

**Charakterisierung ausgewählter Allergene aus Solanaceen  
und Untersuchungen zur Allergenität von Lebensmitteln nach  
Suppression der Allergene mittels " RNA Interferenz"**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Dipl.-Oecotroph.  
**Marion Yvonne Lorenz**  
aus Hürth-Hermülheim

Frankfurt, 2007  
(D 030)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. S. Vieths

Prof. Dr. A. Mosandl

Datum der Disputation: 27.06.2007

## Gliederung

### I Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Allergische Erkrankungen - eine Einführung .....	1
1.1.1	Die IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I) .....	1
1.2	Nahrungsmittelallergien und -allergene .....	2
1.2.1	Diagnose .....	3
1.2.1.1	Anamnese .....	3
1.2.1.2	Hauttest .....	4
1.2.1.3	<i>In vitro</i> Diagnostik .....	4
1.2.1.4	Provokationen mit dem allergieauslösenden Nahrungsmittel .....	4
1.2.2	Therapie der Nahrungsmittelallergie .....	5
1.2.3	Tomatenallergien .....	6
1.2.3.1	IgE-bindende Glykoproteine in der Tomate .....	6
1.2.3.2	Lyc e 1 (Tomatenprofilin) .....	7
1.2.3.3	Nicht spezifisches Lipid Transfer Protein (nsLTP) der Tomate .....	7
1.2.3.4	Weitere potentielle Tomatenallergene .....	8
1.2.3.5	Die Beteiligung der Tomate an Kreuzallergien .....	8
1.3	Veränderung des allergenen Potentials pflanzlicher Lebensmittel .....	10
1.3.1	Der Einfluss der lebensmitteltechnologischen Behandlung .....	10
1.3.2	Der Einfluss von Modifikationen .....	11
1.3.2.1	Beispiele für gentechnische Veränderungen zur Reduktion der Allergenität .....	12
1.3.2.2	Gezielte Hemmung der Allergenexpression in pflanzlichen Lebensmitteln durch die RNAi-Methode .....	13
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	15
<b>3.</b>	<b>Material</b> .....	16
3.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte .....	16
3.2	Primer .....	16
3.2.1	Primer zur Klonierung von Protein-cDNA .....	16
3.2.2	Primer für die Kolonie-PCR und zur Sequenzierung .....	17
3.3	Pufferlösungen, Nährmedien und Nährböden .....	18
3.4	Seren und Antikörper .....	18
3.4.1	Primärantikörper .....	18
3.4.1.1	Patientenseren .....	18
3.4.1.2	Kaninchenseren .....	20
3.4.2	Sekundärantikörper .....	20
3.5	Bakterienstämme .....	20
3.6	Plasmide .....	21

<b>4. Methoden</b>	22
4.1 Klonierung und Expression von Protein-cDNA	22
4.1.1 PCR	22
4.1.2 Reinigung der PCR Produkte	23
4.1.3 Restriktionsverdau	23
4.1.4 Ligation von cDNA in Klonierungs- und Expressionsvektoren	24
4.1.4.1 TOPO Vektoren	24
4.1.4.2 pET-32a und pGEX-6P-1	24
4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	24
4.1.6 Transformation von Bakterien	25
4.1.7 Selektion der transformierten Bakterien	25
4.1.7.1 Blau-weiß Selektion	25
4.1.7.2 Kolonie PCR	26
4.1.8 Plasmidisolierung	26
4.1.9 DNA-Sequenzierung	26
4.1.10 Proteinexpression und über Nacht Kultur für die Plasmidpräparation	26
4.1.11 Aufschluss von <i>E.coli</i> Zellen	27
4.1.11.1 Nativer Aufschluss	27
4.1.11.2 Denaturierender Aufschluss	27
4.1.11.3 Aufschluss mit Hilfe von Ultraschall	27
4.1.11.3.1 Nativ	27
4.1.11.3.2 Denaturierend	28
4.2 Proteinchemische und immunchemische Methoden	28
4.2.1 Proteinextraktionen aus der Tomatenfrucht	28
4.2.1.1 Tieftemperatur-Methode	28
4.2.1.2 Extraktion mittels PBS	28
4.2.1.3 „Direkt Extraktion“ mittels SDS-Probenpuffer	29
4.2.1.4 Proteinextraktion für die chromatographische Reinigung von nLyc e 3	29
4.2.1.5 Proteinextraktionen für die zweidimensionale Gelelektrophorese	29
4.2.1.5.1 Phenolextraktion	30
4.2.1.5.2 TCA und TCB	30
4.2.2 Proteinreinigung	31
4.2.2.1 Präperative SDS-PAGE	31
4.2.2.2 Reinigung über FPLC	31
4.2.2.2.1 Kationenaustauschchromatographie	32
4.2.2.2.2 Größenausschlusschromatographie	32
4.2.2.3 Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographie	33
4.2.2.4 Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie	33
4.2.3 Proteolytischer Verdau	34
4.2.4 Auftrennung von Proteingemischen	35
4.2.4.1 Eindimensionale SDS-PAGE	35

4.2.4.1.1	Tris-Glycin Gele nach Laemmli .....	36
4.2.4.1.2	Tris-Tricin Gele nach Schägger und v. Jagow .....	36
4.2.4.1.3	Probenaufbereitung .....	36
4.2.4.2	Zweidimensionale SDS-PAGE .....	37
4.2.4.2.1	Isoelektrische Fokussierung .....	37
4.2.4.2.2	Auftrennung nach Molekulargewicht .....	38
4.2.5	Färbungen von SDS-Gelen .....	39
4.2.5.1	Coomassieblau Färbung .....	39
4.2.5.2	Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick .....	39
4.2.6	Western Blotting .....	40
4.2.6.1	Proteintransfer auf Nitrocellulose oder PVDF Membran mittels „semi-dry blotting“ .....	40
4.2.6.2	Proteinfärbung mittels PonceauS .....	40
4.2.6.3	Immunoblotting und Immunoblot-Inhibition (Detektion) .....	40
4.2.7	ELISA und ELISA-Inhibition .....	41
4.2.7.1	ELISA .....	41
4.2.7.2	Dosisabhängige ELISA-Inhibition .....	42
4.2.8	Bestimmung des spezifischen IgE mittels CAP-FEIA .....	42
4.2.9	Spektroskopische Verfahren .....	43
4.2.9.1	Bestimmung der Bakteriendichte .....	43
4.2.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	43
4.2.9.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	43
4.2.9.4	CD-Spektroskopie .....	44
4.2.10	Basophiler Histamin Freisetzungstest .....	44
4.2.11	Reduktion und Alkylierung von Proteinen .....	46
4.2.12	N-terminale Sequenzierung .....	46
4.2.13	Nano-HPLC-nano ESI-MS/MS .....	46
4.2.14	Hauttest .....	47
4.3	Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen mit Hilfe der RNAi-Methode .....	47
4.3.1	Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen .....	47
4.3.2	Konstruktion des RNAi-Vektors .....	48
4.3.2.1	Lyc e 1 RNAi .....	48
4.3.2.2	Lyc e 3 RNAi .....	48
4.3.3	Transformation der Pflanzen .....	49
4.3.4	Erzeugung von transgenen Tomatenfrüchten der Tochtergeneration .....	49
4.3.5	RNA Isolation und Northern Blotting .....	49
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
5.1	Charakterisierung der Patientengruppe .....	50
5.2	Prävalenz der IgE-Sensibilisierung gegen Lyc e 1, Lyc e 2 und das 9 kDa-Protein .....	51
5.3	Identifikation und Charakterisierung des 9 kDa-Proteins aus der Tomate .....	52

5.3.1	Generelle Untersuchungen .....	52
5.3.1.1	Optimierung der Anreicherung des 9 kDa-Proteins in Tomatenschalenextrakt ...	52
5.3.1.2	Reinigung des 9 kDa-Proteins aus Tomatenschalenextrakt .....	53
5.3.1.2.1	Präparative SDS-PAGE .....	53
5.3.1.2.2	Chromatographische Auftrennung .....	54
5.3.1.3	Strukturelle Untersuchung des 9 kDa-Proteins .....	55
5.3.1.3.1	CD-Spektroskopie .....	55
5.3.1.3.2	N-terminale Sequenzierung .....	56
5.3.1.4	Benennung des 9 kDa-Proteins als Tomatenallergen Lyc e 3 .....	56
5.3.1.5	Untersuchung der Stabilität von nLyc e 3 nach Verdau mit Pepsin von Tomatenschalenextrakt und in prozessierten Tomaten .....	57
5.3.1.6	Untersuchung der Strukturabhängigkeit der IgE-bindenden Epitope von nLyc e 3 .....	58
5.3.2	Identifikation und Charakterisierung von Lyc e 3 Isoformen .....	59
5.3.2.1	Klonierung der beiden Isoformen Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2 .....	59
5.3.2.1.1	pET100/D-TOPO® .....	59
5.3.2.1.2	pGEX-6P-1 .....	60
5.3.2.1.3	pET-32a .....	61
5.3.2.2	Expression und Reinigung der rekombinanten Isoformen .....	61
5.3.2.2.1	Optimierung der Aufschlusseffektivität .....	61
5.3.2.2.2	Reinigung der Fusionsproteine mittels Metallionen-Chelat- Affinitätschromatographie .....	62
5.3.2.3	Proteolytische Spaltungen mit EKMax und Thrombin .....	63
5.3.2.4	Herstellung der rekombinanten Isoformen im präparativen Maßstab .....	64
5.3.2.5	Strukturelle Untersuchungen der rLyc e 3 Isoformen .....	64
5.3.2.6	Herstellung von rLyc e 3 ohne Anhangssequenz am Beispiel von rLyc e 3.1 .....	65
5.3.2.6.1	Proteolytische Spaltungen mit dem Enzym PreScission™ Protease .....	65
5.3.2.6.2	Reinigung .....	66
5.3.2.6.3	Strukturelle Untersuchung .....	67
5.3.2.6.4	Weitere Versuche zur Expression rekombinanter Proteine ohne Anhangssequenz .....	68
5.3.3	Biochemische und immunologische Charakterisierung von rLyc e 3.1 und 3.2 sowie nLyc e 3 .....	69
5.3.3.1	Spezifische IgE-Konzentrationen im Serum .....	69
5.3.3.2	Optimale Serum- und Antigenverdünnung für Inhibitionstests .....	70
5.3.3.3	Vergleich der IgE-Bindungskapazität von rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 .....	70
5.3.3.4	Vergleich der IgE-Bindungskapazität von nLyc e 3 und rLyc e 3.2 .....	71
5.3.3.5	Vergleich der biologischen Aktivität im basophilen Histamin Freisetzungstest.....	72
5.3.4	Identifikation von nLyc e 3 Isoformen .....	74
5.3.4.1	Optimierung des Extraktionspuffers für die 2D GE .....	74
5.3.4.2	Vorarbeiten mit nPru p 3 .....	76

5.3.4.3	2D GE mit Lyc e 3 .....	77
5.3.4.4	Analyse von nLyc e 3 mittels nano-HPLC-nano ESI-MS/MS .....	79
5.4	Analyse der gentechnisch veränderten Pflanzen .....	80
5.4.1	Analyse der Lyc e 1 reduzierten Pflanzen .....	80
5.4.1.1	<i>In vitro</i> Analysen .....	80
5.4.1.2	<i>In vivo</i> Tests .....	82
5.4.1.3	Klonierung, Expression und immunologische Eigenschaften von Hefeprofilin.....	83
5.4.2.	Analyse der Lyc e 3 reduzierten Pflanzen .....	86
5.4.2.1	<i>In vitro</i> Analysen .....	86
5.4.2.2	<i>In vivo</i> Tests .....	88
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>89</b>
6.1	Das Sensibilisierungsmuster bei der Tomatenallergie .....	89
6.1.1	Prävalenz der IgE-Bindung an die bekannten Tomatenallergene .....	89
6.1.2	Eventuelle Beteiligung weiterer IgE-bindenden Proteine an der Tomatenallergie.....	90
6.1.3	Problematik bei der Diagnose der Tomatenallergie .....	90
6.1.4	Vergleich des Sensibilisierungsmusters der Tomatenallergiker aus Nord- und Südeuropa .....	91
6.2	Die Bedeutung von Lyc e 3 als Tomatenallergen .....	93
6.2.1	Identifikation und Sequenzvergleich mit anderen LTPs .....	93
6.2.2	Reinigung von nLyc e 3 .....	93
6.2.3	Charakterisierung und Stabilität bei der Verarbeitung .....	93
6.2.4	Untersuchung der Strukturabhängigkeit der IgE-bindenden Epitope .....	95
6.3	Relevanz von Lyc e 3 Isoformen .....	96
6.3.1	Identifikation von natürlichen Lyc e 3 Isoformen .....	96
6.3.2	Klonierung und Expression von Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2 .....	98
6.3.3	Charakterisierung der Isoformen rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 .....	101
6.4	Eignung der RNAi Methode zur stabilen Unterdrückung der Allergenexpression .....	103
6.4.1	Auswahl der Tomate sowie der beiden Zielallergene als Modell .....	103
6.4.2	Hemmung der Lyc e 1 Expression .....	104
6.4.3	Hemmung der Lyc e 3 Expression .....	106
6.4.4	Reduktion der allergenen Potenz pflanzlicher Nahrungsmittel durch die RNAi-Methode - Potential und Einschränkungen .....	107
6.4.5	Kommerzielle Bedeutung der gentechnisch veränderten Tomatenfrüchte .....	108
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>110</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>123</b>

<b>10.</b>	<b>Publikation und Präsentation der Ergebnisse .....</b>	<b>124</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>126</b>



**I Abkürzungsverzeichnis**

2D GE	zweidimensionale Gelelektrophorese
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Amb a	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (Traubenkraut)
Amp	Ampicillin
Api g	<i>Apium graveolus</i> (Sellerie)
APS	Amoniumpersulfat
APZ	antigenpräsentierende Zellen
Ara h	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)
Art v	<i>Artemisia vulgaris</i> (Beifuß)
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
Bet v	<i>Betula verrucosa</i> (gemeine Birke)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
Bra o	<i>Brassica oleracea</i> (Blumenkohl)
BSA	Bovines Serum Albumin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CAP-FEIA	Capture Fluoreszenz Enzym Immuno Assay
CCD	Cross-reactive Carbohydrate Determinants
CD	circular dichroism
CDP	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
Cit s	<i>Citrus sinensis</i> (Orange)
CmR	Chloramphenicol-Acyltransferase Gen
Co <sup>++</sup>	Kobalt
Cor a	<i>Corylus avellana</i> (Haselnuss)
Dau c	<i>Daucus carota</i> (Karotte)
DBPCFC	Double-Blind Placebo Controlled Food Challenge
DIECA	Diethyldithiocarbamat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAACI	European Academy of Allergology and Clinical Immunology
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey in Adults
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKMax	Enterokinase Max
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
FcεRI/II	Rezeptor für den konstanten Teil (Fc) des IgE
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography

---

Fra a	<i>Fragaria ananassa</i> (Erdbeere)
Gal	Galaktose
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgE	Immunglobulin E
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
ISAAC	International Study of Asthma and Allergy in Childhood
IUIS	International Union of Immunological Societies
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
Lol p	<i>Lolium perenne</i> (Deutsches Weidelgras)
LTP	Lipid Transfer Protein
Lyc e	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)
Mal d	<i>Malus domestica</i> (Apfel)
Min.	Minute
MOPS	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MP	Milchpulver
mRNA	messenger RNA
Ni <sup>++</sup>	Nickel
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotrilacetic acid
OAS	Orales Allergie Syndrom
OCS	Octopinsynthase
OD	optische Dichte
OFC	Open Food Challenge
P.pastoris	<i>Pichia Pastoris</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)
pl	isoelektrischer Punkt
PLP	Poly-L-Prolin
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP	PreScission <sup>TM</sup> Protease
PR	pathogenesis related
Pru av	<i>Prunus avium</i> (Kirsche)
Pru p	<i>Prunus persica</i> (Pfirsich)
PVDF	Polyvinylidendifluorid

---

PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Pyr c	<i>Pyrus communis</i> (Birne)
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
RBL	rat basophil leukemia
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serin
siRNA	small interfering RNA
SPT	Skin Prick Test
Std.	Stunden
T0	erste Generation
T1	Tochtergeneration
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBP	Tributylphosphin
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TH1	T-Helferzellen vom Typ 1
TH2	T-Helferzellen vom Typ 2
Thr	Threonin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
WAO	World Allergy Organization
WT	Wild Typ
YPFN	Hefeprofilin

## 1. Einleitung

### 1.1 Allergische Erkrankungen - eine Einführung

Der Begriff „Allergie“ wurde erstmals von Clemens von Pirquet (1906) für eine „veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“ verwendet. Heute wird die Allergie in einem viel engeren Sinne von der World Allergy Organization (WAO) als „hypersensitive Reaktion durch spezifische immunologische Mechanismen“ definiert (Johansson et al., 2004). Darunter versteht man eine verstärkte spezifische Abwehrreaktion gegenüber an sich harmlosen Substanzen im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeitsreaktion. Allergieauslösende Substanzen werden als Allergene bezeichnet (Ring et al., 2004). Die Intensität der Überempfindlichkeitsreaktion nimmt bei wiederholter Exposition mit dem Allergen meist zu (Staines et al., 1999).

Nach Gell und Coombs werden allergische Reaktionen je nach beteiligten Antigenen und Antikörperklassen in 4 Typen eingeteilt: Immunglobulin E (IgE) -vermittelte Soforttypreaktion (Typ I), zytotoxische Reaktion (Typ II), Immunkomplexreaktion (Typ III) und zellvermittelte Spättypreaktion (Typ IV) (Mygind et al., 2000). Die ersten drei werden durch Antikörper vermittelt, der vierte ist antikörperunabhängig und beruht auf einer T-Zell- und Makrophagenreaktion (Staines et al., 1999). Da Lebensmittelallergien überwiegend nach dem Soforttyp ablaufen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Seren von Patienten mit einer IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion eingeschlossen. Daher wird im Folgenden auch nur auf die molekularen Mechanismen dieser Reaktion eingegangen.

Die Häufigkeit von Allergien hat in den letzten Jahren zugenommen. Zur Zeit geben 10-20% der Bevölkerung in Deutschland an, unter einer Allergie zu leiden (Ring et al., 2004). Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Städten, was in 2 Studien ausführlich untersucht wurde. Die „International Study of Asthma and Allergy in Childhood“ (ISAAC) zeigt die geographische Variation der Symptome von Asthma, Heuschnupfen und atopischem Ekzem bei Kindern (Asher et al., 2006) und im Rahmen der Studie der „European Community Respiratory Health Survey in Adults“ (ECRHS) wurde die geographische Variation des Auftretens von Asthma, Atemwegserkrankungen und der allergischen Sensibilisierung von Erwachsenen untersucht (Heinrich et al., 2002). Bei dem weltweiten (ISSAC) bzw. europäischen (ECRHS) Vergleich der Häufigkeit der untersuchten allergischen Reaktionen liegt Deutschland im mittleren Bereich. Innerhalb von Deutschland leiden ostdeutsche Erwachsene weniger häufig an Allergien als westdeutsche.

#### 1.1.1 Die IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I)

Die Pathogenese der Typ I Allergie ist durch ein Ungleichgewicht zwischen einer  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Immunantwort mit einem Überschuss der  $T_H2$ -Reaktion bei gleichzeitig abgeschwächter  $T_H1$ -Reaktion, sowie durch eine exzessive Produktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern gekennzeichnet (Schmidt-Weber und Blaser, 2006). Sie ist in eine Sensibilisierungs- und eine Manifestationsphase unterteilt. Die Sensibilisierungsphase startet mit einem ersten Allergenkontakt. Nach der Verarbeitung und Präsentation des Allergens durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) endet diese Phase mit der

Proliferation spezifisch reaktionsfähiger T-Lymphozyten und der Produktion allergenspezifischer Antikörper durch B-Lymphozyten (Jäger & Wüthrich, 2002).  $T_H2$ -Zellen sekretieren unter anderem Interleukine IL-4 und IL-13, die maßgeblich an der Bildung von allergenspezifischem IgE beteiligt sind. IgE bindet an hochaffine  $Fc\epsilon RI$  Rezeptoren auf Effektorzellen (z.B. Mastzellen und basophile Granulozyten) und an niedrigaffine  $Fc\epsilon RII$  Rezeptoren auf Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Eosinophilen und Blutplättchen (Prussin und Metcalfe, 2006). Nach einem weiteren Kontakt (Manifestations-phase) mit dem Allergen kommt es zur Kreuzvernetzung von  $Fc\epsilon RI$  gebundenen IgE-Molekülen. Als Folge werden Mediatoren (Histamin, Prostaglandine, Leukotriene) durch Exocytose frei, welche für das Auftreten der allergischen Symptome verantwortlich sind. In Abb. 1.1 ist die Pathogenese der Typ I-Allergie graphisch dargestellt.

Bei der Symptomatik von allergischen Erkrankungen werden lokale von systemischen Reaktionen unterschieden. Zu den lokalen Reaktionen bei der Nahrungsmittelallergie zählt man das orale Allergiesyndrom (OAS), Gastritis, Erbrechen, Enteritis und Durchfall. Die systemischen Reaktionen schließen die allergische Rhinitis, Konjunktivitis, Asthma bronchiale, Urtikaria, atopisches Ekzem und die Anaphylaxie ein.

