Freundinnen geworden sind (der nächste Zumba-Kurs ist unserer).

Dankeschön auch an Anne-Regine Lorenz, die mir stets mit vielen Tips, Rat und Tat zur Seite stand, sich die Zeit genommen hat die Arbeit zu lesen und durch jede Menge hilfreiche Kommentare einen großen Anteil zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat. Eine dicke Umarmung dafür: „Anne Du wirst Dein großes Ziel erreichen!“

Ganz lieben Dank auch an Anna Engin, Annette Jamin, Iris Lauer, Maren Krause, Melanie Albrecht, Michaela Gubesch, Sonja Wolfheimer und Steffi Randow für die tolle Zeit zusammen und die vielen schönen Aktivitäten auch außerhalb des PEIs.

Ein großer Dank geht natürlich auch an alle anderen Laborkollegen der Allergologie und VPr1, den Laborhelferinnen, Tierpflegern und anderen Mitarbeitern im PEI, die alle aufzuzählen den Rahmen hier sprengen würde...

„Last but not least“ geht der größte Dank an meine Familie und Stefan(s). Ohne Euch hätte ich das Projekt Promotion sicher nie beendet. Jetzt trinken wir ein großes Glas darauf, dass dies hoffentlich der letzte geschriebene Satz sein wird...

#### **9.4 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden.

Messel, den 22.02.2017

Andrea Wangorsch

## 9.5 Publikationen und Präsentationen

### Artikel in Fachzeitschriften:

**Wangorsch A**, Larsson H, Messmer M, García-Moral A, Lauer I, Wolfheimer S, Schülke S, Bartra J, Vieths S, Lidholm J, Scheurer S.; Molecular cloning of plane pollen allergen Pla a 3 and its utility as diagnostic marker for peach associated plane pollen allergy. *Clin Exp Allergy*. 2016 May;46(5):764-74.

Siebeneicher S, Reuter S, **Wangorsch A**, Krause M, Foetisch K, Heinz A, Naito S, Reuter A, Taube C, Vieths S, Scheurer S, Toda M.; Epicutaneous immunotherapy with a hypoallergenic Bet v 1 suppresses allergic asthma in a murine model. *Allergy*. 2015 Dec;70(12):1559-68.

**Wangorsch A**, Jamin A, Foetisch K, Malczyk A, Reuter A, Vierecke S, Schülke S, Bartel D, Mahler V, Lidholm J, Vieths S, Scheurer S.; Identification of Sola l 4 as Bet v 1 homologous pathogenesis related-10 allergen in tomato fruits. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Mar;59(3):582-92.

Siebeneicher S, Reuter S, Krause M, **Wangorsch A**, Maxeiner J, Wolfheimer S, Schülke S, Naito S, Heinz A, Taube C, Vieths S, Scheurer S, Toda M.; Epicutaneous immune modulation with Bet v 1 plus R848 suppresses allergic asthma in a murine model. *Allergy*. 2014 Mar;69(3):328-37.

Schülke S, Wolfheimer S, Gadermaier G, **Wangorsch A**, Siebeneicher S, Briza P, Spreitzer I, Schiller D, Loeschner B, Uematsu S, Ryffel B, Akira S, Waibler Z, Vieths S, Toda M, Scheurer S.; Prevention of intestinal allergy in mice by rflaA:Ova is associated with enforced antigen processing and TLR5-dependent IL-10 secretion by mDC. *PLoS One*. 2014 Feb 7;9(2)

Bohnen C, **Wangorsch A**, Schülke S, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Burggraf M, Süzer Y, Schwantes A, Sutter G, Waibler Z, Reese G, Toda M, Scheurer S, Vieths S.; Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara prevents the onset of intestinal allergy in mice. *Allergy*. 2013 Aug;68(8):1021-8.

Micheal S, **Wangorsch A**, Wolfheimer S, Foetisch K, Minhas K, Scheurer S, Ahmed A.; Immunoglobulin E reactivity and allergenic potency of *Morus papyrifera* (paper mulberry) pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(3):168-75.

**Wangorsch A**, Weigand D, Peters S, Mahler V, Fötisch K, Reuter A, Imani J, Dewitt AM, Kogel KH, Lidholm J, Vieths S, Scheurer S.; Identification of a Dau c PRPlike protein (Dau c 1.03) as a new allergenic isoform in carrots (cultivar Rodelika). *Clin Exp Allergy*. 2012 Jan;42(1):156-66.

Schülke S, Burggraf M, Waibler Z, **Wangorsch A**, Wolfheimer S, Kalinke U, Vieths S, Toda M, Scheurer S.; A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Dec;128(6):1340-1348.



Sancho AI, **Wangorsch A**, Jensen BM, Watson A, Alexeev Y, Johnson PE, Mackie AR, Neubauer A, Reese G, Ballmer-Weber B, Hoffmann-Sommergruber K, Skov PS, Vieths S, Mills EN.; Responsiveness of the major birch allergen Bet v 1 scaffold to the gastric environment: impact on structure and allergenic activity. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Nov;55(11):1690-9.