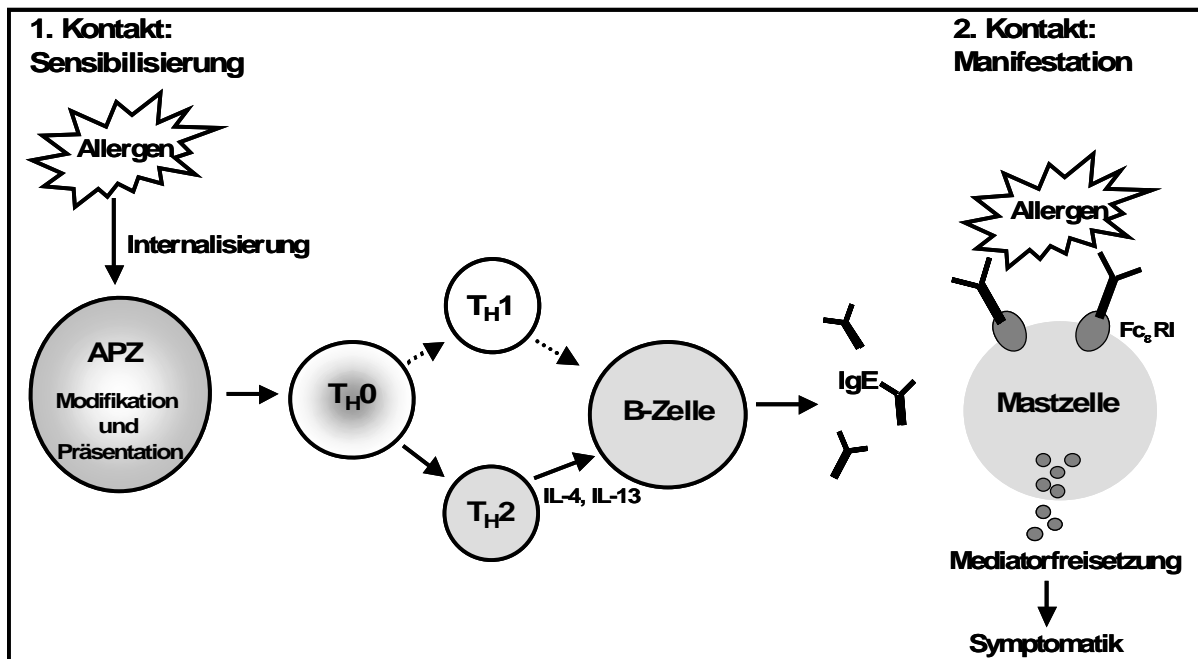


Abb. 1.1: Übersicht über die Pathogenese der Typ I-Allergie

## 1.2 Nahrungsmittelallergien und -allergene

Über die Häufigkeit der Nahrungsmittelallergie gibt es bis heute keine genauen Zahlen. Ca. 15% der Bevölkerung geben an, unter Reaktionen nach Ingestion bestimmter Nahrungsmittel zu leiden. Die Prävalenz abgesicherter Nahrungsmittelallergien liegt jedoch bei 3% der Erwachsenen und bei 6-8% der Kinder (Sampson, 2004). Kinder reagieren meist allergisch nach dem Verzehr von Kuhmilch (2,5%), Hühnerei (1,3%), Erdnuss (0,8%), Weizen (0,4%), Soja (0,4%), Baumnüsse (0,2%), Fisch (0,1%) und Meeresfrüchte (0,1%). Zu 80% verschwinden die Allergien auf Kuhmilch, Hühnerei, Soja und Weizen mit dem Schulalter. Erwachsene Nahrungsmittelallergiker leiden demgegenüber meist

unter Allergien auf Obst und Gemüse (5%), Meeresfrüchte (2%), Erdnuss (0,6%), Baumnüsse (0,5%) und Fisch (0,4%) (Sicherer & Sampson, 2006). Die Allergieentwicklung vom Säuglings- bis zum Erwachsenenalter wird als „Allergy March“ bezeichnet. Sensibilisierungen im Säuglingsalter sind oft Vorboten anderer allergischer Erkrankungen wie Neurodermitis, Heuschnupfen oder Asthma.

Bei Allergenen handelt es sich im Allgemeinen um wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10-70 Kilodalton (kDa). Zwei Klassen von Nahrungsmittelallergenen werden unterschieden: Klasse I Allergene sensibilisieren direkt über den gastrointestinalen Weg, eine Sensibilisierung auf Klasse II Allergene ist im Allgemeinen die Folge einer primären Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene (Pollenallergene). Nachdem der Organismus sich gegen das strukturverwandte Pollenallergen sensibilisiert hat, können auch Nahrungsmittelallergene durch eine Kreuzreaktion allergische Symptome auslösen (Ring et al., 2004). Zwischen 50 und 93% der Birkenpollenallergiker leiden unter IgE-vermittelten Reaktionen nach dem Verzehr der pollenassoziierten Nahrungsmittel (Vieths et al., 2002). Hauptverantwortlich hierfür ist das Majorallergen des Birkenpollen (*Betula verrucosa*) Bet v 1 mit seinen verwandten Allergenen in pflanzlichen Lebensmitteln (Henzgen et al., 2005). Die meisten Nahrungsmittelallergene gehören zu der Gruppe der Klasse I. Diese sind im Gegensatz zu Klasse II Allergenen oftmals auch nach Einwirkung von Hitze, Säuren und Proteasen noch in der Lage, allergische Symptome auszulösen (Sampson, 1999). Es wird davon ausgegangen, dass diese Nahrungsmittelallergene auf Grund ihrer Stabilität entweder in intakter Form über die Darmschleimhaut aufgenommen werden oder dass ihre IgE-bindenden Epitope sequenziell sind. Eine Sensibilisierung gegen Klasse I Allergene ist meist mit einer schweren Symptomatik verbunden. Neben Milchproteinen handelt es sich häufig um Mitglieder der Cupin (z.B. 7S und 11S Speicherproteine) und Prolamin (z.B. 2S Speicherproteine) Superfamilie oder um Proteine der Pflanzenabwehr (z.B. LTPs,  $\alpha$ -Amylasen und Proteaseinhibitoren), sogenannte PR-Proteine. Alle Nahrungsmittelallergien im Kindesalter sind durch Klasse I Allergene bedingt (zusammengefasst durch Breiteneder und Radauer, 2004; Ring et al., 2004).

Die allergene Potenz von Klasse II Allergenen wird häufig durch Hitzeeinwirkung oder Enzymverdau zerstört. Davon ausgehend handelt es sich bei den IgE-bindenden Epitopen bei Klasse II Allergenen hauptsächlich um Konformationsepitope (Sampson, 2004).

## **1.2.1 Diagnose**

### **1.2.1.1 Anamnese**

Zu Beginn der Diagnose einer Nahrungsmittelallergie erfolgt die präzise Anamnese. Hier sollten mögliche allergieauslösende Nahrungsmittel zur detaillierteren Überprüfung festgehalten werden, deren aufgenommene Menge, deren Zustand (prozessiert oder frisch) sowie die Zeit zwischen Verzehr und auftretender Symptomatik. Auch zusätzliche Faktoren, die möglicherweise einen Einfluss auf das Auftreten der Symptome haben (Sport, Medikation, gleichzeitige Alkoholaufnahme), werden hier erfasst. Ebenso wird die genetische Prädisposition, d. h. die Häufigkeit von allergischen Erkrankungen innerhalb der Familie, berücksichtigt.

### 1.2.1.2 Hauttest

Der Hauttest (SPT) gibt einen schnellen Hinweis, ob es sich um eine IgE-vermittelte Sensibilisierung handelt. Er besitzt eine hohe Reproduzierbarkeit und wird häufig genutzt, um Patienten auf verschiedene potenziell allergieauslösende Nahrungsmittel zu untersuchen. Nahrungsmittlextrakte, eine Positiv- (Histamin) sowie eine Negativkontrolle (Kochsalzlösung) werden auf die Haut aufgetragen und dringen durch Einritzen oder Einstechen in die Haut ein. Anschließend wird der Durchmesser der durch die Extrakte, die Positiv- und die Negativkontrolle entstehenden Quaddeln gemessen. Übertrifft ein Nahrungsmittlextrakt den Quaddeldurchmesser der Negativkontrolle um mindestens 3 mm, ist das Ergebnis positiv. Ein positiver SPT bedeutet, dass das vorliegende Nahrungsmittel möglicherweise für die Auslösung von allergischen Symptomen bei dem Patienten verantwortlich ist. Bei einem negativen SPT Ergebnis kann eine IgE-vermittelte Reaktion ausgeschlossen werden (Genauigkeit > 95%). Da der SPT jedoch eine Spezifität von <50% besitzt, kann bei einer positiven Reaktion nicht sofort von einer IgE-vermittelten Allergie ausgegangen werden. Diese muss durch weitere Tests bestätigt werden. Die Verlässlichkeit des SPT ist abhängig von der Qualität der Testlösungen, da mittels bestimmter Extraktionsverfahren möglicherweise nicht alle Allergene extrahiert werden oder Allergene auf Grund ihrer Labilität in den Extrakten abgebaut werden können. Der SPT mit dem Nahrungsmittel direkt (Prick-zu-Prick) ist eine Alternative zu der Verwendung von kommerziellen Extraktlösungen (Burks und Ballmer-Weber, 2006).

### 1.2.1.3 *In vitro* Diagnostik

Ergänzend zu einer vollständigen Anamnese und der Untersuchung der spezifischen Sensibilisierung mittels SPT, kann die *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden. Hier nimmt die Bestimmung des spezifischen IgE den wichtigsten Stellenwert ein. Für die Bestimmung werden unterschiedliche kommerzielle Testsysteme angeboten (z.B. CAP-Systeme der Firma Phadia). In der Regel werden diese Tests mit Nahrungsmittlextrakten durchgeführt, die Nutzung von isolierten Allergenen ist selten. Da das Ergebnis abhängig von der Qualität der Reagenzien ist, können starke Abweichungen zu der Anamnese und dem Hauttest sowie der oralen Provokation auftreten. Die diagnostische Tauglichkeit eines *in vitro* Tests ist also abhängig von den untersuchten Allergenen und dem verwendeten Testverfahren (Kleine-Tebbe et al., 2001).

### 1.2.1.4 Provokationen mit dem allergieauslösenden Nahrungsmittel

Die doppel-blind Placebo kontrollierte Provokation (DBPCFC) gilt als Goldstandard bei der Diagnostik von Nahrungsmittelallergien (Bindslev-Jensen et al., 2004). Hierbei kann die klinische Aktualität von vorhandenen Sensibilisierungen gesichert werden (Niggemann et al., 2006). Jedoch wird diese Prozedur auf Grund des hohen Aufwandes nicht routinemäßig durchgeführt. Im Allgemeinen sollte das zu testende Nahrungsmittel in Flüssigkeit oder Brei eingerührt werden. Bestenfalls wird die Provokation in Form einer Titration durchgeführt, wobei die verabreichte Dosis alle 30-60 Min. bis zur Höchstdosis gesteigert wird. Falsch negative Ergebnisse treten bei diesem Test äußerst selten auf (1-3% der

Fälle). Meist bekamen die Patienten dann eine unzureichende Menge des allergieauslösenden Nahrungsmittels verabreicht.

Offene Provokationen (OFC) werden meist bei Lebensmitteln mit starkem Eigengeschmack durchgeführt.

### 1.2.2 Therapie der Nahrungsmittelallergie

Zur Zeit ist die einzige Möglichkeit für einen Nahrungsmittelallergiker ohne allergische Reaktionen zu leben, das allergieauslösende Nahrungsmittel aus dem Speiseplan zu eliminieren. Es bestehen jedoch erste Ansätze, eine Nahrungsmittelallergie zu therapieren, z.B. durch eine parallele Einnahme von Antihistaminika und allergieauslösendem Nahrungsmittel. Dies kann Symptome des oralen Allergiesyndroms und IgE-vermittelte Hautreaktionen mildern, hilft jedoch nicht bei systemischen Reaktionen (Bindslev-Jensen, 1991).

Kortikosteroidbehandlungen werden bereits bei Personen mit chronischen IgE-vermittelten Krankheiten wie atopischer Dermatitis oder Asthma oder auch bei nicht IgE-vermittelten Reaktionen (z.B. allergische Speiseröhrentzündung) durchgeführt. Die Behandlung mit Kortikosteroiden kann bei akuten, entzündlichen Symptomen helfen, die Nebenwirkungen bei langwierigen Behandlungen sind jedoch sehr häufig oder schwer (Liacouras et al., 1998; Teitelbaum et al., 2002).

Eine Therapie mit anti-IgE Antikörpern (TNX-901) wurde bei Patienten mit einer Erdnussallergie durchgeführt. In einer doppel-blind Placebo kontrollierten Studie wurde die Menge an toleriertem Erdnussprotein bei der Versuchsgruppe vor und nach Gabe der Antikörper untersucht. Ein Teil der Patienten tolerierten nachher eine signifikant höhere Menge an Erdnussprotein als zuvor (25%). Jedoch ergaben sich bei weiteren 25% der Patienten keine erhöhten tolerierten Dosen (Leung et al., 2003).

Einige Studien zeigten, dass die spezifische Immuntherapie zur Behandlung der durch Birken- oder Beifußpollen induzierten Rhinitis, Symptome der pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie eliminiert (Hermann et al., 1995; Asero et al., 1998). Eine Therapie der Nahrungsmittelallergie durch Hyposensibilisierung ist kaum erforscht. Im Rahmen der vorliegenden Studien wurde der Effekt einer Birkenpollen-Immuntherapie auf kreuzreaktive Nahrungsmittelallergien am Beispiel des Apfels untersucht. Diese zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Während Bolhaar et al. (2004) einen positiven Effekt, gemessen im SPT und DBPCFC feststellten, wurde durch Hansen et al. (2004) sowie Kinacyan et al. (2007) keine Veränderung beobachtet.

Die sublinguale Placebo kontrollierte Immuntherapie mit Haselnussextrakt wurde bei einer Gruppe von Haselnussallergikern über 5 Monate durchgeführt. Die Menge an toleriertem Haselnussprotein war in der Gruppe mit Immuntherapie nach der Therapie signifikant höher als zu Beginn der Studie, gemessen im DBPCFC. Spezifische IgE-Konzentrationen auf Extrakt der Haselnuss (*Corylus avellana*) sowie auf das Bet v 1 homologe Cor a 1 und das LTP der Haselnuss (Cor a 8) wurden vor und nach der Immuntherapie verifiziert. Ein signifikanter Einfluss der Immuntherapie auf die spezifischen IgE-Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden. Systemische Reaktionen durch die Immuntherapie traten in 0,2% der Fälle auf, die Verträglichkeit der Therapie war also sehr gut (Enrique et al., 2005).



Ein weiterer Ansatz zur Therapie der Nahrungsmittelallergie sind traditionelle chinesische Kräuter. In einem Mausmodell für Erdnussallergie schützte die Zusammensetzung mit dem Namen FAHF-1 vor einer Erdnuss-induzierten Symptomatik, reduzierte die Erdnuss-spezifische IgE-Konzentrationen und die allergenspezifische T<sub>H</sub>2-Antwort (Li et al., 2001).

Zusätzlich wird an Ansätzen gearbeitet, bekannte Allergene zu modifizieren und in einer allergenspezifischen Therapie einzusetzen. So wurden z.B. die drei Hauptallergene der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 durch einzelne spezifische Aminosäuresubstitutionen in ihrer IgE-Reaktivität drastisch reduziert. Diese mutierten Allergene wurden in *E. coli* kloniert und exprimiert, die Bakterien durch Hitzeeinwirkung abgetötet und in Mäuse mit anaphylaktischen Reaktionen nach Erdnussaufnahme injiziert. Die Mäuse litten nicht mehr unter einer schweren Symptomatik nach Verabreichung von Erdnuss, des Weiteren waren die erdnusspezifischen IgE-Konzentrationen und die allergenspezifische T<sub>H</sub>2-Antwort reduziert (Shin et al., 1998; Li et al., 2003).

### 1.2.3 Tomatenallergien

Für diese Studie wurde die Tomate (*Lycopersicon esculentum*) als Modell für die RNAi vermittelte Hemmung der Expression von ausgewählten Allergenen bestimmt. Auch wenn die Tomate nicht zu den am häufigsten eine Allergie auslösenden Nahrungsmitteln gehört, besitzt sie dennoch eine klinische Relevanz. Innerhalb der Gruppe der Nahrungsmittelallergiker leiden ca. 1,5% der Personen unter einer Tomatenallergie (Jäger und Wüthrich, 2002). Ortolani et al. (1989) fanden innerhalb einer Gruppe (n=100) von Obst und Gemüseallergikern 16 Personen, die mit Symptomen nach dem Verzehr von Tomaten reagierten. Häufig ist die Tomatenallergie mit einer Gräserpollenallergie oder einer Latexallergie assoziiert (Beezhold et al., 1996; Kim & Hussain, 1999; Fötisch et al., 2001).

#### 1.2.3.1 IgE-bindende Glykoproteine in der Tomate

Bleumink et al. (1966 und 1970) beschrieben erstmals eine IgE-reaktive Glykoproteinfraktion aus der Tomate, welche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20-30 kDa enthielt. Diese Fraktion zeigte im Vergleich zu anderen Fraktionen im SPT eine erhöhte Aktivität und war sehr stabil gegenüber thermischer und proteolytischer Behandlung. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und nachfolgender Sequenzierung wurde die  $\beta$ -Fructofuranosidase (Invertase) im Tomatenextrakt als ein IgE-bindendes Glykoprotein identifiziert (Petersen et al., 1996). Bei der Analyse der N-Glykane der Tomate wurde die pflanzenspezifische Glykanstruktur mit Xylose und Fukose identifiziert (Priem et al., 1993; Zeleny et al., 1999). Die Benennung der  $\beta$ -Fructofuranosidase als Minorallergen Lyc e 2 erfolgte durch Westphal et al. (2003). Lyc e 2 besitzt 4 mögliche N-Glykosylierungsstellen, wobei eine Glykosylierungsstelle sowie die dazugehörige Glykanstruktur als MMXF ( $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ ) von Westphal et al. (2003) durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert wurden. Durch Klonierung von rekombinantem (nicht glykosyliertem) Lyc e 2 und vergleichenden Untersuchungen mit dem natürlich gereinigten Lyc e 2 konnte eine

Abhängigkeit der IgE-Reaktivität und der allergenen Potenz von der Glykosylierung festgestellt werden.

Glykoproteine können kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD) aufweisen. Deren Beteiligung an der IgE-Bindung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt sind N- und O-glykosidische Verbindungen, wobei bisher hauptsächlich die Rolle der N-Glykane bei der IgE-Bindung untersucht wurde. N-Glykane sind an das Proteingerüst über die freie Aminogruppe von Asparagin (Asn) gekoppelt. Die Voraussetzung für eine N-Glykosylierung ist das Vorkommen von Asn in dem Motiv Asn-X-Ser/Thr. Ob die N-Glykosylierung jedoch tatsächlich stattfindet, hängt von dem Weg ab, den das Protein durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat geht. Die Immunreaktivität der N-glykosylierten Kohlenhydratverbindungen basiert auf der bei Säugern nicht vorkommenden Verknüpfung von  $\alpha$ -(1,3) Fukose und  $\beta$ -(1,2) Xylose (van Ree, 2002; Fötisch et al., 2003).

### 1.2.3.2 Lyc e 1 (Tomatenprofilin)

Bisher sind zwei Isoformen des Tomatenprofilins als Allergene beschrieben (Willeroider et al., 2003; Westphal et al., 2004). Die klinische Relevanz einer Sensibilisierung gegen Profiline aus Nahrungsmitteln ist umstritten. Lyc e 1 war im Histaminfreisetzungstest in der Lage, gebundenes IgE auf basophilen Zellen kreuzzuvernetzen und eine Mediatorausschüttung zu induzieren (Westphal et al., 2004). Das Tomatenprofilin besitzt mit 131 Aminosäureresten eine molekulare Masse von ca. 14,1 kDa und einen pI von 4,7.

Profiline binden Aktin, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Poly-L-Prolin. Sie sind an regulatorischen Vorgängen bei der Signaltransduktion zwischen Zellmembran und Zytoskelett und der Aktinpolymerisation beteiligt (Schluter et al., 1997). Somit haben sie eine wichtige Funktion beim Wachstum der Pflanze. Ein Ausschalten des Profilings bei *Arabidopsis thaliana* führt zu erheblichen Wachstumseinbußen (Ramachandran et al., 2000). Profiline sind ubiquitär vorkommende Proteine mit hohen IgE-Kreuzreaktivitäten innerhalb der verschiedenen Spezies. Aus diesem Grund werden Profiline auch als Panallergene benannt (Willeroider et al., 2003). Häufig ist eine Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelpofiline mit einer Birkenpollen- oder Beifußallergie und damit verbundener Sensibilisierung auf das entsprechende Profilin assoziiert (zusammengefasst in Vieths et al., 2002).

### 1.2.3.3 Nicht spezifisches Lipid Transfer Protein (LTP) der Tomate

Das LTP in der Tomate wurde von Fötisch et al. (2001) zum ersten Mal als IgE-bindendes Protein beschrieben. Die IgE-Bindung an Tomaten LTP konnte durch Präinkubation von Patientenserum mit rekombinantem LTP der Kirsche (*Prunus avium*) Pru av 3 signifikant inhibiert werden.

Lipid Transfer Proteine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 9 kDa. Die meisten LTPs besitzen einen pI von >9. Charakteristisch sind ihre acht konservierten Cysteinreste, die vier intramolekulare Disulphidbrücken bilden. Eine IgE-Reaktivität im Bereich von 8-10 kDa im Immunoblot mit Pfirsichextrakt auf der Festphase wurde zum ersten Mal von Leonart et al. (1992) beschrieben. Innerhalb einer spanischen Patientengruppe kam eine Sensibilisierung auf dieses Protein am häufigsten vor. Später wurde die 8-10 kDa Proteinfamilie als Hauptallergen in *Prunoideae* und als

monosensibilisierendes Agens beschrieben. Die Sensibilisierung war nicht mit einer gleichzeitigen Gras- oder Birkenpollinose verbunden (Pastorello et al., 1999). Seinen Namen Lipid Transfer Protein erhielt es auf Grund der Fähigkeit, spezifisch oder unspezifisch Lipide zwischen Membranen zu transferieren (Kader, 2002). Als PR Proteine der Gruppe 14 werden LTPs in der Pflanze vor allem bei biotischem (Pathogene) und abiotischem Stress (Umweltstress) gebildet. Überexpressionen von LTPs führte zu Resistenzen gegenüber bakteriellen Pathogenen (Molina & Garcia-Olmedo, 1997) und Virusinfektionen (Park et al., 2002). Des Weiteren konnte bei einigen LTPs eine antibiotische Wirkung *in vitro* festgestellt werden (Garcia-Olmedo et al., 1995). Lipid Transfer Proteine werden durch große Genfamilien kodiert. Für das LTP in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) sind in der Genbank 31 unterschiedliche Gene aufgeführt. Auch für das Tomaten LTP waren zu Beginn der Studie bereits 14 Teil- bzw. Vollängensequenzen bekannt.

LTPs kommen wie Profilin ubiquitär in Pflanzen vor, wodurch angenommen wird, dass es sich hier ebenfalls um Panallergene handelt (Ballmer-Weber, 2002). Bisher sind zahlreiche LTPs aus Obst (z.B. Pfirsich, Kirsche, Apfel, Zitrusfrüchte, Trauben), Gemüse (z.B. Mais, Salat, Spargel, Kohl), Haselnuss und Pollen (z.B. Olive, Traubenkraut, Beifuß, Glaskraut) in der Datenbank der „International Union of Immunological Societies“ (IUIS) als Allergene identifiziert und charakterisiert. Eine Sensibilisierung auf LTPs wird hauptsächlich im mediterranen Bereich beobachtet und ist häufig mit einer schweren Symptomatik verbunden (Diaz-Peralez et al., 2000; Scheurer et al., 2001; Ballmer-Weber et al., 2002; Fernandez-Rivas et al., 2003; Lombardero et al., 2004; Pastorello et al., 2004).

#### 1.2.3.4 Weitere potentielle Tomatenallergene

Tomatenallergiker weisen ein multiples Sensibilisierungsmuster auf. Als weitere potentielle Tomatenallergene wurden ein Thaumatin homologes P23 Protein (Rodrigo et al., 1991), die Chitinase (Diaz-Peralez et al., 1999), die Polygalakturonase (Fötisch et al., 2001; Kondo et al., 2001), ein Patatin (Sol t 1) homologes 43 kDa Protein (Breiteneder et al., 1999), ein Bet v 1 homologes TS-1 Protein (Sree Vidya et al., 1999), die Superoxid Dismutase, die Pektinesterase (Kondo et al., 2001) und die Peroxidase (Weangsrivanaval et al., 2003) beschrieben.

#### 1.2.3.5 Die Beteiligung der Tomate an Kreuzallergien

Kreuzreaktionen von IgE-Antikörpern werden meist durch ähnliche Molekülstrukturen hervorgerufen. Dadurch kann mit der Sensibilisierung gegen ein Kreuzallergen ein breites Spektrum an weiteren Sensibilisierungen ausgelöst werden. Die größte Bedeutung hierbei haben pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien (Henzgen et al., 2005).

Die Tomate ist in das von Blanco et al. (1994) zum ersten Mal beschriebene Latex-Frucht Syndrom involviert. Circa 30-50% der Latexallergiker leiden zusätzlich an einer Allergie auf pflanzliche Nahrungsmittel. Die vier an dem Latex-Frucht Syndrom beteiligten Proteingruppen sind: die Klasse 1 Chitinasen, die  $\beta$ -1,3-Glucanase, ein Patatin ähnliches Protein und das Profilin.

Profilin sind durch ihr Vorkommen als Panallergene als Auslöser von Kreuzreaktionen prädestiniert. IgE-Antikörper gegen das Pollenprofilin Bet v 2 besitzen eine hohe Kreuzreaktivität zu Profilinen aus

pflanzlichen Nahrungsmitteln. Bisher sind zahlreiche Profiline aus pflanzlichen Nahrungsmitteln identifiziert und als Allergene beschrieben. Hierzu gehören z.B. die Profiline aus Kirsche, Pfirsich, Apfel, Sellerie, Lychee, Banane und Tomate. Die Sequenzidentität dieser Profiline mit dem Bet v 2 beträgt zwischen 74 und 83% (Vieths et al., 2002). Mit Seren ausgewählter Tomatenallergiker war es möglich, die IgE-Bindung an rLyc e 1 auf der Festphase mit rBet v 2 vollständig zu hemmen (Westphal et al., 2004). Neben Birke können auch Profiline aus Gräsern oder Beifuß für eine pollenassoziierte Lebensmittelallergie verantwortlich sein (Jankiewicz et al., 1996; van Ree et al., 1995).

Im mediterranen Raum werden Kreuzallergien häufig durch LTPs ausgelöst. Da die Tomate ebenfalls ein IgE-reaktives LTP besitzt, sind auch hier Kreuzreaktivitäten mit anderen pflanzlichen Nahrungsmitteln möglich. Eine Kreuzreaktivität von LTPs aus *Rosaceae* Früchten und Beifuß sowie Kastanie wurde erstmals von Diaz-Peralez et al. (2000) beschrieben. Unterschiedliche IgE-Bindungs Kapazitäten wurden mittels eines dosisabhängigen Enzym-Linked-Immunsorbent Tests (ELISA-Inhibition) untersucht. Die maximale Hemmung der IgE-Bindung an das LTP des Apfels (*Malus domestica*) Mal d 3 und des Pfirsichs (*Prunus persica*) Pru p 3 durch das LTP des Beifuß (*Artemisia vulgaris*) Art v 3 war viel geringer im Vergleich zu einer Inhibition der IgE-Bindung mit den *Rosaceen* untereinander. Obwohl eine Kreuzreaktivität von LTPs aus verschiedenen Spezies gezeigt wurde, tritt die Sensibilisierung gegen Nahrungsmittel-LTPs unabhängig von einer Pollinose auf. Die Sensibilisierung erfolgte zumindest bei einem Teil der Patienten wahrscheinlich auf dem oralen Weg. Dies geht einher mit den Ergebnissen von Palacin et al. (2006), die bei Kohll allergikern eine Sensibilisierung auf Kohl (*Brassica oleracea*) -LTP (Bra o 3), Pru p 3 und Art v 3 fanden. Die IgE-Bindung an Bra o 3 konnte durch Art v 3 zu 48% inhibiert werden. Mit Pru p 3 war eine Inhibition der IgE-Bindung an Bra o 3 zu 73% möglich. Auch hier wurde eine hohe Kreuzreaktivität bei Patienten mit einer multiplen Sensibilisierung gegen LTPs festgestellt.

Wie in Kapitel 1.2.3.1 beschrieben besitzt die Tomate CCDs. Die Beteiligung von CCDs an der Allergie wurde als erstes von Aalberse et al. (1981) beschrieben. Die IgE-Bindung an diese Strukturen ist nach Perjodatbehandlung der entsprechenden Allergenlösung signifikant reduziert, bleibt jedoch nach proteolytischer Spaltung der Proteine bestehen (zusammengefasst: Vieths et al., 2002). Obwohl eine Sensibilisierung gegen Glykane mit 16-55% relativ häufig ist, ist die klinische Relevanz von anti-CCD IgE umstritten. Zum einen besitzen Patienten spezifische IgE-Antikörper gegen CCD, zum anderen reagieren diese Patienten aber im Skin Prick Test mit entsprechender Lösung negativ (Mari et al., 1999). Die biologische Aktivität der CCDs der Tomate wurde von Fötisch et al. (2003) untersucht. Bei einem Drittel der Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Lyc e 2 induzierte eine dosisabhängige Stimulation mit verschiedenen Glykoproteinen im basophilen Mediatorfreisetzungstest eine Histaminfreisetzung bis zu 82%. Bei der Tomatenallergie haben die CCDs somit wahrscheinlich bei einem Teil der Patienten eine klinische Relevanz.

## 1.3 Verminderung des allergenen Potentials pflanzlicher Lebensmittel

### 1.3.1 Der Einfluss der lebensmitteltechnologischen Behandlung

Eine Variante der technologischen Prozessierung ist die thermische Behandlung von Lebensmitteln. Diese wird normalerweise mit dem Ziel der Verbesserung des Geschmacks und der Verdaulichkeit, zur Veränderung der Konsistenz oder auf Grund der mikrobiologischen Sicherheit durchgeführt (Davis et al., 1998). Die Folge der thermischen Behandlung ist die Denaturierung der Proteine, die meist mit einer Veränderung der allergenen Potenz einhergeht. Die allergene Potenz kann entweder durch die Zerstörung der IgE-bindenden Epitope verringert oder durch Freilegung dieser Epitope bzw. infolge einer Bildung von neuen Epitopen (Neoepitope) erhöht werden. Beispiele dafür sollen im Folgenden erläutert werden.

Die einzelnen Denaturierungsschritte werden durch unterschiedliche Temperaturen begünstigt. Es kommt zur Aufhebung der Tertiärstruktur (bei ca. 55-70°C), Spaltung von Disulphidbrücken (bei ca. 70-80°C), Bildung von neuen intra- und intermolekularen Verknüpfungen (bei ca. 80-90°C) sowie zur Bildung von Aggregaten (bei ca. 90-100°C). Zusätzlich treten bei Temperaturen von über 100°C chemische Modifikationen durch Verbindungen zwischen dem Protein und anderen Bestandteilen des Nahrungsmittels auf. Am häufigsten reagieren Proteine mit Zuckerstrukturen (Maillard-Reaktion) und bilden neue potentiell IgE-bindende Strukturen (zusammengefasst in: Besler et al., 2001).

Der Einfluss der Prozessierungstemperatur auf die IgE-Reaktivität des Lebensmittels ist sehr gut bei der Erdnuss untersucht worden. Die IgE-Bindungskapazität von gerösteten Erdnüssen war im Vergleich zu ungerösteten Erdnüssen im ELISA um ein neunzigfaches erhöht. In einem *in vitro* Modell der Maillard-Reaktion wurde Ara h 1 in Anwesenheit und Abwesenheit von Zuckern erhitzt. Während Ara h 1, welches in Abwesenheit von Zucker erhitzt wurde, eine erhöhte IgE-Bindungskapazität aufwies, war die diese bei Ara h 1, welches in Anwesenheit von Zucker erhitzt wurde, erhöht. Die höhere IgE-Bindungskapazität ist also wahrscheinlich eine Folge der Verbindung der Allergene zu Produkten der Maillard-Reaktion und der daraus resultierenden Bildung von Neoepitopen (Maleki et al., 2000).

Nach dem Erhitzen (100°C) von Erdnüssen wurden IgE-reaktive Proteine im Kochwasser detektiert, die nicht mehr in der gekochten Erdnuss detektierbar waren. Dies könnte die Ursache für eine geringere IgE-Bindungskapazität von gekochten Erdnüssen sein (Mondulet et al., 2005). Beyer et al. (2001) stellten fest, dass nicht nur Kochen, sondern auch Braten (120°C) von Erdnüssen eine Verringerung der IgE-Bindungskapazität der drei Hauptallergene der Erdnuss Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 zur Folge hat. Auch durch Rösten von Haselnüssen wurde die IgE-Bindungskapazität innerhalb einer bestimmten Patientengruppe um ein Hundertfaches verringert (Hansen et al., 2003). Im Gegensatz hierzu wurde bei der Pekanuss im Zuge der Maillard-Reaktion eine Erhöhung der Allergenität beschrieben (Berrens, 1996).

Auch bei Sellerie fanden bereits umfangreiche Studien zur Untersuchung der Hitzestabilität von Allergenen statt. Die Glykoproteine des Sellerie (*Apium graveolus*) sind am hitzestabilsten, gefolgt von Api g 4 (Profilin) und Api g 1 (Jankiewicz et al., 1997). In einer weiteren Studie reagierte ein Teil der untersuchten Sellerieallergiker nach dem Verzehr von gekochtem Sellerie im DBPCFC mit

Symptomen. Diese Patienten zeigten eine Sensibilisierung auf Glykoproteine, Api g 1 und/oder Api g 4 (Ballmer-Weber et al., 2002).

In Bezug auf die Stabilität von LTPs in verarbeiteten Lebensmitteln wurde festgestellt, dass hohe Temperaturen zwar andere Proteine des Pfirsich zerstören, Pru p 3 jedoch IgE-reaktiv bleibt (Brenna et al., 2000). Auch das LTP der Gerste ist nach dem Prozess des Bierbrauens noch IgE-reaktiv (Garcia-Casado et al., 2001). Mais-LTP wurde bis zu 160 Min. bei 100°C erhitzt und anschließend eine IgE-Reaktivität nachgewiesen (Pastorello et al., 2003). Ebenso war die allergene Potenz des Mal d 3 aus dem Apfel nach Hitzeeinwirkung unverändert (Sancho et al., 2005).

In verarbeiteten Lebensmitteln wie Polenta (Pastorello et al., 2003), Kirschsaff, eingemachten Kirschen und Kirschmarmelade (Scheurer et al., 2004) konnte IgE-reaktives LTP im Immunoblot nachgewiesen werden. Die Kirschprodukte waren zusätzlich in der Lage, im basophilen Histamin Freisetzungstest eine dosisabhängige Histaminfreisetzung bei Kirschallergikern zu induzieren. Durch die Röstung von Haselnüssen blieb die IgE-Reaktivität von Haselnuss-LTP (Cor a 8) unverändert (Pastorello et al., 2002).

Der Einfluss anderer technologischer Prozessierungen, wie Mikrowellenbestrahlung, Trocknen,  $\gamma$ -Strahlung, Ultrahochdruck und Starkstromimpulse, wurde am Beispiel des Sellerie untersucht. Als Maß für die IgE-Bindungskapazität bzw. die allergene Potenz wurde ein Immunoblot bzw. ein  $\beta$ -Hexosaminidase Freisetzungstest herangezogen. Beim Mediator Freisetzungstest wurden RBL-Zellen durch Maus-IgG passiv sensibilisiert. Hier hatte gekochter (Mikrowelle oder im Wasser gekocht), ultrahochdruck- sowie starkstrombehandelter Sellerie eine um mehr als 50% verringerte allergene Potenz im Vergleich zu dem unbehandelten Produkt. Nach  $\gamma$ -Strahlung war die allergene Potenz höher als die des nativen Sellerie. Die Ergebnisse des Immunoblott waren im Gegensatz zu dem RBL-Test nicht so eindeutig (Jankiewicz et al., 1997). Ein als „hypoallergen“ benannter Reis wird mittels Hochdruckbehandlung (100-400 MPa) hergestellt. Die verringerte Allergenität beruht jedoch nicht auf der durch Hochdruck veränderten Struktur der Reisallergene, sondern auf dem Auswaschen der Reisallergene infolge des hohen Drucks (Kato et al., 2000).

Bei allen Veränderungen der allergenen Potenz von Lebensmitteln durch technologische Prozessierung werden ausschließlich IgE-bindende Epitope der Allergene verändert, bzw. Allergene ausgewaschen oder herausgekocht. Es wird hier kein Einfluss auf das Erbgut und somit die Allergenexpression genommen.

### **1.3.2 Der Einfluss von Modifikationen**

Im Rahmen einer Modifikation können gezielt oder ungerichtet Mutationen in ausgewählte Gene eingeführt werden. In beiden Fällen wird das Erbgut direkt verändert. Ungerichtete Mutationen werden durch physikalische (Korpuskularstrahlen, ionisierende Strahlung) und chemische (desaminierende Substanzen, alkylierende Substanzen, Basenanaloga) Mutagenen erzielt.

Eine gezielte Modifikation ausgewählter Genorte wird z.B. durch eine gentechnische Veränderung erzeugt. Nahrungs- und Futtermittel, die durch gentechnische Veränderungen hergestellt werden, müssen ein Genehmigungsverfahren durchlaufen und zugelassen werden. Laut Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) laufen zur Zeit (Stand: 01.11.2006) 34 Anträge für herbizid- und insekten-

toleranten Mais, Reis, Zuckerrübe, Soja, Raps und Baumwolle (BfR, Anträge auf Zulassung gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel gemäß Artikel 5 der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003). In der EU zugelassen ist bisher herbizid- bzw. insektentoleranter Mais der Firmen Novartis und Monsanto (BfR, Register der zugelassenen gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermittel, Stand: 08.03.2006). Gentechnisch veränderte Lebensmittel im Sinne einer gezielten Reduktion der Allergenität sind bisher nicht im Zulassungsverfahren.

### 1.3.2.1 Beispiele für gentechnische Veränderungen zur Reduktion der Allergenität

Erste Versuche, die Expression von Proteinen in pflanzlichen Lebensmitteln gezielt zu unterdrücken, wurden mit der Antisense-Strategie durchgeführt. So wurde durch diese Strategie die erste gentechnisch veränderte Tomate, die Flavr-Savr<sup>TM</sup>-Tomate, von der Firma *Calgene* hergestellt. Hier wurde die Expression der Polygalakturonase zur Verlängerung des Reifezustandes reduziert. Polygalakturonase ist bei der reifen Tomate am Abbau der Zellwand maßgeblich beteiligt, eine geringere Expression dieses Enzyms verlängert ihre Haltbarkeit. Untersuchungen der Polygalakturonaseaktivität zeigten eine verbleibende Enzymaktivität von 1% bei der Flavr-Savr<sup>TM</sup>-Tomate im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Neben phänotypischer Identität bestanden laut zahlreichen Untersuchungen in Bezug auf Vitamin-, Protein-, Mineralstoff- sowie Solaningehalt keine Unterschiede zwischen den manipulierten Pflanzen und den Kontrollpflanzen (BfR, 1997). Dass es sich bei dem Zielprotein ebenfalls um ein IgE-reaktives Protein in der Tomate handelt (Fötisch et al., 2001; Kondo et al., 2001), war zu dem Zeitpunkt der Entstehung der Flavr-Savr<sup>TM</sup>-Tomate noch nicht bekannt. Im Jahre 1994 wurde die Tomate in den USA erstmalig in den Markt eingeführt. Auf Grund von Anbauschwierigkeiten wurde das Produkt jedoch wieder vom Markt genommen. Der für die gentechnischen Veränderungen ausgewählte Stamm erwies sich als sehr krankheitsanfällig (Damen et al., 2000).

Von der Firma *Zeneca Plant Sciences* wurde 1996 ein Tomatenpüree in Großbritannien eingeführt, welches ebenfalls aus gentechnisch veränderten Tomaten hergestellt wurde. Auch hier wurde die Expression der Polygalakturonase gehemmt. Die Hemmung der Expression erfolgte jedoch nicht über die Antisense-Strategie, sondern über die Einführung eines verkürzten Polygalakturonasegens in Sense Orientierung. Dieses Produkt wurde mit großem marktwirtschaftlichen Erfolg verkauft, später jedoch von der Öffentlichkeit stark kritisiert und wegen mangelnder Akzeptanz bei der Bevölkerung vom Markt genommen (Damen et al., 2000).

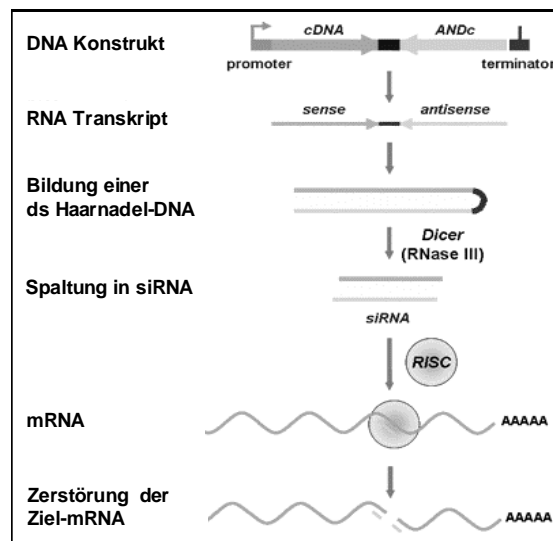
Als weiteres kommerzielles Produkt steht die Kartoffel im Mittelpunkt der Forschung. Hier soll mit Hilfe der Antisense-Strategie die Hemmung der Expression einer  $\alpha$ -Amylase erfolgen. Bei Einlagerung von Kartoffeln veranlasst die  $\alpha$ -Amylase eine Umwandlung von Stärke in Zucker und induziert somit die Keimung. Auch für die Lebensmittelindustrie wäre eine Kartoffel mit reduziertem  $\alpha$ -Amylasegehalt interessant, da Chips und Pommes frites aus Kartoffeln mit niedrigem Zuckeranteil beim Frittieren nicht so schnell verbrennen (Damen et al., 2000).

Es bestehen erste Ansätze, das allergene Potential von Pflanzen mittels der Antisense-Methode zu verringern. Ein allergener  $\alpha$ -Amylase/Trypsin Inhibitor in Reis konnte über drei Generationen hinweg unterdrückt werden (Nakamura & Matsuda, 1996; Tada et al., 1996). Auch die Expression von Lol p 5 aus Lieschgras (*Lolium perenne*) konnte durch diese Methode so herabreguliert werden, dass das

Allergen im Immunoblot nicht mehr nachweisbar war (Bhalla et al., 1999). Die Erzeugung von hypoallergenen Sojapflanzen mit der Antisense-Methode wurde von Suskiw et al. (2002) beschrieben.

### 1.3.2.2 Gezielte Hemmung der Allergenexpression in pflanzlichen Lebensmitteln durch die RNAi-Methode

Die RNAi-Technologie gehört mit der Antisense- und Sense-Technologie zu den Mechanismen des posttranskriptionellen „gene silencing“, bei dem die Expression des Zielgens stabil unterdrückt werden soll. Am Beginn steht die Bildung von doppelsträngigen RNA Molekülen, die von einem Enzymkomplex (DICER) erkannt und zu kleinen RNA Stücken, sogenannten small interfering (si) RNAs abgebaut werden. Die siRNA führt dann einen weiteren Enzymkomplex (RISC) an die homologe messenger (m) RNA. Die Zielsequenz wird aus der mRNA verdaut und somit das zugehörige Protein nicht exprimiert. Der Mechanismus des RNAi ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abb. 1.2: Mechanismus des „gene silencing“ mit Hilfe der RNAi Methode (Quelle: Benitec.com)** Der Vorgang des posttranskriptionellen „gene silencing“ wurde zum ersten Mal von der Forschergruppe um Jorgensen durchgeführt. Intention war die Produktion von Blütenfarbstoff in Petunien durch Einbringen von zusätzlichen Kopien des dafür benötigten Gens anzuregen. Das Gegenteil war der Fall, die genetisch veränderten Petunien waren zum Teil schneeweiß (Napoli et al., 1990). Grundlage dieser Beobachtung war der Mechanismus des „gene silencing“ mittels RNAi. Dieser wurde von Fire et al. (1998) am Beispiel des Fadenwurms *C.elegans* untersucht und beschrieben. Hierfür erhielten Fire und Mello den Nobelpreis für Medizin 2006. Der Mechanismus, der zum gezielten Abbau der mRNA führt, wurde von Baulcombe (1999) publiziert. Die Technik konnte erst von Elbashir et al. (2001) auf höhere Eukaryonten übertragen werden. Eukaryonten reagieren auf lange doppelsträngige (ds) RNAs mit Apoptose. Nur kurze 21 Nukleotide umfassende dsRNAs können hier verwendet werden, diese sind für eine Gensuppression funktionell. Zur Zeit laufen intensive Forschungen über die Möglichkeiten der Nutzung der RNAi Methode zur Heilung von Krankheiten.