Bauermeister K, **Wangorsch A**, Garoffo LP, Reuter A, Conti A, Taylor SL, Lidholm J, Dewitt AM, Enrique E, Vieths S, Holzhauser T, Ballmer-Weber B, Reese G.; Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp Crangon crangon. *Mol Immunol*. 2011 Sep;48(15-16):1983-92.

Albrecht M, Kühne Y, Ballmer-Weber BK, Becker WM, Holzhauser T, Lauer I, Reuter A, Randow S, Falk S, **Wangorsch A**, Lidholm J, Reese G, Vieths S.; Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Aug;124(2):328-36, 336.e1-6.

Reese G, Ballmer-Weber BK, **Wangorsch A**, Randow S, Vieths S.; Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):944-51.

**Wangorsch A**, Ballmer-Weber BK, Rösch P, Holzhauser T, Vieths S.; Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen. *Mol Immunol*. 2007 Apr;44(10):2518-27.

Ballmer-Weber BK, **Wangorsch A**, Bohle B, Kaul S, Kündig T, Fötisch K, van Ree R, Vieths S.; Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin Exp Allergy*. 2005 Jul;35(7):970-8.

Wiche R, Gubesch M, König H, Fötisch K, Hoffmann A, **Wangorsch A**, Scheurer S, Vieths S.; Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen. *Biochem J*. 2005 Jan 1;385(Pt 1):319-27.

Gruber P, Vieths S, **Wangorsch A**, Nerkamp J, Hofmann T.; Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J Agric Food Chem*. 2004 Jun 16;52(12):4002-7.

Neudecker P, Lehmann K, Nerkamp J, Haase T, **Wangorsch A**, Fötisch K, Hoffmann S, Rösch P, Vieths S, Scheurer S.; Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *Biochem J*. 2003 Nov 15;376(Pt 1):97-107.

Ballmer-Weber BK, **Wangorsch A**, Scheurer S.; Recombinant food allergens in the diagnosis of pollen-related food allergy. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 2003;(94):192-6; discussion 197.

Reindl J, Rihs HP, Scheurer S, **Wangorsch A**, Haustein D, Vieths S.; IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 Jun;128(2):105-14.

Ballmer-Weber BK, Hoffmann A, Wüthrich B, Lüttkopf D, Pompei C, **Wangorsch A**, Kästner M, Vieths S.; Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Allergy.* 2002 Mar;57(3):228-35.

Kleine-Tebbe J, **Wangorsch A**, Vogel L, Crowell DN, Haustein UF, Vieths S.; Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Nov;110(5):797-804.

Karamloo F, **Wangorsch A**, Kasahara H, Davin LB, Haustein D, Lewis NG, Vieths S.; Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Eur J Biochem.* 2001 Oct;268(20):5310-20.

Ballmer-Weber BK, Wüthrich B, **Wangorsch A**, Fötisch K, Altmann F, Vieths S.; Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Aug;108(2):301-7.

Scheurer S, **Wangorsch A**, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wüthrich B, Haustein D, Vieths S.; Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 May 25;756(1-2):315-25.

Karamloo F, Scheurer S, **Wangorsch A**, May S, Haustein D, Vieths S.; Pyr c 1, the major allergen from pear (*Pyrus communis*), is a new member of the Bet v 1 allergen family. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 May 25;756(1-2):281-93.

Scheurer S, Pastorello EA, **Wangorsch A**, Kästner M, Haustein D, Vieths S.; Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Apr;107(4):724-31.

Vieths S, Scheurer S, Reindl J, Lüttkopf D, **Wangorsch A**, Kästner M, Haase T, Haustein D.; Optimized allergen extracts and recombinant allergens in diagnostic applications. *Allergy.* 2001;56 Suppl 67:78-82.

Scheurer S, **Wangorsch A**, Haustein D, Vieths S.; Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clin Exp Allergy.* 2000 Jul;30(7):962-71.

Präsentationen auf nationalen und internationalen Kongressen:

- März 2006: 18. Mainzer Allergie-Workshop der DGAKI, Mainz (Vortrag): Eitopanalyse des Hauptallergens aus Sellerie, Api g 1, mit Seren von im DBPCFC bestätigten Sellerieallergikern.
- Juni 2007: EAACI Kongress, Göteborg (Poster Präsentation): Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen.
- April 2008: ISMA-EAACI Kongress, Salzburg (Poster Präsentation): Oligomeric mutants of the carrot allergen Dau c 1 show strong antigenicity and reduced allergenicity.
- Juni 2010: EAACI Kongress, London (Poster Diskussion): Identification of a Dau c PRlike protein as new IgE binding isoform in carrot allergy.
- März 2011: 23. Mainzer Allergie-Workshop der DGAKI, Mainz (Vortrag): Identification of a Dau c PRlike protein (Dau c 1.03) as new allergenic isoform in carrots (cultivar Rodelika).
- Feb. 2013: FAAM-EAACI Kongress, Nizza (Vortrag): Vaccination with Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Prevents the Onset of Intestinal Allergy in Mice.
- März 2013: 25. Mainzer Allergie-Workshop der DGAKI, Mainz (Vortrag): Identification and characterization of Lyc e 4, a Bet v 1 homologous PR-10 protein, in tomato fruits.
- Dez. 2013: ISMA-EAACI Kongress, Wien (Vortrag): LTP cross-reactivity – primary sensitization to mugwort pollen LTP, Art v 3, facilitates subsequent sensitization to peach LTP, Pru p 3, in mice.
- März 2014: 26. Mainzer Allergie-Workshop der DGAKI, Mainz (Vortrag): LTP cross-reactivity – primary sensitization to mugwort pollen LTP, Art v 3, facilitates subsequent sensitization to peach LTP, Pru p 3, in mice.
- März 2015: 27. Mainzer Allergie-Workshop der DGAKI, Mainz (Vortrag): Molecular characterization of the allergenic non-specific Lipid Transfer Protein Pla a 3 from plane tree pollen.
- Juni 2015: EAACI Kongress, Barcelona (Vortrag): Molecular characterization of the allergenic non-specific Lipid Transfer Protein Pla a 3 from plane tree pollen.
- Juni 2016: EAACI Kongress, Wien (Poster Diskussion): Utilization of Recombinant Periplaneta americana Allergens for Component Resolved Diagnosis of Cockroach Allergy.
- Okt. 2016: FAAM-EAACI Kongress, Rom (Poster Diskussion): Identification and implication of allergenic PR10 protein from walnut in birch pollen associated walnut allergy.

## 9.6 Lebenslauf

### Andrea Wangorsch

Willy-Mößle-Str. 2  
64409 Messel

**Geburtsdatum:** 14.01.1970

**Nationalität:** deutsch

**Geburtsort:** Mellrichstadt/Rhön

### Ausbildung

---

Juni 1989	Abitur Albert-Einstein Schule, Schwalbach Taunus
September 1998 - Februar 1994	Studium an der FH Darmstadt, Fachbereich Chemische Technologie, Schwerpunkt Biotechnologie
September 1993 – Februar 1994	Diplomarbeit bei Prof. Großmann Titel: „Untersuchungen zum Pasteur- und Crabtree-Effekt bei Weinhefen“ an der FH Darmstadt
Februar 1994	Studienabschluss als Diplom-Ingenieurin (FH)
Oktober 2005 – Juli 2007	Teilnahme an der Lehrveranstaltung „Anleitung zum selbständigen Arbeiten“, Universität Frankfurt (Prof. Dr. Vieths)
Sommersemester 2007	Teilnahme an der Vorlesung „Immunologische und Molekularbiologische Lebensmittelanalytik“, Universität Frankfurt (Prof. Dr. Vieths)
Juli 2007	Teilnahme am Praktikum „Immunologische und molekularbiologische Lebensmittelanalytik“, Universität Frankfurt, Paul-Ehrlich-Institut (Prof. Dr. Vieths)
Wintersemester 2007/2008	Teilnahme an der Vorlesung „Grundlagen der Lebensmittelchemie I“, Universität Frankfurt

Januar 2008	(Dr. Uwe Hener) Teilnahme am Blockseminar Infektionsbiologie – Immunologie, Universität Frankfurt (Prof. Dr. Tampé)
Sommersemester 2008	Teilnahme an der Vorlesung „Lebensmitteltechnologie II – Pflanzliche Lebensmittel“, Universität Frankfurt (Prof. Dr. von Rymon Lipinski)
Sommersemester 2008	Teilnahme an der Vorlesung „Immunologie – Impfstoffe und Seren“, Universität Frankfurt (Prof. Dr. Dingermann)
Seit Dezember 2008	Promotion am Paul-Ehrlich-Institut Langen, Abteilung Allergologie unter Prof. Vieths, Thema: „Strukturelle Modifikation der Hauptallergene aus Sellerie und Karotte zur Reduktion der allergenen Reaktivität und Verwendung als mögliche Immuntherapeutika“
Juli 2009	Teilnahme an FELASA-Kategorie B Versuchstierkunde, Universitätsmedizin Mainz (PD Dr. Kurt Reifenberg)

### **Beruflicher Werdegang**

---

März 1994 – Dez. 1994	Sachbearbeiterin bei der Württembergischen und Badischen Versicherungs AG, Frankfurt
Jan. 1995 – Juli 1995	Angestellte bei der Fresenius AG, Bad Homburg
Aug. 1995 – Dez. 1998	Angestellte am Paul-Ehrlich-Institut in der Abteilung HIV-Forschung
seit Januar 1999 – heute	wissenschaftliche Angestellte am Paul-Ehrlich- Institut in der Abteilung molekulare Allergologie