Erste Versuche zur Hemmung der Allergenexpression in Pflanzen mittels RNAi wurden bereits durchgeführt. Die RNAi vermittelte Hemmung eines Hauptallergens des Apfels (Mal d 1) wurde



ausschließlich in den Blättern mittels IgG- und IgE-Immunoblot verifiziert. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Antikörper oder einem Serumpool von Mal d 1 positiven Apfelallergikern. Bei allen untersuchten transformierten Apfelinien konnte in den Blättern kein oder signifikant weniger Mal d 1 im Vergleich zu den Wild Typen detektiert werden. Bei drei Patienten wurden *in vivo* Untersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse des *in vitro* Testes bestätigt. Die Blätter der transgenen Linien zeigten im Skin Prick Test eine geringere allergene Potenz als der Wild Typ (Gilissen et al., 2005). Erste Resultate gibt es auch von der Unterdrückung von Ara h 2 in der Erdnuss. Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Southern und Northern Blotting konnte eine erfolgreiche Unterdrückung von Ara h 2 in Erdnusspflänzchen bewiesen werden (Dodo et al., 2005). In beiden Studien wurden nicht die verzehrten Früchte sowie die Stabilität des „silencing“ über mehrere Generationen hinweg untersucht.

## 2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Studie sollte als „proof of concept“ untersucht werden, ob die Unterdrückung der Expression von Allergenen durch die Anwendung der RNAi-Technologie möglich ist. Als Modellpflanze wurde die Tomate ausgewählt. Gearbeitet wurde in einer Kooperation mit Prof. U. Sonnewald und L. LeQuynh vom Institut für Biochemie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg. Diese Dissertation befasst sich mit der Identifikation und Charakterisierung der Zielproteine aus der Tomate, deren Expression mit Hilfe der RNAi Technologie gehemmt werden sollte. Da auf Patientenseren aus Deutschland, dem spanischen Inland und der spanischen Küstenregion zurückgegriffen wurde, war eine ausführliche Untersuchung von Unterschieden des Sensibilisierungsmusters bezogen auf die geographische Herkunft möglich. Im Mittelpunkt stand die Charakterisierung des zu Beginn der Studie noch weitgehend unbekanntes Tomaten LTP. Hierzu gehörte die Reinigung von natürlichem LTP, die Bestimmung der Prävalenz der IgE-Bindung, die Untersuchung der Stabilität bei Verdau und der Prozessierung von tomatenhaltigen Lebensmitteln sowie Untersuchungen der Konformation der IgE-bindenden Epitope. Das Ziel war außerdem, mögliche Tomaten LTP Isoformen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zu identifizieren. Zwei aus der Datenbank ausgewählte LTP Isoformen sollten für einen Vergleich der IgE-Bindungskapazität und der allergenen Potenz kloniert und in *Escherichia coli* (*E.coli*) exprimiert werden.

Die in Erlangen hergestellten gentechnisch veränderten Pflanzen wurden dem Paul-Ehrlich-Institut für eine Allergenitätsbewertung zur Verfügung gestellt. Ziel war die Gewinnung von Erkenntnissen über die Effizienz der Methode und die Stabilität des „gene silencing“ über mehrere Generationen hinweg. Außerdem sollte eine mögliche Überexpression anderer IgE-bindender Proteine, welche die Funktion des supprimierten Proteins übernehmen, untersucht werden. Treten durch die Hemmung der Expression des Zielproteins phänotypische Unterschiede verglichen mit dem Wild Typ (WT) auf, so sollte eine Rekonstitution der Proteinfunktion mit einer hypoallergenen Variante des Zielproteins erfolgen.

### 3. Material

#### 3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Qualität „zur Analyse (per analysis, p.a.)“ verwendet. Spezielle Chemikalien, Verbrauchsmittel, Geräte und Kits sind in der Methodenbeschreibung aufgeführt.

#### 3.2 Primer

##### 3.2.1 Primer zur Klonierung von Protein-cDNA

Folgende Primer zur Klonierung von Protein-cDNA wurden von der Firma MWG (Martinsried) bezogen. Komplementäre 5' Überhänge für die direktionale Klonierung in die pET100 und pET101/D-TOPO<sup>®</sup> Vektoren sind fett gekennzeichnet, Enzymschnittstellen unterstrichen, Stopkodons kursiv geschrieben und die PreScission Protease Schnittstelle in grau markiert.

Lyc e 3.1 in pET100/D-TOPO<sup>®</sup>:

LTP G1 Fow 1: 5'-**CACCT**TAACTTGTGGTCAAGTTACATC-3'

LTP G1 Rev: 5'-TTAGTCGACCTGAACTTTAGAACAGTC-3'

Lyc e 3.2 in pET100/D-TOPO<sup>®</sup>:

LTP G2 Fow 1: 5'-**CACCG**AGTCACTGAGCTGCGGCG-3'

LTP G2 Rev: 5'-TTATCGACCTGGACCGTTGAGCAATC-3'

Lyc e 3.1 in pET-32a und pGEX-6P-1:

G1\_Bam\_fow: 5'-GCGGGATCC**T**TAACTTGTGGTCAAGTT-3'

G1\_Not\_rev: 5'-GGCGCGGCCGC**T**TAGTCGACCTGAACTTTAG-3'

Lyc e 3.2 in pET-32a und pGEX-6P-1:

G2\_Bam\_fow: 5'-GCGGGATCC**T**GAGCTGCGGCG-3'

G2\_Not\_rev: 5'-GGCGCGGCCGC**T**TATCGACCTGGACCGTTG-3'

Lyc e 3.1 in pET-32a mit PreScission<sup>™</sup> Protease Schnittstelle:

G1\_Bam\_fow\_PP: 5'-GCGGGATCC**C**CTGGAAGTGCTGTTTT**C**AGGGCCCG**T**TAACTTGTGGTCAAG-3'

G1\_Not\_rev: 5'-GGCGCGGCCGC**T**TAGTCGACCTGAACTTTAG-3'

Lyc e 3.2 in pET-32a mit PreScission<sup>™</sup> Protease Schnittstelle:

G2\_Bam\_fow\_PP\_II: 5'-GCGGGATCC**C**CTGGAAGTGCTGTTTT**C**AGGGCCCG**C**TGAGCTGCGGCG-3'

G2\_Not\_rev: 5'-GGCGCGGCCGC**T**TATCGACCTGGACCGTTG-3'

Hefeprofilin in pET101/D-TOPO®:

YPFN\_fow: 5'-**CACCATGTCTTGGCAAGCATACACTG**-3'

YPFN\_rev\_II: 5'-GTATTGAACACCAATCAAGTA-3'

### 3.2.2 Primer für die Kolonie-PCR und zur Sequenzierung

pCR®2.1-TOPO®:	M13 Reverse Primer (-29) <i>fow</i>	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
	T7 Promotor <i>rev</i>	5'-CCCTATAGTCAGTCGTATTA-3'
pCR®II-TOPO®:	SP6 Promotor <i>fow</i>	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
	T7 Promotor <i>rev</i>	5'-CCCTATAGTCAGTCGTATTA-3'
pET100/D-TOPO®:	T7 Promotor <i>fow</i>	5'-CCCTATAGTCAGTCGTATTA-3'
	T7 Terminator <i>rev</i>	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'
pET101/D-TOPO®:	T7 Promotor <i>fow</i>	5'-CCCTATAGTCAGTCGTATTA-3'
	T7 Terminator <i>rev</i>	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'
pET-32a:	T7 Promotor <i>fow</i>	5'-CCCTATAGTCAGTCGTATTA-3'
	T7 Terminator <i>rev</i>	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'
pGEX-6P-1:	pGEX <i>fow</i>	5'-ATAGCATGGCCTTTGCAGG-3'
	pGEX <i>rev</i>	5'-GAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

### 3.3 Pufferlösungen, Nährmedien und Nährböden

Pufferlösungen, Nährmedien und Nährböden stammen soweit nicht anders beschrieben aus der Medienküche des Paul-Ehrlich-Instituts.

#### Lösungen

PBS	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 3 mM KCl; pH 7,2
TBS	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl; pH 7,4
TAE Puffer (20x)	800 mM Tris, 2,28 % (v/v) CH <sub>3</sub> COOH, 25 mM EDTA; pH 8,5
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS
LB-Medium	10 g/l Bakto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Amp Platten	15 g Agar-Agar, 100 mg Ampicillin, 0,2 mM IPTG, ad 1L LB-Medium
LB-Amp-X-Gal Platten	15 g Agar-Agar, 90 mg X-Gal, 0,2 mM IPTG, 100 mg Ampicillin, ad 1L LB-Medium

### 3.4 Seren und Antikörper

#### 3.4.1 Primärantikörper

##### 3.4.1.1 Patientenseren

Die deutschen Patientenseren stammen aus dem Serumbestand freiwilliger Spender des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI). Die restlichen Seren stammen aus folgenden spanischen Kliniken: Hospital Universitari de Girona, Girona (spanische Küste); Hospital General de Castellon, Castellon (spanische Küste); Universitari Dexeus, Barcelona (spanische Küste); sowie Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (spanisches Inland). Einschlusskriterien waren charakteristische Symptome einer allergischen Reaktion vom Soforttyp nach Verzehr von Tomaten und der Nachweis von Tomaten-spezifischem IgE im Serum, gemessen mittels „Capture Fluoreszenz Enzym Immuno Assay“ (CAP-FEIA, Kap. 4.2.8).

**Tab. 3.1: Übersicht über die Patientenseren mit Symptomatik nach Verzehr von Tomate, Diagnose der Tomatenallergie, zusätzliche Nahrungsmittel bzw. Latexallergie.**

Serum	Symptome	SPT	CAP	sonstige Allergien (Anamnese)
<b>Deutschland</b>				
1 BO 9	E	-	4	keine
2 BO 14	J	-	3	keine
3 BO 15	OAS	n.d.	4	Birne, Kartoffel
4 BO 32	OAS	n.d.	2	keine
5 BO 33	G, OAS	+	2	keine
6 BO 41	OAS	n.d.	3	keine
7 BO 47	OAS	-	2	keine
8 BO 93	OAS, U	+	2	keine
9 BO 96	OAS	+	2	Kirsche
10 BO 97	OAS	n.d.	5	keine
11 BO 134	OAS	-	2	keine
12 BO 191	OAS	+	3	Latex
13 PEI 6	OAS	+	2	Ananas, Banane, Latex
14 PEI 7	OAS	+	3	Banane, Sellerie, Birne, Latex
15 PEI 14	U	+	3	keine
16 PEI 26	G	+	4	Kartoffel
17 PEI 50	E	n.d.	2	Kirsche, Ananas, Birne

18	PEI	66	OAS	-	3	keine
19	PEI	87	OAS	n.d.	1	Kartoffel, Sellerie, Birne
20	PEI	89	OAS	+	4	Latex
21	PEI	90	OAS	-	2	Latex
22	PEI	92	OAS	n.d.	2	keine
23	PEI	94	OAS	-	2	keine
24	PEI	99	OAS	+	2	Kartoffel, Latex, Ananas, Birne
25	PEI	101	G	+	3	keine
26	PEI	104	OAS	+	2	Latex
27	PEI	115	OAS	+	3	Birne
28	PEI	122	J	-	1	Kartoffel
29	PEI	128	OAS	n.d.	2	Kirsche, Ananas, Birne, Kartoffel
30	PEI	131	OAS	n.d.	3	Kirsche, Ananas, Lychee, Sellerie, Birne, Kartoffel
31	PEI	144	OAS	-	2	Ananas, Birne, Kartoffel
32	PEI	155	OAS	n.d.	1	Kirsche, Ananas, Birne
33	PEI	167	AN	n.d.	1	Sellerie
34	PEI	197	OAS	n.d.	3	Kirsche, Kartoffel
35	PEI	199	OAS	n.d.	2	keine
36	PEI	201	OAS	n.d.	3	Sellerie, Birne
<b>spanische Küste</b>						
37	AFC	7241	OAS	n.d.	2	Salat, Haselnuss, Zwiebel
38	CS	1	OAS, H	+	4	Haselnuss, Erdnuss, Soja, Linsen, Erbsen, Mais
39	CS	3	OAS, H, GI, R	+	3	Pfirsich, Kirsche, Nektarine, Apfel, Birne, Kiwi, Walnuss, Erdnuss, Mais
40	CS	4	OAS	+	2	Pfirsich, Apfel
41	CS	5	OAS, G	+	2	Pfirsich, Haselnuss, Mandel, Walnuss, Erdnuss, Erbsen
42	CS	8	OAS	+	2	Pfirsich
43	CS	9	OAS	+	2	Pfirsich, Kirsche, Aprikose, Nektarine, Apfel, Birne, Nüsse, Karotte, Soja, Bohne
44	CS	10	OAS, H	+	3	Pfirsich, Aprikose, Nektarine, Mais
45	CS	11	OAS, H, G, R	+	3	Pfirsich, Kirsche, Aprikose, Nektarine, Apfel, Birne, Kiwi, Haselnuss, Mandel, Walnuss, Mais
46	EBO	7957	OAS	n.d.	2	keine
47	GI	1	OAS	+	3	Pfirsich, Birne, Kirsche, Karotte
48	GI	2	OAS	+	1	Pfirsich, Melone
49	GVC	6391	A	n.d.	3	Salat, Haselnuss
50	MCB	7597	OAS	n.d.	3	keine
51	PVS	2934	OAS	n.d.	3	Haselnuss, Pfirsich, Kastanie, Traube, Melone
<b>spanisches Inland</b>						
52	AGM	2011437	OAS	n.d.	2	Melone
53	CMC	2010323	OAS	+	2	Kirsche, Banane, Ananas, Kastanie, Haselnuss, Mandel, Pistazie, Latex, Traube, Erdbeere, Avocado, Pfirsich
54	ETMP	2011575	OAS	n.d.	2	Melone, Pflaume, Aprikose, Erdbeere, Banane, Mandarine
55	GMAM	2020111	G, AN, J	-	2	keine
56	GRS	960550	U	n.d.	4	keine
57	JNM	2011010	OAS	+	4	Melone, Banane
58	LMC	980567	OAS	+	1	keine
59	MAY	981345	C	+	4	Pfirsich
60	MBM	990690	C	+	4	Avocado, Haselnuss, Erdbeere, Pistazie, Melone
61	MCS	990911	OAS	+	2	Walnuss, Melone, Banane
62	MRRM	970772	C	+	4	keine
63	NLA	971101	OAS	n.d.	2	keine
64	PCC	970458	OAS, C	-	2	keine
65	RMD	2010751	AN, OAS, G	+	4	Melone, Pfirsich, Birne
66	RMP	2000909	U	+	3	Latex, Kirsche, Melone, Pfirsich
67	SCA	2010081	OAS	+	2	Pfirsich, Avocado
68	SMJ	2011037	OAS	+	3	keine
69	SVP	2100057	U	+	2	Pfirsich
70	VPJA	2020476	OAS, U	n.d.	3	keine

H: Haut, G: gastrointestinale Probleme, A: Angioödem, AN: Anaphylaxie, U: Urtikaria, J: Juckreiz, C: Konjunktivitis, E: Ekzem, OAS: Orales Allergie Syndrom, SPT: Skin Prick Test, DB: DBPCFC, OFC: Open Food Challenge, +: positiv, -: negativ, n.d.: nicht durchgeführt

### 3.4.1.2 Kaninchenserum

Tab.3.2: Übersicht über die verwendeten Kaninchenserum mit dem für die Immunisierung verwendeten Immunogen und der Quelle.

Name	Allergen-bezeichnung	Immunogen	Quelle
Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP	Cor a 8	rCor a 8 aus <i>E.coli</i>	Dr. J. Lidholm, Phadia,Uppsala,Schweden
Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP	Pru p 3	nPru p 3	Dr. D. Barber, ALK-Abelló S.A., Madrid, Spanien
Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin	Amb a 8	natürliche Präparation	Dr. P. Deviller, Lyon, Frankreich
Kaninchen-anti-Sellerie-Profilin	Api g 4	natürliche Präparation	Dr. P. Deviller, Lyon, Frankreich

### 3.4.2 Sekundärantikörper

Tab.3.3: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper mit ihrer Markierung, ihren Eigenschaften und ihrer Quelle.

Nr.	Name	Markierung	Monoklonal	Polyklonal	Quelle
	<u>anti-human IgE:</u>				
1	Ziege-anti-human IgE	Biotin		x	KPL, Gaithersburg, MD, USA
2	Kaninchen-anti-human IgE	-		x	DAKO, Hamburg
3	Maus-anti-human IgE	AP	x		Pharmingen, San Diego, CA, USA
4	Maus-anti-human IgE	POD	x		SBA, Birmingham, AL, USA
	<u>anti-Kaninchen IgG:</u>				
5	Ziege-anti-Kaninchen IgG	Biotin		x	DAKO, Hamburg

AP: Alkalische Phosphatase; POD: Peroxidase

Nach Verwendung des biotinylierten Ziege-anti-human Primärantikörpers wurde Steptavidin-AP (Caltag über Invitrogen, Karlsruhe) als Konjugat benutzt.

### 3.5 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Top 10 one shot	chemically competent cells (Invitrogen, Karlsruhe) F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galJ galK rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG
<i>E.coli</i> BL 21 (DE3)	chemically competent cells (Novagen, Madison, WI, USA) <i>E.coli</i> B F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ (DE3)
<i>E.coli</i> Origami (DE3) singles	chemically competent cells (Novagen, Madison, WI, USA) Δara-leu7697, araD139, ΔlacX74, galE, galK, rpsL, ΔphoAPvull, phoR, F'[lac- (lacIq) pro], gor522::Tn10 (TcR), trxB::kan, (DE3)
<i>E.coli</i> NovaBlue Giga singles	chemically competent cells one shot (Novagen, Madison, WI, USA) endA1 hsdR17(r <sub>K12</sub> - m <sub>K12</sub> +)supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lac <sup>f</sup> ΔM15::Tn10(Tc <sup>R</sup> )]

### 3.6 Plasmide

Tab.: 3.4: Übersicht über die verwendeten Plasmide mit Angabe ihrer selektierbaren Antibiotikaresistenz, Eigenschaften und der entsprechenden Quelle.

Plasmid	Resistenz	Bemerkung	Expressionsprodukt	Referenz/Quelle
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Amp	Klonierungsvektor	ohne Insert	Invitrogen, Karlsruhe
pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	Amp	Klonierungsvektor		Invitrogen, Karlsruhe
pET100/D-TOPO <sup>®</sup>	Amp	Directionaler TOPO <sup>®</sup> Expressionsvektor		Invitrogen, Karlsruhe
pET101/D-TOPO <sup>®</sup>	Amp	Directionaler TOPO <sup>®</sup> Expressionsvektor		Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-6P-1	Amp	Expressionsvektor		Amersham, Freiburg
pET-32a	Amp	Expressionsvektor		Novagen, Madison, WI, USA
pCR2.1-TOPO-3.1	Amp	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO mit integrierter Lyc e 3.1 cDNA	nicht für die Expression genutzt	L. LeQuynh, Erlangen
pCR2.1-TOPO-3.2	Amp	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO mit integrierter Lyc e 3.2 cDNA		L. LeQuynh, Erlangen
pCRII-TOPO-3.1	Amp	pCR <sup>®</sup> II-TOPO mit integrierter Lyc e 3.1 cDNA		diese Arbeit
pCRII-TOPO-3.2	Amp	pCR <sup>®</sup> II-TOPO mit integrierter Lyc e 3.2 cDNA		diese Arbeit
pET100/D-TOPO-3.1	Amp	pET100/D-TOPO <sup>®</sup> mit integrierter Lyc e 3.1 cDNA	Lyc e 3.1 mit N-terminalem 6x Histidin Tag, Xpress Epitop und EK Max Schnittstelle	diese Arbeit
pET100/D-TOPO-3.2	Amp	pET100/D-TOPO <sup>®</sup> mit integrierter Lyc e 3.2 cDNA	Lyc e 3.2 mit N-terminalem 6x Histidin Tag, Xpress Epitop und EK Max Schnittstelle	diese Arbeit
pGEX-6P-1-3.1	Amp	pGEX-6P-1 mit integrierter Lyc e 3.1 cDNA	Lyc e 3.1 mit N-terminalem GST-Tag und PP Schnittstelle	diese Arbeit
pGEX-6P-1-3.2	Amp	pGEX-6P-1 mit integrierter Lyc e 3.2 cDNA	Lyc e 3.2 mit N-terminalem GST-Tag und PP Schnittstelle	diese Arbeit
pET-32a-3.1	Amp	pET-32a mit integrierter Lyc e 3.1 cDNA	Lyc e 3.1 mit N-terminalem 6x Histidin und S-Tag sowie Thrombin und EK Max Schnittstelle	diese Arbeit
pET-32a-3.2	Amp	pET-32a mit integrierter Lyc e 3.2 cDNA	Lyc e 3.2 mit N-terminalem 6x Histidin und S-Tag sowie Thrombin und EK Max Schnittstelle	diese Arbeit
pET-32a-PP-3.1	Amp	pET-32a mit integrierter Lyc e 3.1 cDNA & N-terminaler PP Erkennungssequenz	Lyc e 3.1 mit N-terminalem 6x Histidin und S-Tag sowie Thrombin, EK Max und PP Schnittstelle	diese Arbeit
pET-32a-PP-3.2	Amp	pET-32a mit integrierter Lyc e 3.2 cDNA & N-terminaler PP Erkennungssequenz	Lyc e 3.2 mit N-terminalem 6x Histidin und S-Tag sowie Thrombin, EK Max und PP Schnittstelle	diese Arbeit
pET101/D-TOPO-Lyc e 1	Amp	pET101/D-TOPO <sup>®</sup> -mit integrierter Lyc e 1 cDNA	Lyc e 1 ohne Tag	S. Westphal, PEI
pCR2.1-TOPO-YPFN	Amp	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO mit integrierter YPFN cDNA	nicht für die Expression genutzt	L. LeQuynh, Erlangen
pET101/D-TOPO-YPFN	Amp	pET101/D-TOPO <sup>®</sup> -mit integrierter YPFN cDNA	YPFN mit N-terminalem 6x Histidin Tag	diese Arbeit

PP: PreScission<sup>®</sup> Protease, Amp: Ampicillin



## 4. Methoden

### 4.1 Klonierung und Expression von Protein-cDNA

#### 4.1.1 PCR

Alle PCRs wurden im Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 2700 Cycler von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Umklonierung von Lyc e 3.1 (Acc.No. Gi 30319742) und Lyc e 3.2 (Acc.No. Gi 1816534) aus dem Vektor pCR2.1-TOPO-3.1 und pCR2.1-TOPO-3.2 bzw. Hefeprofilin (YPFN) aus dem Vektor pCR2.1-TOPO-YPFN (Tab. 3.4) in das Expressionssystem pET100/D-TOPO<sup>®</sup> bzw. pET101/D-TOPO<sup>®</sup> wurde mittels PCR durchgeführt. Für Lyc e 3.1 wurden die Primer LTP G1 Fow 1 und LTP G1 Rev verwendet sowie LTP G2 Fow 1 und LTP G2 Rev für Lyc e 3.2 (Kap. 3.2). Für YPFN wurden die Primer YPFN\_fow und YPFN\_rev\_II (Kap. 3.2.1) verwendet. Der Reaktionsansatz und das Programm für die PCR ist Tabelle 4.1 zu entnehmen. Da für die Ligation in pET100/D-TOPO<sup>®</sup> glatte Enden benötigt werden, wurde die Polymerase Pwo (aus *Pyrococcus woesei*; peQ Lab, Erlangen) verwendet. Der Reaktionsansatz und das Programm für die PCR ist in Tab. 4.1 beschrieben.

Für die Ligation der PCR Produkte in pCR-II-TOPO wird ein A-Überhang benötigt, weshalb die PCR mittels Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte (Tab. 4.2). Der pCR-II-TOPO Vektor wurde zur Überprüfung der korrekten Sequenz und der korrekten Einfügung von Schnittstellen bei der Klonierung der Konstrukte pET-32a-3.1 und -3.2, pGEX-6P-1-3.1 und -3.2, sowie pET-32a-PP-3.1 und -3.2 verwendet.

**Tab. 4.1: Reaktionsansatz und Programm für die PCR mit Pwo-Polymerase.**

			Min.
Plasmid (pCR2.1-TOPO-3.1 bzw. -3.2) (pCR2.1-TOPO-YPFN)	1 µl		
Primer <i>fow</i> (10 pmol)	4 µl	94°C	02:00 initiale Denaturierung
Primer <i>rev</i> (10 pmol)	4 µl	94°C	00:15 Denaturierung
dNTP mix (10 mM jeweils)	6 µl	50°C	00:30 Annealing
10x Pwo Reaktionspuffer	5 µl	68°C	01:00 Elongation
Pwo-DNA-Polymerase	1,5 U	68°C	07:00 finale Elongation
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

**Tab. 4.2: Reaktionsansatz und Programm für die PCR mit Platinum Taq-Polymerase.**

			Min.
Plasmid (pCR2.1-TOPO-3.1 bzw. -3.2)	1 µl		
Primer <i>fow</i> (10 pmol)	1 µl	94°C	02:00 initiale Denaturierung
Primer <i>rev</i> (10 pmol)	1 µl	94°C	00:30 Denaturierung
dNTP mix (10 mM jeweils)	2 µl	55°C	00:30 Annealing
10x Taq Polymerase PCR Puffer -MgCl <sub>2</sub>	5 µl	72°C	01:00 Elongation
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	72°C	07:00 finale Elongation
Taq-DNA-Polymerase	1 U		
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

Die PCR Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 4.1.5) kontrolliert und gegebenenfalls gereinigt (Kap. 4.1.2).

Puffer und Lösungen

10x Pwo Reaktionspuffer:	100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 250 mM KCl, 20 mM MgSO <sub>4</sub>
10x Taq Polymerase PCR Puffer –MgCl <sub>2</sub> :	200 mM Tris (pH 8,4), 500 mM KCl

**4.1.2 Reinigung der PCR Produkte**

Die PCR Produkte wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid angefärbt (Kap. 4.1.5), die unter UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIA Quick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das Kit beruht auf der Bindung der DNA an eine siliziumhaltige Membran. Nach einigen Waschschritten zur Entfernung von Ethidiumbromid, Agarose und Salzen wird die DNA mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Die Reinigung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Färbung des Gels kontrolliert.

**4.1.3 Restriktionsverdau**

Vor der Ligation der Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2 cDNA in die Expressionsvektoren pET-32a und pGEX-6P-1 zur Bildung der Konstrukte pET-32a-3.1 bzw. -3.2, pET-32a-PP-3.1 bzw. -3.2 sowie pGEX-6P-1-3.1 bzw. -3.2 (Tab. 3.4) wurden die Isoformen mittels der eingefügten Restriktionsstellen aus dem Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> herausgeschnitten. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den Enzymen BamHI und NotI (New England Biolabs, Frankfurt) unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Da BamHI und NotI unterschiedliche Reaktionspuffer benötigen, erfolgte der Verdau sequentiell erst mit BamHI und dann mit NotI, wobei die DNA nach dem ersten Reaktionsschritt nicht gereinigt wurde. Der erste Reaktionsansatz beinhaltete 25 µl des wie unter 4.1.8 beschrieben isolierten Plasmids pCR<sup>®</sup>II-TOPO-3.1 bzw. -3.2, 3 µl Reaktionspuffer NEBuffer 2 sowie 2 µl BamHI und 0,3 µl BSA. Die Inkubation des 30 µl Ansatzes erfolgte über 3 Std. bei 37°C. Anschließend wurden 3 µl des Reaktionsgemisches für ein Kontrollgel entfernt und mit DNA Laufpuffer versetzt. Von dem Enzym NotI wurden 2,5 µl sowie 3,5 µl des dazugehörigen NEBuffers 3 und 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hinzugegeben. Der Verdau des 35 µl Ansatzes erfolgte ebenfalls über 3 Std. bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Braunschweig). Die Kontrolle und Aufreinigung (Kap. 4.1.2) des Verdauproduktes erfolgte im Agarose-Gel (Kap. 4.1.5). Die verwendeten Vektoren wurden vor der Ligation (Kap. 4.1.4.2) mit den Verdauprodukten ebenfalls wie oben beschrieben verdaut und gereinigt.

Puffer und Lösungen

10x NEBuffer 2:	500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, pH 7,9
10x NEBuffer 3:	500 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, pH 7,9

#### 4.1.4 Ligation von cDNA in Klonierungs- und Expressionsvektoren

##### 4.1.4.1 Ligation in TOPO Vektoren

Die Vektoren pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>, pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>, pET100/D-TOPO<sup>®</sup> und pET101/D-TOPO<sup>®</sup> (Tab. 3.4) sind mit *Vaccinia* Topoisomerase, die eine Ligaseaktivität besitzt, konjugiert und liegen in linearisierter Form vor. Die Ligationen wurden mit einem molaren Verhältnis Vektor : Insert von ca. 1:5 durchgeführt. Der Ligationsansatz setzte sich aus maximal 4 µl PCR Produkt, 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO Vektor zusammen und wurde auf ein Endvolumen von 5 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt. Die Reaktion wurde für 5 Min. auf Eis inkubiert, bevor die Transformation erfolgte (Kap. 4.1.6).

##### Puffer und Lösungen

Salzlösung:	1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl
-------------	-------------------------

##### 4.1.4.2 pET-32a und pGEX-6P-1

Die Ligation der verdauten, gereinigten cDNA in den geschnittenen Vektor (Kap. 4.1.3) erfolgte mit Hilfe des Ligation Express Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) nach Angaben des Herstellers. Vektor (1 µl) und Insert (max. 6 µl) wurden in einem molaren Verhältnis von ca. 1:5 über Nacht in Plasmid Ligation Buffer (10 µl) zusammen mit 1,2 µl 10 mM ATP und 1 µl T4 DNA Ligase aus dem Kit bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ligationsreaktion 1 µl Glykogen zur Visualisierung der präzipitierten DNA hinzugefügt. Die DNA-Präzipitation erfolgte über eine Ethanolfällung ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Das trockene Pellet wurde vollständig mit 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

#### 4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR (Kap. 4.1.1), der Kolonie-PCR (Kap. 4.1.7.2), von Restriktionsverdauen (Kap. 4.1.3) und der Plasmidisolierung (Kap. 4.1.8) wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierfür wurden 1 oder 2% (w/v) Agarose (Biolone, Luckenwalde) in einfach TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Die Gellösung wurde dann je nach Probenumfang in eine „Rapid Agarose Gel Elektrophoresis System“ (RAGE, Biokey, American Instrument, Inc., Portland, OR, USA) Gelkammer 9.7 x 5.5 cm (RGX 60) bzw. 12.4 x 9.6 cm (RGX 100) gegossen. Das gehärtete Gel wurde dann in die RAGE Kammer eingesetzt und die mit 6x Probenpuffer versetzten DNA Proben in einem Volumen von 6 µl in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 210 V (RGX 60) bzw. 260 V (RGX 100). Anschließend wurden die Gele für ca. 10 Min. in ein Ethidiumbromidbad (75 µg Ethidiumbromid/ml H<sub>2</sub>O) gelegt und unter UV-Licht mit 320 Nanometer (nm) mit einem Geldokumentationssystem (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

##### Puffer und Lösungen

1x TAE:	20 x TAE 1:20 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> verdünnt
6x Probenpuffer:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15% Ficoll 400

#### 4.1.6 Transformation von Bakterien

Die Transformation der chemisch kompetenten Zellen (Kap. 3.5) mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten Plasmiden erfolgte über die Hitzeschock-Methode. Die Bakterienzellen wurden durch Inkubation mit Kalziumchlorid kompetent gemacht, sie nehmen bei 4°C DNA auf. Durch Hitzeschock wird die Aufnahme von DNA gestoppt.

Der Ligationsansatz bzw. die präparierte Plasmid DNA wurde entweder zur Überprüfung der DNA-Sequenz (Kap. 4.1.9) oder zur Proteinexpression (Kap. 4.1.10) in *E.coli* Stämme übertragen. Hierzu wurden 50 µl der kompetenten Bakterien für 5 Min. auf Eis aufgetaut. Eine Übersicht über die Transformation der Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid gibt Tabelle 4.3. Nach Zugabe von 3 µl Ligationsansatz (Kap. 4.1.4) bzw. 1 µl (ca. 1 ng) des unter Tab. 3.4 aufgeführten Plasmids wurde das Reaktionsgemisch 20 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 30 Sek. bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und nach Zugabe von 200 µl S.O.C. Medium (Invitrogen, Karlsruhe) 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann bei 3000 rpm 5 Min. pelletiert, in 50 µl S.O.C. Medium aufgenommen und auf vorgewärmten Selektivmedium-Platten ausplattiert.

**Tab. 4.3: Übersicht über die Transformation der Plasmide in die entsprechenden *E. coli* Stämme.**

Plasmid	<i>E. coli</i> Stamm
pCRII-TOPO-3.1 bzw. -3.2	Top 10 one shot
pCR2.1-TOPO- YPFN	Top 10 one shot
pET100/D-TOPO-3.1 bzw. -3.2	Top 10 one shot, BL 21 (DE3)
pGEX-6P-1 -3.1 bzw. -3.2	Top 10 one shot, BL 21 (DE3), Origami (DE3) singles
pET-32a - 3.1 bzw. -3.2	NovaBlue Giga Singles, BL 21 (DE3), Origami (DE3) singles
pET32a -PP-3.1 bzw. -3.2	NovaBlue Giga Singles, BL 21 (DE3), Origami (DE3) singles
pET101/D-TOPO-YPFN	Top 10 one shot, BL 21 (DE3)
pET101/D-TOPO-Lyc e 1	Top 10 one shot, BL 21 (DE3)

#### Puffer und Lösungen

S.O.C. Medium:	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
----------------	--

#### 4.1.7 Selektion der transformierten Bakterien

Eine primäre Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch die Zugabe von Antibiotika (abhängig von der vermittelten Resistenz des verwendeten Vektors) zu den zur Kultivierung verwendeten Nährböden (Kap. 3.3).

##### 4.1.7.1 Blau-weiß Selektion

Der Vektor pCR-II-TOPO trägt ein *lacZ* $\alpha$ -Gen, welches für das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase kodiert. Durch Abspaltung des Zuckerrestes setzt dieses Enzym 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosidase (X-Gal) in einen blauen Farbstoff (5-Brom-4-chlor-3-indigo) um. Durch Ligation des Inserts in den kodierenden Bereich des *lacZ* $\alpha$ -Gens wird dieses inaktiviert und somit kein blauer Farbstoff gebildet. Dies ermöglicht die Selektion von Klonen mit Insert (weiß) gegenüber Klonen ohne Insert (blau). Für

die blau-weiß Selektion wurden die transformierten Bakterien auf LB-Amp-X-Gal Platten (Kap. 3.3) ausplattiert.

#### 4.1.7.2 Kolonie PCR

Für die Kolonie PCR wurde pro Ansatz eine gut separierte Einzelkolonie von der Agarplatte mit einer sterilen Impfnadel abgenommen und in den Reaktionsansatz überführt. Für die PCR wurden vektorspezifische Primer verwendet. Tabelle 4.4 beschreibt den Reaktionsansatz und das Programm der Kolonie PCR.

Die einzelnen PCR Ansätze wurden mit Hilfe von Agarose-Gelen (Kap. 4.1.5) analysiert. Von Kolonien, die im Agarose-Gel eine Bande in der erwarteten Größe zeigten, wurde eine Plasmidisolierung (Kap. 4.1.8) durchgeführt. Die präparierte DNA wurde zur Sequenzanalyse (Kap. 4.1.9) versandt.

**Tab. 4.4: Reaktionsansatz und Programm für die Kolonie PCR.**

				Min.
Primer <i>for</i> (10 pmol)	0,4 µl			
Primer <i>rev</i> (10 pmol)	0,4 µl	94°C		10:00 initiale Denaturierung
dNTP mix (10 mM jeweils)	0,4 µl	94°C		01:00 Denaturierung
10x Taq-Polymerase PCR Puffer -MgCl <sub>2</sub>	2 µl	50°C	} 30 Zyklen	01:00 Annealing
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 µl	72°C		02:00 Elongation
51 mM MgCl <sub>2</sub>	0,4 U	72°C		02:00 finale Elongation
52 mM MgCl <sub>2</sub>	ad 20 µl			

#### 4.1.8 Plasmidisolierung

Zur Isolation von Plasmiden aus über Nacht Bakterienkulturen (Kap. 4.1.10) wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip beruht auf der Lyse der Zellen und anschließender Entfernung von chromosomaler DNA und Proteinen durch Präzipitation und Zentrifugation. Danach wird die DNA an eine siliziumhaltige Membran gebunden, gewaschen und mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Die DNA Ausbeute wurde spektrometrisch bestimmt (Kap. 4.2.9.4) und die Reinheit im Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung ermittelt (Kap. 4.1.5).

#### 4.1.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech AG, Martinsried mit den unter 3.2 aufgeführten Primern zur Sequenzanalyse durchgeführt. Ungefähr 1 µg Plasmid-DNA wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß an der Luft getrocknet und versendet. Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Vektor NTI Advance 9.0 (Invitrogen, Karlsruhe).

#### 4.1.10 Proteinexpression und über Nacht Kultur für die Plasmidpräparation

Für die Proteinexpression im 1 l Maßstab wurde LB-Medium mit 50 µg/ml Carbencillin (Roth, Karlsruhe) als Ampicillin-Analogon versetzt. Hiervon wurden 10 ml für eine über Nacht Kultur und

anschließende Proteinexpression und 6 ml für eine über Nacht Kultur und anschließende Plasmidpräparation abgenommen und in ein 50 ml-Falcon überführt. Die Falcons mit dem LB-Medium wurden mit *E.coli*, die mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert waren, beimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde entweder die Plasmidisolierung (Kap. 4.1.8) durchgeführt oder von der Vorkultur 1 ml in 1 l LB-Carb-Medium für die Proteinexpression aufgenommen. Danach wurde die Inkubation im 5 l Erlenmeyerkolben bei 37°C fortgesetzt. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte (OD)<sub>600</sub> von ungefähr 0.6 (Kap. 4.2.9.1) wurde der Suspension IPTG (Roth, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 1 mM zur Induktion der Proteinsynthese zugesetzt. Vorher wurde der Kultur 500 µl Suspension zur Kontrolle der Expression abgenommen. Die Proteinsynthese erfolgte über ca. 4 Std., wobei jede Stunde eine Kontrollprobe für die Zeitkinetik der Expression entnommen wurde. Die Expression wurde mittels Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Kap. 4.2.4.1) dokumentiert. Nach der Proteinsynthese wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SLA 3000) bei 3000 rpm geerntet und das Pellet in entsprechendem Aufschlusspuffer aufgenommen (Kap. 4.1.11).

#### **4.1.11 Aufschluss von *E.coli* Zellen**

Zellaufschlüsse wurden unter nativen (Kap. 4.1.11.1) oder denaturierenden Bedingungen (Kap. 4.1.11.2) sowie mit Hilfe von Ultraschall (Kap. 4.1.11.3) durchgeführt. Nach jedem Aufschlussverfahren wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS 34; 10000 rpm, 60 Min., 4°C) von Membranen und Zelltrümmern abgetrennt und konnte zur Reinigung des rekombinanten Proteins eingesetzt werden.

##### **4.1.11.1 Nativer Aufschluss**

Die Resuspendierung der Bakterienpellets aus der 1 l Kultur (Kap. 4.1.10) erfolgte in ca. 10 ml Lysispuffer. Anschließend wurde die Suspension dreimal in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und wieder aufgetaut.

##### **4.1.11.2 Denaturierender Aufschluss**

Bei dem denaturierten Aufschluss wurden die Zellen in Lysispuffer, der entweder 6 M Harnstoff oder 6 M Guanidinchlorid enthielt, resuspendiert und ca. 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

##### **4.1.11.3 Aufschluss mit Hilfe von Ultraschall**

###### **4.1.11.3.1 Nativ**

Zur Ultraschallbehandlung (auf Eis, 3 x 30 Sek.) wurde nativ aufgeschlossenes Material (Kap. 4.1.11.1) verwendet. Zwischen den Behandlungen erfolgte eine ca. einminütige Pause, um ein übermäßiges Erhitzen der Probe zu verhindern.

#### 4.1.11.3.2 Denaturierend

Bei dem Aufschluss der Zellen nach Expression von rLyc e 3.1 ohne Anhangssequenz aus dem Konstrukt pET-32a-PP-3.1 wurde ein Versuch mit reduzierendem Lysispuffer durchgeführt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte wie unter Kap. 4.1.11.3.1 beschrieben.

<u>Puffer und Lösungen</u>	
Lysispuffer:	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 2 mM Imidazol, pH 8,0
Lysispuffer mit Harnstoff:	6 M Harnstoff, 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 2 mM Imidazol, pH 8,0
Lysispuffer mit Guanidin-Chlorid:	6 M Guanidin-Chlorid, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
reduzierender Lysispuffer:	Lysispuffer mit 5 mM β-Mercaptoethanol

## 4.2 Proteinchemische und immunchemische Methoden

### 4.2.1 Proteinextraktionen aus der Tomatenfrucht

#### 4.2.1.1 Tieftemperatur-Methode

Zur detaillierten Analyse der Proteine aus der Tomate wurden Extrakte aus der Schale und aus dem Fruchtfleisch von reifen spanischen Tomaten mit Hilfe der Tieftemperatur-Methode (Viehts et al., 1992) hergestellt. Die Schale wurde von dem Fruchtfleisch abgezogen und beides getrennt voneinander sofort in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Nachdem die Probe pulverisiert war, wurde das Pulver in ca. 200 ml eiskalten Diacetonalkohol (4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon, Merck, Darmstadt) gegeben und mit Hilfe eines Biohomogenizers (ESGE, Mettlen, Schweiz) homogenisiert. Danach wurde ca. 300 ml eiskaltes Aceton hinzugefügt, homogenisiert und die Mischung über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Filtration mit einer Porzellannutsche durch einen Rundfilter (Filtertyp 595, Schleicher & Schüll, Dassel). Der Filtrerrückstand wurde zweimal mit eiskaltem Aceton und anschließend einmal mit einem eiskalten Aceton-Diethylether-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v:v) gewaschen und über Nacht gefriergetrocknet (Lyovac, Lyophilisator, Leybold, Hanau). Das Acetonpulver wurde bis zur Extraktion bei -20°C gelagert. Die Extraktion von 1 g Acetonpulver erfolgte entweder in ca. 15 ml PBS (pH 7,2) oder Ammoniumcarbonat Puffer im Über-Kopf-Schüttler bei 4°C, über 4 Std. Nach der Extraktion wurde die Suspension für 30 Min. bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor SLA 3000, 10000 rpm). Der Überstand wurde über 1,2 µm Zelluloseacetat-Filter (Sartorius, Göttingen) filtriert und die Proteinkonzentration nach Bradford (Kap 4.2.9.2) bestimmt.

<u>Puffer und Lösungen</u>	
Ammoniumcarbonat:	100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8,1

#### 4.2.1.2 Extraktion mittels PBS

Auf Grund der geringen Menge an Material wurden bei der Extraktion der gentechnisch veränderten Tomaten und dem dazugehörigen Wild Typ (Kultivar Microtom) die Proteine unmittelbar in PBS ext-

rahiert. Schale und Fruchtfleisch wurden nicht getrennt. Die Tomaten wurden zerkleinert und in 1 ml PBS pro Gramm Tomate auf Eis homogenisiert. Es erfolgte ebenfalls eine Extraktion im Über-Kopf-Schüttler bei 4°C, 4 Std., die Suspension wurde wie in Kap. 4.2.1.1 beschrieben zentrifugiert, filtriert und die Proteinkonzentration nach Bradford (Kap. 4.2.9.2) bestimmt.

Auch bei der Analyse von prozessierten Tomaten wurde die PBS Extraktion angewandt. Für die Untersuchung der Schale von gekochten Tomaten wurden ganze Tomaten für 5 Min. in kochendes Wasser gelegt, bis die Schale sich vom Fruchtfleisch ablöste. Die Extraktion der Schale erfolgte wie oben beschrieben. Nach demselben Schema wurde auch der Extrakt von getrockneten Tomaten hergestellt. Der Tomatensaft wurde im ersten Schritt zentrifugiert und so die wässrige Phase von den Schwebeteilchen getrennt. Die wässrige Phase wurde direkt zur Analyse verwendet, das Pellet wurde wie oben beschrieben extrahiert.

#### 4.2.1.3 „Direkt Extraktion“ mittels SDS-Probenpuffer

Zur Analyse der Schalen von den Tomaten, die im Hauttest eingesetzt wurden, wurde die Schale von ¼ Tomate in flüssigem N<sub>2</sub> zu Pulver zerkleinert. Dieses Pulver wurde in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und zentrifugiert (Biofuge Frecso, Heraeus, Braunschweig, Rotor Nr. 3325B, 10000 rpm, 5 Min.). Der Überstand wurde sofort zur Analyse auf eine SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) aufgetragen.

##### Puffer und Lösungen

4x SDS-Probenpuffer:	0,5 M Tris-HCl; pH 6,8, 2,5% Glycerin, 1% SDS, 0,005% Bromphenolblau, 0,75% Pyronin-Y
1x SDS-Probenpuffer:	4x SDS-Laufpuffer 1:4 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> verdünnt

#### 4.2.1.4 Proteinextraktion für die chromatographische Reinigung von nLyc e 3

Hierfür wurde Tomatenschalenextrakt von 2,2 kg spanischen Tomaten aus dem Supermarkt (entspricht ca. 165 g Tomatenschale) mit Extraktionspuffer nach Björkstén et al. (1980) modifiziert, durch Vieths et al. (1992) hergestellt. Das Puffervolumen betrug 1,6 ml/g Tomatenschale. Der Zusatz von PVPP, EDTA und DIECA hemmt die durch die Phenoloxidase katalysierte Reaktion zwischen Proteinen und phenolischen Komponenten (Björkstén et al., 1980). Nach einer Homogenisation mit dem Biohomogenizer erfolgte eine Extraktion im Über-Kopf-Schüttler für 3 Std. bei 4°C.

##### Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer:	PBS, 2% PVPP, 2 mM EDTA, 10 mM DIECA, pH 7,2
--------------------	--

#### 4.2.1.5 Proteinextraktion für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die Extraktionen wurden verschiedene Puffer verwendet. Nach der Trennung von Fruchtfleisch und Schale von ca. 1 kg Tomaten, wurden gleiche Teile der Schale mit (1) PBS, (2) Kaliumphosphatpuffer, (3) 10 mM HCl, (4) 2 mM HCl, (5) Glycin-Puffer, (6) Natriumphosphat Puffer oder (7) Ammoniumcarbonat mit dem Biohomogenizer homogenisiert und 4 Std. im Über-Kopf-



Schüttler extrahiert. Nach der Zentrifugation (Sorvall Zentrifuge, SLA 1500, 10000 rpm, 30 Min.) wurde der Überstand abgenommen, filtriert und eine Proteinbestimmung (Kap. 4.2.9.2) durchgeführt. Die Proteine in der Lösung nach der PBS-Extraktion wurden mittels Acetonfällung aufkonzentriert und die Salze entfernt. Hierfür wurde der Proteinextrakt in dem vierfachen Volumen Aceton aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt. Am nächsten Morgen wurde die Lösung zentrifugiert (10000 x g, 30 Min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Acetonüberstand entfernt und das Pellet in Puffer für die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D GE) gelöst.

Des Weiteren wurde Tomatenschale mit dem Ready Prep Kit (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Extraktion erfolgte unter Anwesenheit (ReadyPrep TBP) und unter Abwesenheit (ReadyPrep) von TBP.

#### Puffer und Lösungen

Ammoniumcarbonat:	100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3/\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,1
Kaliumphosphatpuffer:	10 mM $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ gegeneinander titrieren bis pH 5,0
HCl-Lösung:	10 mM HCl, pH 2,0 oder 2 mM HCl, pH 2,7
Glycin-Puffer:	100 mM Glycin-HCl, pH 3,5
Natriumphosphatpuffer:	25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ gegeneinander titrieren bis pH 5,0

#### 4.2.1.5.1 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion wurde nach Saravanan und Rose (2004) durchgeführt. Hierbei wurden 5 g Tomatenschale in flüssigem  $\text{N}_2$  pulverisiert und anschließend in 15 ml Extraktionspuffer (I) homogenisiert. Anschließend wurden 15 ml Tris-HCl pH 7,5 gesättigtes Phenol hinzugegeben und wieder homogenisiert. Nach einer Zentrifugation (10000 x g, 30 Min.) wurde die obere Phenolschicht erneut mit 15 ml Extraktionspuffer (I) versetzt. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, bevor die Proteine aus der Phenolschicht mit dem 5-fachen Volumen methanolgesättigtem Ammoniumacetat über Nacht gefällt wurden. Das Proteinpellet wurde in Puffer für die isoelektrische Fokussierung (Kap. 4.2.4.2.1) aufgenommen.

#### 4.2.1.5.2 TCA-A und TCA-B

Die TCA-A und TCA-B Extraktion erfolgte ebenfalls nach Saravanan und Rose (2004). Jeweils 5 g Tomatenschale wurden in flüssigem  $\text{N}_2$  pulverisiert. Bei der TCA-A Methode wurden die Proteine direkt aus dem Pulver durch Aceton gefällt. Bei der TCA-B Methode wurde das Pulver zunächst mit Extraktionspuffer (I), der jedoch keine Saccharose enthielt, extrahiert, zentrifugiert (10000 x g, 30 Min.) und der Überstand mit dem vierfachen Volumen Aceton über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt.

#### Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer I:	1% Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), 0,7 M Saccharose, 0,1 M KCl, 0,5 M Tris pH 7,5, 500 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2% $\beta$ -Mercaptoethanol
Acetonlösung:	eiskaltes Aceton mit 10% TCA, 1% PVPP, 2% $\beta$ -Mercaptoethanol

## 4.2.2 Proteinreinigung

Die Reinigung von natürlichem Lysozym erfolgte mittels Prep Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) oder FPLC (ÄKTA™ FPLC™, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die rekombinanten Proteine wurden ebenfalls mittels FPLC oder Affinitätschromatografie gereinigt.

### 4.2.2.1 Präparative SDS-PAGE

Bei der präparativen SDS-PAGE mittels Prep Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) trennen sich die Proteine einer Probe über ein zylindrisches Gel nach ihrem Molekulargewicht zu ringförmigen Banden auf. Erreichen die Banden den Boden des Gels, werden sie über eine Polyethylenmembran und weiter über eine Dialysemembran in die Elutionskammer geleitet. Einzelne Fraktionen werden dann in einem Fraktionssammler (BioRad, Hercules, CA, USA) gesammelt und durch SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) analysiert.

Da Lysozym ein Molekulargewicht von ca. 9 kDa besitzt, wurden für die Trennung Gele nach Laemmli (16-17,5% Acrylamid) und Schägger & von Jagow (16,5% Acrylamid) hergestellt (Kap. 4.2.4.1). Da für die Trennung der kleine Zylinder (28 mm Durchmesser) verwendet wurde, betrug das Trennungsvolumen ca. 40 ml. Auf das Trennungsgel wurden ca. 10 ml Sammelgel (5% Acrylamid) geschichtet. Die Probe wurde mit entsprechender Menge an SDS-haltigem Probenpuffer aufgekocht und dann auf das Gel appliziert. Bei allen Läufen wurde eine Proteinmenge von ca. 0,7 mg in einem maximalen Volumen von 4 ml aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei einer konstanten Stromleistung von 12 W über ca. 7 Std.

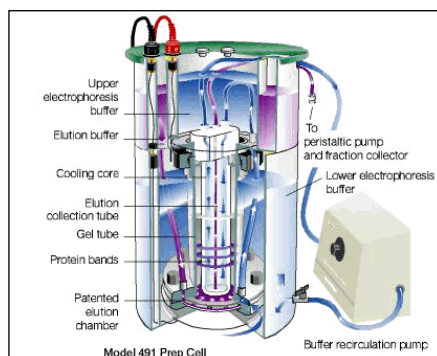


Abb. 4.1: Übersicht des Prinzips der Proteintrennung durch die Prep Cell.

### 4.2.2.2 Reinigung über FPLC

Die Reinigung über die FPLC erfolgte in zwei Schritten, der Kationenaustauschchromatographie (MonoS HR 5/5, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) schloss sich die Größenausschlusschromatographie (Superdex 30, HiLoad 16/60, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) an.

#### 4.2.2.2.1 Kationenaustauschchromatographie

Der erste Reinigungsschritt umfasste die Kationenaustauschchromatographie. Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung von Ladungen auf der Oberfläche der Proteine einer Probe mit der entgegengesetzten Ladung der Säulenmatrix. In dem Falle der Kationenaustauschchromatographie binden positiv geladene Proteine aus der Probe an die negativ geladene Säulenmatrix. Die gebundenen Proteine können durch einen Salzgradienten eluiert werden. Da bei einem stetigem pH die Proteine bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert werden, können sie auf diese Art voneinander getrennt werden. Etwa 200 ml Proteinextrakt (Kap. 4.2.1.4) wurde in einem Dialyseschlauch mit der Ausschlussgrenze von 3 kDa bei 4°C über zwei Tage und dreimaligen Pufferwechsel in Puffer A dialysiert. Durch Filtration über 0,2 µm Zelluloseacetat-Filter (Sartorius, Göttingen) wurde der Extrakt von unlöslichen Bestandteilen und Schwebeteilchen befreit. Danach wurde der Extrakt auf ca. 70 ml mittels zweier 15 ml VivaSpin Säulen (Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa bei 3000 x g über ca. 8 Std. aufkonzentriert. Nach Equilibrierung der MonoS HR 5/5 mit Puffer A (10x Säulenvolumen) wurden 70 ml der Probe über eine 10 ml Superloop durch wiederholtes Befüllen der Superloop mit einer Flussrate von 1 ml/Min. auf die Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mittels eines NaCl Gradienten (0-100% Puffer B) mit Puffer B und derselben Flussrate in den dazugehörigen Fraktionssammler (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden in einer Größe von 500 µl gesammelt. Die Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) analysiert.

##### Puffer und Lösungen

Puffer A:	50 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> , pH 5
Puffer B:	50 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> , 1 M NaCl, pH 5

#### 4.2.2.2.2 Größenausschlusschromatographie

Partiell über MonoS gereinigtes natürliches Lyc e 3 und die rekombinanten Lyc e 3 Isoformen aus den Konstrukten pET-32a-3.1 bzw. -3.2 und pET-32a-PP-3.1 bzw. -3.2 wurden über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 30, HiLoad 16/60, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gereinigt. Bei der Größenausschlusschromatographie werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht, genauer nach ihrem hydrodynamischen Radius, separiert. Das Säulenmaterial besitzt Poren, in die Proteine während des Trennvorgangs per Diffusion ein- und wieder ausdringen. Größere Proteine dringen weniger oft oder gar nicht in die Poren ein und werden somit schneller eluiert.

Nach Equilibrierung der Säule (2x Säulenvolumen) mit Equilibrierungspuffer (Flussrate 1 ml/Min.) wurden 100-200 µl der mittels VivaSpin Säulen (Sartorius, Göttingen) aufkonzentrierten Probe auf die Probenschleife aufgetragen. Die Elution erfolgte durch 1 Säulenvolumen desselben Puffers bei gleicher Flussrate. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) analysiert.

Puffer und Lösungen

Equilibrations- und Elutionspuffer:	20 mM MOPS, 0,5 M (nLyc e 3) oder 0,3 M (rekombinante Isoformen) NaCl, pH 7,6
-------------------------------------	---

**4.2.2.3 Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographie**

Die Reinigung von in *E.coli* exprimierten Fusionsproteinen mit N-terminalem Hexahistidinanhang (Kap. 4.1.10) erfolgte nach der Lyse (Kap. 4.1.11) mittels Kobalt (Co<sup>++</sup>)- (BD TALON Resin, BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA, USA) oder Nickel (Ni<sup>++</sup>)- (Qiagen, Hilden) NTA-Agarose (Porath *et al.*, 1975) nach Angaben des Herstellers. Co<sup>++</sup>- bzw. Ni<sup>++</sup>-NTA-Agarosesuspension wurde mit dem vierfachen Volumen Lysispuffer dreimal gewaschen (Zentrifugation bei 700 x g, Raumtemperatur (RT), 5 Min.), das zellfreie Material aufgegeben (Kap. 4.1.11) und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer (Stuart Scientific, Watford, UK) inkubiert. Nach der Bindung des Zielproteins an Co<sup>++</sup>- bzw. Ni<sup>++</sup>-NTA-Agarose erfolgten drei Waschschrte mit dem vierfachen Volumen Waschpuffer (Zentrifugation bei 700 x g, RT, 5 Min.). Anschließend wurde eine Leersäule (BioRad, München) mit der gewaschenen Agarose gepackt und das Protein durch Elutionspuffer mit steigendem Imidazolgehalt eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) analysiert. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden gemischt und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 4.2.9.1).

Nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins (Kap. 4.2.3) wurde nach Dialyse eine zweite Co<sup>++</sup>- bzw. Ni<sup>++</sup>-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt, um das Zielprotein von dem hexahistidinhaltigen Fusionsanteil zu separieren.

Im Rahmen der Vorversuche zum Vergleich der Effektivität der Reinigung durch Ni<sup>++</sup>- oder Co<sup>++</sup>-NTA-Agarose wurde von der mit Ultraschall (Kap. 4.1.11.3) lysierten und zentrifugierten Bakteriensuspension jeweils 300 µl abgenommen. Fünfzig µl Ni<sup>++</sup>- bzw. Co<sup>++</sup>-NTA-Agarose wurden wie oben beschrieben gewaschen und mit der Zellsuspension inkubiert. Nach Zentrifugation (700 x g, RT, 5 Min.) wurde die Agarose gewaschen und das Zielprotein mit 250 mM Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) analysiert.

Puffer und Lösungen

Lysispuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, pH 8,0
Waschpuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, pH 8,0, steigende Mengen an Imidazol (25, 50, 100, 250, 500 mM, 1 M)

**4.2.2.4 Poly-L-Prolin-Affinitätschromatographie**

Bei der Aufreinigung von rekombinantem Profilin aus Zellkulturen macht man sich die starke Bindung von Profilinen an Poly-L-Prolin (PLP) zu Nutze.

Bei der Kopplung von Poly-L-Prolin an Sepharose werden 3 g Cyanbromid- (CNBr-) Sepharose 4B (Pharmacia) eingewogen und 2 x 10 Min. in 1 mM HCl equilibriert. Nach Waschen mit Kopplungspuffer (3000 rpm, 10 Min.), wurden 100 mg PLP (Sigma, Taufkirchen) mit der Sepharose

über Nacht im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die PLP-Sepharose mit Kopplungspuffer gewaschen und anschließend mit Blockierungslösung inkubiert. Nach weiteren Waschgängen mit Kopplungs- und Acetatpuffer konnte die PLP-Sepharose für die Reinigung der Profiline verwendet werden.

Bei der Reinigung wurde der Überstand nach Zentrifugation des Bakterienlysates (Kap. 4.1.11.1) mit der PLP-Sepharose über Nacht im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose 6 x mit Säulenpuffer gewaschen (700 x g, 10 Min.) bevor diese auf eine PD 10 Leersäule (BioRad, München) gepackt werden konnte. Die Elution des Profilins erfolgte mit 6 M Harnstoff. Nach Analyse der Fraktionen über SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) wurden die profilinhaltigen Fraktionen gemischt und der Harnstoff schrittweise durch Dialyse entfernt.

<i>Puffer und Lösungen</i>	
<i>Kopplungslösung:</i>	<i>0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,3</i>
<i>Blockierungspuffer:</i>	<i>0,5 M Ethanolamin in Kopplungspuffer, pH 8</i>
<i>Acetatpuffer:</i>	<i>0,1 M Acetat-Puffer, 5,7 ml Eisessig / l, pH 4</i>
<i>Säulenpuffer:</i>	<i>20 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 0,5 mM ATP, pH 7,5</i>
<i>Elutionspuffer:</i>	<i>6 M Harnstoff in Säulenpuffer</i>

#### 4.2.3 Proteolytischer Verdau

Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit der Enterokinase EKMax<sup>TM</sup> (Invitrogen, Karlsruhe), biotinyliertem Thrombin (Novagen, Madison, WI, USA) oder PreScission<sup>TM</sup> Protease (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gespalten (Vgl. Tab. 4.5).

**Tab. 4.5: Übersicht über die Spaltung der Fusionsproteine mit dem entsprechenden Enzym.**

<b>Expressionsprodukt des Konstruktes</b>	<b>Spaltung mit</b>
pET100/D-TOPO-3.1 bzw. -3.2	EKMax
pET-32a - 3.1 bzw. -3.2	EKMax, Thrombin
pET-32a -PP-3.1 bzw. -3.2	PreScission Protease

Die Spaltung mit EKMax<sup>TM</sup> erfolgte in EKMax<sup>TM</sup> Puffer über Nacht bei 37°C mit unterschiedlichen Enzymmengen. Zwanzig µg des Fusionsproteins wurden mit 4, 2, 1 und 0,1 U EKMax<sup>TM</sup> über 16 Std. bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Braunschweig) enzymatisch gespalten.

Der Thrombin Verdau von 20 µg Fusionsprotein wurde in Thrombin Puffer mit 0,04, 0,02 und 0,005 U Thrombin bei Raumtemperatur über 16 Std. durchgeführt.

Mit PreScission<sup>TM</sup> Protease wurde über 16 Std. bei 4°C mit 1 U / mg Protein geschnitten. Zusätzlich wurde der PreScission<sup>TM</sup> Protease Puffer in PreScission<sup>TM</sup> Protease Puffer ohne DTT und EDTA sowie PreScission<sup>TM</sup> Protease Puffer ohne DTT mit EDTA modifiziert. Die jeweiligen Pufferbedingungen wurden durch Dialysieren der Proben in einer Dialysekassette (Pierce, Rockford, IL, USA) mit der Ausschlussgrenze von 3 kDa über Nacht bei 4°C mit zweimaligem Pufferwechsel eingestellt.

Der proteolytische Verdau von Tomatenschalenextrakt (Kap. 4.2.1.1) mit Pepsin erfolgte mit Pepsin-Agarose (Pierce, Rockford, Ill, USA). Die Agarose wurde dreimal mit dem dreifachen Volumen 0,1 M HCl pH 2 gewaschen (Zentrifugation 700 x g, 5 Min., RT). Der Proteingehalt der Probe wurde auf 1

mg/ml mit 0,1 M HCl pH 2 und falls notwendig der pH Wert auf pH 2 mit 1 M HCl eingestellt. Verdaut wurden 50 µl Tomatenschalenextrakt mit 50 µl Pepsin-Agarose (1:1, v/v, ≤ 6 U/µl) bei 37°C im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) für 30 Sek. - 120 Min., nach Beendigung des Verdauens wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8 abgestoppt. Die Pepsin-Agarose wurde abzentrifugiert (700 x g, 5 Min., RT) und der Überstand in der SDS-PAGE analysiert (Kap. 4.2.4.1).

#### Puffer und Lösungen

EKMax™ Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1% Tween-20 (v/v)
Thrombin Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub>
PreScission™ Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 105 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
PreScission™ Puffer ohne DTT und EDTA:	50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 105 mM NaCl
PreScission™ Puffer ohne DTT mit EDTA:	50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 105 mM NaCl, 1 mM EDTA

## 4.2.4 Auftrennung von Proteingemischen

### 4.2.4.1 Eindimensionale SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine mit SDS-Ionen beladen und durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße des Gels. Dieses Gel wirkt wie ein Molekularsieb; abhängig von ihrer Größe wandern die Proteine mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das elektrische Feld zur Anode. Damit wirklich nur die Größe des Proteins als Trennkriterium wirkt, wird die Probe vor dem Auftrag auf das Gel mit SDS-haltigem Probenpuffer aufgekocht. SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, es entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. Durch das Aufkochen werden ebenfalls Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört.

In dieser Arbeit wurden die SDS-PAGE mit Mini-Gelen und Maxi-Gelen durchgeführt. Die Mini-Gele wurden in eine Mini Protean Cell (BioRad, München) und die für die zweite Dimension der 2D GE verwendeten Maxi-Gele in eine Hoefer SE 600 Apparatur (Amersham, Freiburg) mit Kühlung eingespannt.

Nach dem Einspannen der Glasplatten in den Glasplattenhalter (BioRad, München) wurden die in Tabellen 4.6 und 4.7 angegebenen Komponenten gemischt und 7,5 ml der Trenngellösung für Mini-Gele bzw. ca. 30 ml für Maxi-Gele luftblasenfrei zwischen die Glasplatten eingefüllt. Um einen Sauerstoffausschluss zu gewährleisten und zur Glättung der Geloberfläche wurde auf die Lösung Isopropanol geschichtet. Nach der vollständigen Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und die Geloberfläche mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen. Anschließend wurden die Komponenten des Sammelgels gemischt, 3 ml Gellösung luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen und unverzüglich ein Probenkamm in das Gel gesteckt. Maxi-Gele wurden ohne Sammelgel verwendet, hier wurde der Probenkamm unverzüglich nach Einfüllen der Trenngellösung in das Gel gesteckt. Je nach Versuchsplan wurden analytische oder präparative Probenkämme verwendet. Erfolgte auf die SDS-PAGE ein Immunoblot, so wurde dem Sammelgel 0,02% Pyronin Y hinzugegeben. Pyronin Y ermöglicht durch Bindung an Nitrocellulosemembranen eine bessere Orientierung beim Umgang mit Immunoblots.

Die Elektrophorese von Mini-Gelen wurde in SDS Laufpuffer (Laemmli) mit einer Spannung von 100 V für 15 Min. für den Eintritt der Probe in das Sammelgel und für ungefähr 45 Min. bei 200 V für die Auftrennung der Probe im Trenngel durchgeführt bis die Bromphenolblaubande des Probenpuffers die untere Gelkante erreicht hat. Die Elektrophoresekammer von Maxi-Gelen wurde an eine Kühlung angeschlossen. Hier wurde für den Probeneintritt in das Trenngel eine Stromstärke von 20 mA pro Gel für 45 Min. angelegt, danach wurde die Stromstärke auf 45 mA pro Gel erhöht, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreichte. Für Schägger und v. Jagow Gele wurde in die äußere Gelkammer der Mini Protean Cell ein Anodenpuffer und in die innere Gelkammer ein Kathodenpuffer gefüllt. Für den Probeneintritt wurde eine Spannung von 80 V und für die Auftrennung der Probe im Trenngel eine Spannung von 120 V angelegt. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde mit Hilfe des Mark 12<sup>TM</sup> oder See Blue<sup>□</sup> Plus (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt.

#### 4.2.4.1.1 Tris-Glycin Gele nach Laemmli (1970)

Es wurden Mini-Gele (8,3 x 5,7 x 0,15 cm) sowie Maxi-Gele (16 x 13 x 0,15 cm) hergestellt. Die Zusammensetzung von 10 ml Gellösung ist Tabelle 4.6 zu entnehmen.

**Tabelle 4.6: Zusammensetzung von Tris-Glycin Gelen nach Laemmli.**

	<i>Trenngel (15% Aca)</i>	<i>Sammelgel (5% Aca)</i>
Lower Tris (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS)	2,5 ml	-
Upper Tris (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS)	-	2,5 ml
Rotiphrese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	5,0 ml	1,7 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,3 ml	5,4 ml
Ammoniumperoxodisulphat 20 mg/ml (APS, Merck, Darmstadt)	0,2 ml	0,4 ml
N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Merck, Darmstadt)	0,02 ml	0,02 ml

Aca= Acrylamid

#### 4.2.4.1.2 Tris-Tricin Gele nach Schägger und v. Jagow (1987)

In Tabelle 4.7 ist die Zusammensetzung von Tris-Tricin Gellösung nach Schägger und von Jagow beschrieben. Diese Gele wurden nur als Mini-Gele verwendet.

**Tabelle 4.7: Zusammensetzung von Tris-Tricin Gelen nach Schägger und v. Jagow.**

	<i>Trenngel (16% Aca)</i>	<i>Sammelgel (4% Aca)</i>
Gelpuffer (3 M Tris-HCl pH 8,4; 0,4% SDS)	5 ml	2 ml
Rotiphrese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	8 ml	0,8 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2 ml	3,2 ml
Ammoniumperoxodisulphat 10% (APS, Merck, Darmstadt)	0,1 ml	0,1 ml
N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Merck, Darmstadt)	0,01 ml	0,01 ml

#### 4.2.4.1.3 Probenaufbereitung

Bei anschließender Coomassieblau-Färbung (Kap. 4.2.5.1) oder Western Blotting (Kap. 4.2.6) wurden Allergenextrakte in einer Konzentration von 20 µg/cm und gereinigte Allergene mit 0.5 µg/cm

verwendet. Bei einer anschließenden Silberfärbung (Kap. 4.2.5.2) wurden 10 µg/cm Allergenextrakt bzw. 0,25 µg/cm gereinigte Allergene aufgetragen. Als Probenpuffer wurde der unter Kap. 4.2.1.3 beschriebene 4-fach Probenpuffer mit der Allergenlösung 1:4 verdünnt. Für eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wurde der Ansatz mit 1/100 Volumen DTT Stammlösung versetzt. Die Proben wurden im Thermoblock bei 95°C für 5 Min. erhitzt, zentrifugiert (Biofuge Frecso, Heraeus, Braunschweig, Rotor Nr. 3325B, 13000 rpm, 5 Min.) und dann in die Probenaschen aufgetragen.

<u>Puffer und Lösungen</u>	
DTT Stammlösung:	2,6 M 1,4-Dithiothreitol
Anodenpuffer:	0,1 M Tris-HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25

#### 4.2.4.2 Zweidimensionale Elektrophorese

Bei der 2D GE schließt sich der Auftrennung nach dem isoelektrischem Punkt (1. Dimension) eine Auftrennung nach Molekulargewicht (2. Dimension) an.

##### 4.2.4.2.1 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in der Protean IEF-Cell (BioRad, München) durch Streifen mit immobilisiertem pH Gradienten (IPG) mit pI 3-10 (7 bzw. 11 cm Länge) oder pI 7-10 (BioRad, München) sowie IPG Streifen mit pI 6-11 (Amersham, Freiburg) von 7 cm Länge durchgeführt. Die Streifen müssen vor der Benutzung aktiv (bei einer Spannung von 50 V) oder passiv rehydratisiert werden. Die Rehydratisierung und 2D GE ist nachfolgend beschrieben.

Probenaufbereitung:

Von Extraktlösungen wurden für die Silberfärbung (Kap. 4.2.5.2) 30 µg und für eine Coomassie-Färbung (Kap. 4.2.5.1) 200 µg Protein verwendet. Um störende Substanzen zu entfernen und um die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurde eine Proteinfällung mit dem Protein Clear up Kit (BioRad, München) basierend auf einer Trichloressigsäurefällung durchgeführt. Das Proteinpellet wurde dann in Rehydratisierungslösung für die IEF aufgenommen.

Die Gele der 2D GE von natürlichen gereinigten Proteinen wurden ausschließlich mittels Coomassie (Kap. 4.2.5.1) gefärbt. Hiervon wurden 7 µg Allergenlösung direkt in die für den Gelstreifen benötigte Menge Rehydratisierungslösung gegeben. Dabei wurden 3 verschiedene Lösungen verglichen (Rehydratisierungslösung I und II sowie native Rehydratisierungslösung).

Aktive Rehydratisierung und anschließende isoelektrische Fokussierung:

Bei der aktiven Rehydratisierung wurde die mit 220 µl bzw. 125 µl Rehydratisierungspuffer (11 bzw. 7 cm Gelstreifen) versetzte Probe (Extrakt oder gereinigtes Protein) in die Kammern des Plastikeinsatzes pipettiert. Der Einsatz wurde je nach Länge des IEF Streifens gewählt (11 oder 7 cm). Nach Abziehen der Schutzfolie wurde der Streifen mit der Gelseite nach unten und in richtiger Orientierung luftblasenfrei auf die Probenlösung in die Kammern gelegt. Um die Streifen vor Austrocknung zu schützen, bzw. die Auskristallisation des Harnstoffs zu vermeiden, wurde eine



ausreichende Menge Mineralöl (BioRad, München) auf die Streifen pipettiert. Das Programm für die aktive Rehydratisierung und isoelektrische Fokussierung ist Tabelle 4.8 zu entnehmen. Nach dem Lauf wurden die Streifen aus der Kammer genommen und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tab. 4.8: Programm für die aktive Rehydratisierung und isoelektrische Fokussierung.**

Stufe	Spannung [V]	Zeit [h]	[Vh]
(Rehydratisierung) 1	50	12	600
2	150	1	150
3	500	1	500
4	1200	1	1200
5	auf 8000	innerhalb von 2	
6	8000	4 bis 5	30000
7	auf 1000	innerhalb von 1	
8	1000	2	

Passive Rehydratisierung und Probenaufgabe mittels „cup loading“:

Diese Methode wurde ausschließlich mit den gereinigten natürlichen Proteinen durchgeführt. Bei der passiven Rehydratisierung wurden die IEF Streifen für 12-16 Std. in einer Inkubationsschale mit der entsprechenden Menge Rehydratisierungslösung und mit Mineralöl überschichtet inkubiert. Danach wurden die rehydratisierten Streifen mit der Gelseite nach oben in den „Cup loading tray“ gelegt. Auf die Gelenen der Streifen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  getränkte Filterpapiere (Electrode wicks, BioRad, München) gelegt, worauf die Elektroden (BioRad, München) befestigt wurden. Das Auftragen der Probe erfolgte über sogenannte „Cups“ (BioRad, München), die ein Auftragsvolumen von 100 bis 150  $\mu\text{l}$  hatten. Die Cups wurden beim Auftragen von Proteinen mit einem basischen pl an dem Ende des Gelstreifens befestigt, wo sich der niedrigere pH Wert befindet, damit es nicht zur Präzipitation der Proteine kommt. Das in 80  $\mu\text{l}$  Rehydratisierungslösung aufgenommene Protein wurde in einen Cup mit einem Auftragsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  eingefüllt. Auf die Oberfläche der Proteinlösung im Cup und auf den Gelstreifen wurde Mineralöl pipettiert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte wie in Tabelle 4.8 dargestellt nur unter Ausschluss von Stufe 1.

#### 4.2.4.2.2 Auftrennung nach Molekulargewicht

Vor der Trennung nach Molekulargewicht wird der IEF-Gelstreifen in Equilibrierungslösungen inkubiert, um die Proteine zu reduzieren und zu alkylieren und gleichzeitig mit SDS zu beladen. Der gefrorene Streifen wurde bei RT aufgetaut und 15 Min. in Equilibrierungslösung (I) bei RT inkubiert und sofort danach für 15 Min. in Equilibrierungslösung II übertragen und bei RT inkubiert. Danach wurde der Streifen in SDS Laufpuffer kurz gewaschen, auf das, wie in Kap. 4.2.4.1 beschrieben, hergestellte Trenngel gelegt und mit Agarose fixiert. Die Agaroselösung wird hierfür aufgekocht und dann auf Handwärme abgekühlt. Für die Trennung in der zweiten Dimension wurden Maxi- sowie Mini-Gele ohne Sammelgel hergestellt (Kap. 4.2.4.1). Nach der SDS-PAGE erfolgte die Färbung der Gele (Kap. 4.2.5.1 und 4.2.5.2) oder Western Blotting (Kap. 4.2.6).

Puffer und Lösungen

Rehydratisierungslösung I:	8 M Harnstoff, 10 mM DTT, 1% CHAPS, 0,25% Ampholyte (pH entsprechend dem pH des Gelstreifens)
Rehydratisierungslösung II:	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 20 mM Tris, 65 mM DTT, 0,2 Ampholyte
Native Rehydratisierungslösung:	1% CHAPS, 0,25% Ampholyte
Equilibrierungslösung I:	50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 65 mM DTT
Equilibrierungslösung II:	50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 260 mM Iodacetamid
Agaroselösung:	300 mg Agarose, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, 6 ml 10-fach SDS Puffer werden mit $H_2O_{\text{bidest}}$ auf 60 ml aufgefüllt

**4.2.5 Färbungen von SDS-Gelen**

Nach der SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) wurden die zur Färbung vorgesehenen Trenngele entweder mit Coomassieblau oder mit Silbernitrat gefärbt.

**4.2.5.1 Coomassie Färbung**

Die Gele wurden unter Schütteln in Coomassie-Färbelösung für ca. 20 Min. inkubiert und danach bis zur gewünschten Intensität mit Entfärbelösung behandelt (Sambrook et al., 1989).

Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung:	100 ml $H_2O_{\text{bidest}}$ , 80 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue
Entfärbelösung:	10% Essigsäure in $H_2O$

**4.2.5.2 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988)**

Zu Beginn der Silberfärbung wurden die Gele für 30 Min. in Fixierlösung inkubiert und anschließend sofort für 30 Min. in Inkubationslösung übertragen. Nach sechsmaligem Waschen für 10 Min. in  $H_2O_{\text{bidest}}$  wurden die Gele für 15 Min. in Silbernitratlösung überführt. Danach wurden die Gele kurz in  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen und in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität entwickelt. Zur Beendigung der Färbung wurden die Gele in Stopplösung inkubiert und danach in  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen und gelagert.

Puffer und Lösungen:

Fixierlösung:	30% Ethanol, 10% Eisessig
Inkubationslösung:	30% Ethanol, 0,5 M Na-Acetat, 0,5% Glutaraldehyd, 0,02 M Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat
Silbernitratlösung:	0,1% Silbernitrat, 0,02% Formaldehyd
Entwickler:	2,5% Na-Carbonat, 0,01% Formaldehyd
Stopplösung:	50 mM EDTA

## 4.2.6 Western Blotting

### 4.2.6.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose oder PVDF Membran mittels semi-dry blotting

Die über SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) getrennten Proteine wurden mittels „semi-dry“-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Khyse-Andersen, 1984). Hierbei wurde zwischen den beiden Graphitplatten eines semi-dry Blotters (Phase, Lübeck) eine Bloteinheit aufgebaut. Die Bloteinheit begann auf der Anode und bestand aus drei in Anodenpuffer I getränkten Filterpapieren (Schleicher und Schuell, Dassel), die von zwei in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren überlagert wurden. Darauf wurde die in Anodenpuffer II equilibrierte Nitrocellulose- oder PVDF- Membran und dann das Trenngel gelegt. Darüber wurden wiederum drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere geschichtet. Der Transfer erfolgt bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> für 60 Min.

<i>Puffer und Lösungen</i>	
Anodenpuffer I:	300 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II:	25 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer:	20% Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 7,6

### 4.2.6.2 Proteinfärbung mittels PonceauS

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran zu kontrollieren, wurde die Membran mit PonceauS angefärbt. Dazu wurde die Membran für ca. 15 Min. in PonceauS Färbelösung (Roth, Karlsruhe) inkubiert und danach mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

### 4.2.6.3 Immunoblot und Immunoblot-Inhibition (Detektion)

Vor einer Immundetektion müssen die freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran blockiert werden. Dies erfolgte entweder durch BSA- oder Milchpulver (MP)- haltige Blockierungslösungen für 2 x 15 Min. bzw. 2 Std. Für die Immundetektion wurden die blockierten Membranen in 2-3 mm breite Streifen geschnitten, welche anschließend in 1 ml Waschpuffer gewaschen wurden. Dann wurden sie über Nacht mit Humanseren (Verdünnung 1:10 in jeweiliger Inkubationslösung) bzw. anti-LTP- oder anti-Profilin-Kaninchenseren (Verdünnung 1:20000 in jeweiliger Inkubationslösung) in einem Volumen von 600 µl unter Schütteln inkubiert. Die Detektion (Tab. 4.9) erfolgte am darauf folgenden Tag mit einem Inkubationsvolumen von 1 ml. Als Negativkontrolle wurden Seren von Nichtallergikern sowie ein Kaninchen Präimmunserum verwendet. Die Spezifität der Sekundärantikörper wurde durch Inkubation eines Streifens mit Puffer an Stelle des Primärantikörpers überprüft.

Tab. 4.9: Immundetektion von spezifischem humanem IgE und Kaninchen IgG.

	Arbeitsschritt	Nr. (Verdünnung)
1	Absaugen des Serums mit einer Vakuumpumpe	
2	4x5 Min. waschen mit Waschpuffer	
3	1 Std. Inkubation mit verdünntem Sekundärantikörper (Kap. 3.3)	1 (1:750); 2 (1:6000); 3 (1:4000), 5 (1:6000)
4	4x5 Min. waschen mit Waschpuffer	
5	a biotinylierter AK (#1): 30 min Inkubation mit verdünntem Streptavidin AP (1:3000) b nicht biotinylierte AK (#2,3,5): weiter mit Schritt 6	
6	4x5 Min. waschen mit Waschpuffer	
7	Färbung: kolorimetrisch	

Bei den Immunoblot-Inhibitionsversuchen wurde den Serumverdünnungen 10-20 µg rekombinantes Protein als Inhibitor hinzugefügt. Bevor die Nitrocellulose mit den Patientenseren inkubiert wurde, wurden Serum und Inhibitor für 30 Min. präinkubiert. Ein Streifen wurde als Positivkontrolle mit Serum ohne Inhibitor behandelt. Die Immundetektion erfolgte wie oben beschrieben. Bei der Färbung mittels Chemilumineszenz wurden die Nitrocellulosestreifen 5 Min. bei Raumtemperatur mit CDP-Star Substratpuffer inkubiert, bevor eine Inkubation mit CDP-Substratlösung über exakt 5 Min. erfolgte. Anschließend wurde die Antikörperbindung mittels Chemilumineszenz mit Hilfe des Roche Lumi CCD Imager F1 (Roche, Penzberg) detektiert.

#### Puffer und Lösungen

BSA-Blockierungslösung:	TBS, 3% BSA, 0,05% Tween 20
MP-Blockierungslösung:	TBS, 5% fettfreies MP, 0,05% Tween 20
BSA-Inkubationspuffer:	TBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween 20
MP-Inkubationspuffer:	TBS, 1% fettfreies MP, 0,05% Tween 20
Waschlösung:	TBS, 0,05% Tween 20
Färbelösung:	Kolorimetrisch mit dem „AP-Konjugat-Substrat-Kit“ (Bio-Rad, München)
CDP-Star Substratpuffer:	100 mM Diethanolamin, pH 8,5, 1 mM MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O
CDP-Star Substratlösung:	558 µl Substratpuffer, 12 µl 50 x CDP-Star, 30 µl Nitroblock-II-Lösung (Tropix, Bedford, MA, USA) pro Nitrocellulosestreifen

## 4.2.7 ELISA und ELISA-Inhibition

### 4.2.7.1 ELISA

Im ELISA wurden rekombinante Lyc e 3.1 und 3.2 Isoformen, nLyc e 3, Tomatenschalenextrakt, die Extrakte aus gentechnisch veränderten Tomaten und den dazugehörigen Wild Typ Früchten an die Festphase gekoppelt. Der ELISA wurde zum einen zur Bestimmung des nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 spezifischen IgE und zum anderen im Rahmen einer Schachbretttitration als Vorversuch der ELISA-Inhibition verwendet. Bei der Schachbretttitration wurde die für eine Inhibition optimale Allergenkonzentration und die entsprechende Serumverdünnung ermittelt. Für eine optimale Inhibition sollte die OD<sub>450nm</sub> ca. 50% der OD des unverdünnten Serums entsprechen.

Für die Schachbretttitration wurden Allergenverdünnungen von 8-0,5 µg/ml (Lyc e 3.1) und 1-0,0625 µg/ml (Lyc e 3.2 und nLyc e 3) mit PBS hergestellt und jeweils 100 µl der Verdünnungen pro Kavität in eine 96-Well Maxisorb Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Für den ELISA zur Bestimmung des nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 spezifischen IgE im Serum wurde 1 µg/ml (entspricht 0,1 µg absolut) Protein an die Festphase gekoppelt. Die Inkubation für die Bindung der Allergene an die Mikrotiterplatte erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Platte wurde im ELISA washer (BIO-TEX Instruments, Neufahrn) gewaschen und mit 200 µl Blockierungslösung pro Kavität für 2 Std. bei RT blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit 100 µl Serum pro Kavität. Für den ELISA zur Bestimmung des spezifischen IgE-Titers wurden die Seren unverdünnt, bei der Schachbretttitration wurden sie unverdünnt und bis zu Verdünnungen von 1:81, eingestellt mit PBS, eingesetzt. Die Inkubation mit den Seren erfolgte über Nacht bei RT. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte wiederum mit Waschlösung gewaschen und mit 100 µl des 1:2000 mit Inkubationslösung verdünnten Maus-anti-human-IgE POD (SBA, Birmingham, AL, USA) Antikörpers über 1,5 Std. inkubiert. Die Färbung erfolgte durch 100 µl Färbelösung pro Kavität und wurde mittels 50 µl Stopplösung nach 5-10 Min. abgestoppt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Bei dem ELISA zur Ermittlung des nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 spezifischen IgEs wurden Extinktionen > 3 x blank als positiv gewertet.

#### Puffer und Lösungen

Wasch- und Inkubationslösung:	PBS, 0.05% Tween
Blockierungslösung:	PBS, 0.05% Tween, 1% BSA
Färbelösung:	Citratpuffer (210 mM C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O, 303 mM KOH; pH 3,95), 0,005% TMB Stammlösung (21 mM TMB), 3,33 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Stopplösung:	3 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

#### **4.2.7.2 Dosisabhängige ELISA-Inhibition**

Die ELISA-Inhibition erfolgte nach demselben Ablauf wie der ELISA. Die zuvor im ELISA ermittelte optimale Allergenmenge wurde an die Maxisorb-Platte gekoppelt, und 100 µl der optimalen Serumverdünnung wurde zusätzlich mit 100 µl unterschiedlicher Allergenkonzentrationen als Inhibitor (100-0,0001 µg/ml bei Einzelallergenen, 100-0,01 µg/ml bei Extrakten) versetzt. Dies entspricht einer Endkonzentration von 50000-0,05 ng bzw. 50000-5 ng Protein pro Ansatz. Serum und Inhibitor wurden vor Inkubation in der Mikrotiterplatte in Eppendorf Reaktionsgefäßen für 30 Min. vorinkubiert.

#### **4.2.8 Bestimmung des spezifischen IgE mittels CAP FEIA**

Tomatenspezifisches IgE der Patientenseren wurde mittels CAP FEIA (Phadia, Uppsala, Schweden) bestimmt und in U/ml gemessen. Die Einteilung erfolgt in 7 Klassen (CAP-Klasse 0-6):

**Tab. 4.10: Übersicht über die Referenzen, Extinktionen und Klassen bei der Bestimmung des spezifischen IgE mittels CAP.**

Referenzen	Extinktionen	CAP-Klasse
A: 100 U/ml	Extinktion > Referenz A	6
B: 50 U/ml	Extinktion < Referenz A > Referenz B	5
C: 17,5 U/ml	Extinktion < Referenz B > Referenz C	4
D: 3,5 U/ml	Extinktion < Referenz C > Referenz D	3
E: 0,7 U/ml	Extinktion < Referenz D > Referenz E	2
F: 0,35 U/ml	Extinktion < Referenz E > Referenz F	1
	Extinktion < Referenz F	0

## 4.2.9 Spektroskopische Verfahren

### 4.2.9.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bakteriendichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm spektrometrisch gemessen (Shimadzu, Düsseldorf). Eine Absorptionseinheit ( $OD_{600}$ ) entspricht in etwa einer Bakteriendichte von  $1 \times 10^9$  Zellen / ml.

### 4.2.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Blue G-250 durch die Bindung an Protein (Bradford, 1976, Modifikation Zor und Seliger, 1996). Sechzig  $\mu$ l Allergenextrakt und rekombinante Allergene wurden in verschiedenen Verdünnungen, zusammen mit 60  $\mu$ l eines BSA Standards (100-1000  $\mu$ g/ml, Pierce, Rockford, IL, USA), in eine 96-well Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Nach Zugabe von 240  $\mu$ l Roti-Quant Färbelösung (Roth, Karlsruhe) und einer Inkubation von 5 Min. wurden die Proben bei 590 und 450 nm in einem Spectramax 340-Photometer (Molecular Devices, München) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mittels des Extinktionsverhältnisses 590/450 nm aus der Standardkurve ermittelt.

### 4.2.9.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und die Reinheitsüberprüfung erfolgten durch Absorptionmessung mit Hilfe des GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Die Wellenlänge bei 260 nm wird für die Quantifizierung verwendet, wobei zu Grunde gelegt wird, dass eine Absorptionseinheit bei 260 nm ( $1 A_{260}$ ) einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu$ g entspricht (Sambrook et al., 1989). Das Verhältnis 260/280 nm kann als Indikator für die Reinheit bzw. eine Kontamination mit Proteinen verwendet werden: bei reinen DNA-Präparaten ist ein Verhältnis von  $\geq 1.8$  zu erwarten.

#### 4.2.9.4 CD-Spektroskopie

Durch den Verlauf der „circular dichroism“ (CD) -Spektren kann die Sekundärstruktur eines Proteins in einer Lösung ermittelt werden. Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein J-810 Spektrometer (JASCO International, Tokyo, Japan) verwendet, welches an ein CDF-426S Peltier Temperaturkontrollelement und ein Julabo F200 Wasserbad (Julabo Labortechnik GmbH, Groß-Umstadt) angeschlossen war. Die Proben wurden in Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) mit einer Schichtdicke von 1 mm, bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm/Min. und einer Temperatur von 20°C in einem Wellenlängenbereich von 180-250 nm gemessen. Die Konzentration der Proteinproben in 300 µl 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,3, lag bei 2-5 µM. Aus den gemessenen Werten wurde die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{MRW}$  ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ) berechnet:

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

Dabei ist  $\Theta$  die Elliptizität, N die Anzahl der Aminosäuren, d die Schichtdicke der Küvette und c die Proteinkonzentration.

#### Puffer und Lösungen

Kaliumphosphatpuffer: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9) mit 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4,5) auf pH 7,3 einstellen

#### 4.2.10 Basophiler Histamin Freisetzungstest

Bei dem basophilen Histamin Freisetzungstest wird *in vitro* die physikalische Situation einer Typ I Reaktion simuliert. So kann festgestellt werden, ob ein Protein in der Lage ist, gebundenes IgE auf basophilen Granulozyten kreuzzovernetzen. Mit dem dosisabhängigen basophilen Histamin Freisetzungstest kann die Fähigkeit eines Allergenextraktes oder Allergens zur IgE-Kreuzvernetzung bestimmt werden. Hierbei wird das IgE der basophilen Granulozyten eines Nichtallergikers entfernt, bevor sie mit dem IgE eines Allergikers passiv sensibilisiert werden. Nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen eines Allergens kann die Menge des freigesetzten Allergens in einem kompetitiven ELISA gemessen werden.

Da Tomaten einen hohen endogenen Histamingehalt besitzen, musste aus den Tomatenextrakten für den Histamin Freisetzungstest endogenes Histamin durch Dialyse entfernt werden. Der Erfolg der Dialyse wurde durch einen Histamin ELISA überprüft.

Der basophile Histamin Freisetzungstest wurde nach der Methode von Kleine Budde et al. (2001) durchgeführt. Ungefähr 20 ml Citrat-Blut von einem Nichtallergiker wurden in einen 50 ml Falcon (Greiner, Flacht) gegeben und durch Zentrifugation (800 x g, 10 Min., RT) von Plasma entfernt. Nach einer weiteren Zentrifugation (23 Min., 800 x g, RT) in 50 ml LEUCOSEPT-Tubes (Greiner, Flacht) konnten die Granulozyten als Ringfraktion geerntet werden. Es folgten drei Waschvorgänge (Zentrifugation 5 Min., 420 x g, RT) mit jeweils 30 ml 0,9% NaCl, bevor vorhandenes IgE von den Basophilen durch 5 Min. Inkubation bei 4°C mit 10 ml Milchsäure entfernt (Zentrifugation 5 Min., 420 x g, RT) wurde. Neutralisiert wurde mit 20 ml HEPES ohne Ca<sup>2+</sup>. Nach einem Waschschrift mit 3 ml

HEPES ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (Zentrifugation 5 Min., 420 x g, RT), wurden die gestrippten Basophilen mit Allergikerserum passiv sensibilisiert (Inkubation bei 37°C, 60 Min., im Wasserbad). Das Pipettierschema für die Sensibilisierung ist Tabelle 4.11 zu entnehmen.

**Tab. 4.11: Ansatz pro Serum für die passive Sensibilisierung.**

840 $\mu\text{l}$	Zellsuspension (max. $4 \times 10^7$ Zellen)
1 $\mu\text{l}$	Heparin (10 mg/ml in PBS)
8 $\mu\text{l}$	EDTA (500 mM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ )
150 $\mu\text{l}$	Serum

Danach wurden die Zellen 2x mit 3 ml HEPES ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gewaschen (5 Min., 420 x g, RT), bevor sie in 3 ml HEPES mit  $\text{Ca}^{2+}$  resuspendiert und 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurden. Die Zellen in Suspensionen wurden anschließend auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit HEPES mit  $\text{Ca}^{2+}$  gebracht. Diese Zellsuspension wurde 1:7 (v/v) wiederum mit HEPES mit  $\text{Ca}^{2+}$  verdünnt und rIL-3 in einer Endkonzentration von 600 pmol zugegeben. Für die Messung der maximalen Histaminmenge wurden von der Zellsuspension 50  $\mu\text{l}$  abgenommen, in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 1:20 (v/v) verdünnt und zweimal eingefroren und wieder aufgetaut. Die Stimulation der restlichen Zellen erfolgte in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Spitzboden (Nunc, Wiesbaden). Hierfür wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  des Antigens in einer Verdünnungsreihe von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 0,0001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oder 50  $\mu\text{l}$  des verdünnten Extraktes (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in die Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Kontrolle der spontanen Histaminfreisetzung durch die Zellen wurde eine Kavität pro Serum mit 50  $\mu\text{l}$  HEPES mit  $\text{Ca}^{2+}$  ohne Allergen befüllt. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Zellsuspension hinzugegeben und 40 Min. bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Braunschweig) inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 Min., 900 x g, 7°C) wurden 100  $\mu\text{l}$  des Überstandes zur Acylierung abgenommen und in eine weitere 96-Well Mikrotiterplatte ohne Spitzboden eingefüllt. Bei der Acylierung wurden 25  $\mu\text{l}$  Acylierungspuffer/Kavität und 25  $\mu\text{l}$  Acylierungsreagenz/Kavität aus dem Histamin ELISA Kit (Immunotech, Marseilles, Frankreich) zugegeben. Die Inkubation erfolgte auf dem Plattenschüttler (350 rpm) zuerst 5 Min. bei RT, dann bei 4°C über Nacht. Der in dem Kit mitgelieferte Histaminstandard und die Kontrollen wurden auf dieselbe Weise acyliert.

Am darauffolgenden Tag wurde die Platte auf RT gebracht. Fünfzig  $\mu\text{l}$  der acylierten Probe wurde zusammen mit 200  $\mu\text{l}/\text{Kavität}$  Enzymkonjugat Histamin-AP in eine antikörperbeschichtete 96-Well Mikrotiterplatte (aus dem Kit) pipettiert. Standard und Kontrollen wurden hinzugegeben und für 2 Std. bei 4°C unter Schütteln (350 rpm) im Plattenschüttler inkubiert. In diesem Schritt konkurriert das aus den Zellen freigesetzte Histamin mit dem enzymkonjugierten Histamin-AP um die Bindung an den Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Die Platte wurde dann dreimal mit Waschlösung (aus dem Kit) per Hand gewaschen. Die anschließende Färbung mit 200  $\mu\text{l}/\text{Kavität}$  Substrat (aus dem Kit) auf dem Plattenschüttler (350 rpm, RT) wurde nach 30 Min. durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}/\text{Kavität}$  Stopplösung (aus dem Kit) abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Je höher die Extinktion, desto mehr enzymkonjugiertes Histamin-AP konnte an der Mikrotiterplatte binden und desto weniger Histamin wurde von den Zellen freigesetzt.



<u>Puffer und Lösungen</u>	
PBS-TNC:	0,13 M Tri-Natrium-Citrat in PBS, pH 7
HEPES:	132 mM NaCl, 20 mM HEPES, 6 mM KCl, 1 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 1,2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> pH 7,4, sterilfiltriert
HEPES ohne Ca <sup>2+</sup> :	100 ml HEPES-Puffer, 0,5 g Humanes Serum Albumin, 100 mg Glukose, sterilfiltriert
HEPES mit Ca <sup>2+</sup> :	wie HEPES ohne Ca <sup>2+</sup> , mit 0,15 g CaCl <sub>2</sub> , sterilfiltriert
Milchsäure:	819 mg NaCl, 37 mg KCl, 100 µl Milchsäure (90%) in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, sterilfiltriert

#### 4.2.11 Reduktion und Alkylierung von Proteinen

Die Reduktion von nLyc e 3 (0,5 µg/cm) und Tomatenschalenextrakt (20 µg/cm) erfolgte mit 1M DTT in 4 x Probenpuffer (Kap. 4.2.1.3) und anschließender Erhitzung für 5 Min. bei 95°C im Thermoblock. Die reduzierte Probe wurde anschließend durch 20%iges Iodacetamid (20 mg Iodacetamid / 50 µg Protein) über 30 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur alkyliert, um spontane Oxidationen zu vermeiden.

<u>Puffer und Lösungen</u>	
4 x Probenpuffer mit Reduktionsmittel (pH 8,0):	2,5 ml 4 x Probenpuffer plus 100 µl DTT-Stocklösung
Iodacetamidlösung (20%):	20 mg Iodacetamid in 100 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

#### 4.2.12 N-terminale Sequenzierung

Die 9 kDa Bande in Tomatenschalenextrakt und als gereinigte Fraktion wurde zur Identifikation als LTP N-terminal ansequenziert. Hierfür wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 4.2.4.1) und auf eine PVDF-Membran übertragen (Kap. 4.2.6.1). Die Membran wurde mit Coomassie Brilliant Blau (Kap. 4.2.5.1) analog zu der Färbung von Gelen gefärbt, die Bande bei 9 kDa ausgeschnitten und mittels eines 492 Procise Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Die Sequenzierung wurde bei Dr. A. Conti (CNR-ISPA, Colleretto Giacosa, Italien) durchgeführt.

#### 4.2.13 Nano-HPLC-nano ESI-MS/MS

Die Identifikation von Isoformen in der gereinigten nLyc e 3 Präparation (Kap. 4.2.2.2) erfolgte durch nano-HPLC-nano ESI-MS/MS bei Dr. A. Conti. Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden gereinigte Proteine mit Hilfe von Trypsin in Lösung nach Allan (1990), modifiziert durch Dr. A. Reuter (CNR-ISPA, Colleretto Giacosa, Italien), enzymatisch verdaut. Hierfür wurden 50 pmol gereinigtes Protein mit 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung auf ein Volumen von 60 µl eingestellt. Zur Reduktion des Proteins wurde 25 µl Dithiothreitollösung (DTT 10 mM in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) zugegeben und für 1 Std. bei 60°C inkubiert. Die Alkylierung erfolgte nach Zugabe von 25 µl Iodacetamidlösung (55 mM Iodacetamid in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) und Inkubation über 1 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Proteine wurden dann durch Trypsin (125 µg/ml Trypsin in 0.1 M HCl) für 24 Std. bei 37°C

enzymatisch verdaut. Der Verdau wurde vor der massenspektrometrischen Untersuchung durch Zugabe von 13 µl TFA (5% TFA in H<sub>2</sub>O) gestoppt. Von dieser Peptidlösung wurde 1 µl unverdünnt zur massenspektrometrischen Analyse eingesetzt. Zur massenspektrometrischen Untersuchung der proteolytisch verdauten Proben wurde ein nano-HPLC System (Agilent 1100 Series; Agilent, Santa Clara, USA) gekoppelt mit einem Ion-Trap Massenspektrometer (Agilent LC/MSD-Trap XCT-Plus; Agilent) verwendet. Die MS/MS Spektren wurden mit Hilfe des Data Analysis Moduls (LC/MSD Software, Agilent) prozessiert und zur Datenbanksuche eingesetzt (Mascot MS/MS Ions Search; Perkins et al., 1999).

#### 4.2.14 Hauttest

Der Hauttest wurde von Dr. E. Ernesto (Hospital General de Castellón, Castellón, Spanien) und Dr. V. Mahler (Hautklinik der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen) nach Dreborg (1989) durchgeführt. Der SPT galt als Einschlusskriterium der Tomatenallergie bei den für diese Studie rekrutierten Patienten aus Girona und Castellon, Spanien, und zur Überprüfung der allergenen Potenz der gentechnisch veränderten Pflanzen (Prick-zu-Prick). Für den Prick Test wurde kommerzieller Tomatenextrakt (ALK-Abelló, Madrid, Spanien) und für den Prick-zu-Prick Test Tomatenstücke von Wildtyp (WT) und gentechnisch veränderten Pflanzen des Kultivar Microtom verwendet. Prick-zu-Prick Tests wurden in Doppel- oder Dreifachbestimmungen auf der Innenfläche des Unterarms durchgeführt. Histamindihydrochlorid (10 mg/ml) und PBS (pH 7,2) wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet. Der SPT wurde als positiv bezeichnet, wenn der Quaddeldurchmesser nach 15 Min. über 3 mm lag. Die Studie war von der lokalen Ethikkommission in Deutschland und Spanien genehmigt.

Die Ergebnisse des SPT wurden mit Hilfe des *Student t Tests* statistisch analysiert. Hierbei wurden die Werte der Quaddeldurchmesser paarweise für WT und transgene Linien miteinander verglichen.

### 4.3 Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen mit Hilfe der RNAi Methode

Die Herstellung des RNAi-Konstruktes der gentechnisch veränderten Pflanzen und die Vorauswahl der erfolgreich transfizierten Pflanzen mittels Northern Blotting wurde bei Prof. Dr. U. Sonnewald in Erlangen durchgeführt und wird deswegen hier nur kurz beschrieben.

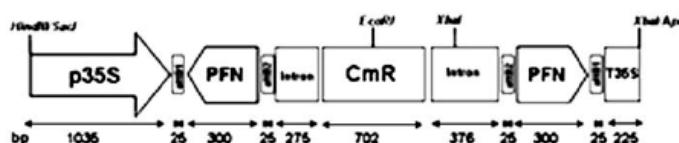
#### 4.3.1 Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

Die gentechnisch veränderten Tomatenpflanzen (*L. esculentum* cv. *Microtom*) wurden wie bei Le et al. (2006a) beschrieben hergestellt.

## 4.3.2 Konstruktion des RNAi Vektors

### 4.3.2.1 Lyc e 1 RNAi

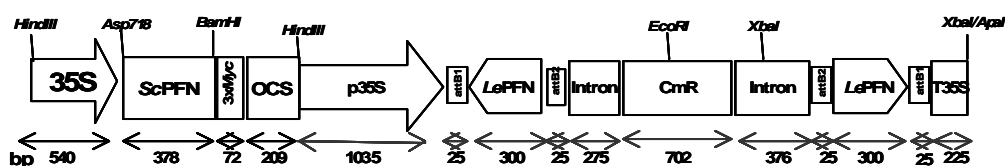
Für die Reduktion von Lyc e 1 wurde die Gateway™ Technologie (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt. Diese Technologie basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ . In der Literatur sind zwei Lyc e 1 Isoformen beschrieben (Willeroider et al., 2003; Westphal et al., 2004), die hier als Lyc e 1.01 (Acc.Nr. AJ 417553) und Lyc e 1.02 (Acc.Nr. AY 061819) benannt sind. Mittels PCR wurde das von Westphal et al. (2004) beschriebene Lyc e 1.02 aus dem aus Vorarbeiten vorliegenden Vektor pCR-II-TOPO amplifiziert (Primer: 5' PFN-1.02 (5'-ACTTCTGCTGCTATCATCGGT-3' und 3' PFN-1.02 5'-CACCTTCAACTCATATTACAC-3'). Die PCR lief unter folgenden Konditionen ab: 94°C, 5 Min.; 30 Zyklen: 94°C, 20 Sek.; 55°C, 1 Min.; 72°C, 1 Min. und eine finale Elongation bei 72°C für 10 Min.. Das PCR Produkt wurde in den Vektor pENTR/D (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert, um attL Erkennungssequenzen zu erlangen. Danach wurde das Konstrukt in den Zielvektor pK7GWIWG2(II) (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Das resultierende Konstrukt enthielt die Sequenz von Lyc e 1.02 in sense und antisense Orientierung, getrennt durch ein Intron (CmR) unter Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S Promotors und Terminators, es wurde pGW\_PFN\_RNAi benannt.



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Lyc e 1 RNAi Konstruktes.**

P35S: 35S-CaMV Promotor, T35S: 35S-CaMV Terminator; PFN: Lyc e 1.02 in sense und antisense Orientierung; CmR: Chloramphenicol-Acyltransferase Gen.

Auf der Basis dieses Konstruktes wurde von Prof. Dr. U. Sonnewald ein chimäres Konstrukt zur Überexpression von Hefeprofilin konstruiert (Abb. 4.3).



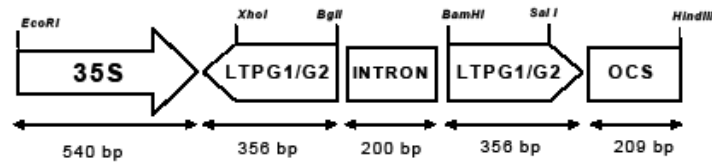
**Abb. 4.3: Schematische Darstellung des chimären Konstruktes zur Überexpression von Hefeprofilin.**

35S: 35S-CaMV Promotor, ScPFN: Hefeprofilin, OCS: OctopinSynthase, CmR: Chloramphenicol-Acyltransferase, T35S: 35S-CaMV Terminator.

### 4.3.2.2 Lyc e 3 RNAi

Die kodierenden Regionen der LTP Isoformen 3.1 und 3.2 wurden in sense und antisense Orientierung (getrennt durch ein Intron) nach der Methode von Chen et al. (2003) in den pUC-RNAi Vektor kloniert. Hierfür wurde die DNA der beiden LTP Isoformen aus dem PCR blunt Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) mittels der Enzyme BamHI und Sall ausgeschnitten und in sense Orientierung in den pUC-RNAi Vektor kloniert. Dieselben Fragmente wurden in antisense Orientierung über die Enzyme BglIII und XhoI in das entsprechende Konstrukt eingebracht. Durch flankierende SbfI

Restriktionsstellen wurde das gesamte Konstrukt aus dem Vektor pUC-RNAi ausgeschnitten und in den binären Vektor pBinAR (Hoefgen & Willmitzer, 1990) zwischen den konstitutiven CaMV 35S Promotor und das Octopinsynthase (OCS) Polyadenylierungssignal kloniert. Man erhielt die Plasmide pBin-LTPG1\_RNAi (für Lyc e 3.1) und pBin-LTPG2\_RNAi (für Lyc e 3.2).



**Abb.4.3: Übersicht über das Konstrukt für das „gene silencing“ von Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2.**

Lyc e 3.1 bzw. Lyc e 3.2 wurden in sense und antisense Orientierung, getrennt durch ein Intron, zwischen den 35S CaMV Promotor und den OCS Terminator kloniert. Als Intron wurde das GA 20-Oxidase Gen aus *A.thaliana* verwendet.

#### 4.3.3 Transformation der Pflanzen

Das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* CV58C1 wurde mit den in Kap. 4.3.2 beschriebenen Konstrukten transformiert. Die stabile Transformation und Regeneration der Pflanzen erfolgte wie bei Ling et al. (1998) beschrieben.

#### 4.3.4 Erzeugung von transgenen Tomatenfrüchten der Tochtergeneration

Um die Vererbbarkeit des transgenen Effektes zu testen wurden 30 Samen von ausgewählten Linien der T0 (erste Generation) und Wildtyp entnommen. Nach Sterilisation (3 Min. 70% Ethanol, 10 Min. 1% HClO, dreimaliges Waschen in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>), wurden die Samen zur Keimung einem 16 Std. Tag/8 Std. Nacht Rhythmus auf Murashige Skoog Medium (2% (w/v) Saccharose, 0,1% (w/v) MES pH 6,1, 50 mg/l Kanamycin) ausgesetzt. Nach 2-3 Wochen wurden die Kanamycin resistenten Pflanzen in das Gewächshaus umgesetzt und weiter analysiert.

#### 4.3.5 RNA Isolation und Northern Blotting

Beim Northern Blot wird isolierte und elektrophoretisch aufgetrennte RNA auf einer Membran fixiert. Die gesamt RNA Isolierung erfolgte wie bei Slater et al. (1985) beschrieben. Ungefähr 20 µg gesamt RNA wurden isoliert und elektrophoretisch in Agarosegelen mit 1,5% Formaldehyd aufgetrennt. Die Gele wurden auf eine Nylonmembran (GeneScreen, NEN, Boston, MA, USA) über Nacht unter Ausnutzung der Kapillarkräfte übertragen. Pre-hybridisierung und Hybridisierung mit der Sonde erfolgten am nächsten Tag bei 65°C. Für die Herstellung der Sonde wurden die cDNA Fragmente aus dem Vektor pCR blunt über EcoRI ausgeschnitten und mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>-P-dCTP mit Hilfe des High Prime Kits (Boehringer, Mannheim) markiert. Nach intensivem Waschen wurden die Membranen auf einem Röntgenfilm (Kodak, Heidelberg) für 2-3 Tage bei -80°C exponiert und anschließend entwickelt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der Patientengruppe

Das Einschlusskriterium in die Studie war ein spezifischer IgE-Titer gegen Tomate, gemessen im CAP-FEIA und berichtete Symptome einer Typ-I-Allergie nach dem Verzehr von Tomate (Vgl. Tab. 3.1). Diese variierten innerhalb der Patientengruppe von Klasse 1-5, wobei Klasse eins 6mal, Klasse zwei 31mal, Klasse drei 21mal, Klasse vier 11mal und Klasse fünf 1mal vertreten waren. Die Patienten (n=70) wurden aus Deutschland (n=36) und Spanien (n=34) rekrutiert, wobei sich die Herkunft in Spanien nochmals in spanische Küste (mediterran) (n=15) und spanisches Inland (n=19) aufteilte. Regionale Unterschiede waren bei der Verteilung der CAP Klassen nicht festzustellen.

Tabelle 3.1 ist ebenfalls zu entnehmen, dass Patienten am häufigsten (54/70) unter dem Oralen Allergie Syndrom nach Verzehr von Tomaten litten. Als weitere Symptome wurden Probleme des Gastrointestinaltraktes (8/70), Urtikaria (6/70), Konjunktivitis (4/70), Hautausschlag (4/70), Anaphylaxie (3/70), Juckreiz (3/70), Ekzeme (2/70), Probleme des Respirationstraktes (2/70) oder Angioödeme (1/70) ermittelt. Manche Patienten litten unter diversen Reaktionen nach dem Verzehr von Tomate. Das Verhältnis von lokalen zu systemischen Reaktionen lag bei 54:33. Bei einem Vergleich der Symptome nach dem Verzehr von Tomate bestanden ebenfalls keine Unterschiede bei den Patienten aus den unterschiedlichen Regionen.

Im Rahmen der Diagnostik wurden unterschiedliche Methoden angewendet. Im Hauttest mit Tomatenextrakt (Kap. 4.2.14) wurden 35 von 46 Patienten positiv getestet, 11 getestete Patienten zeigten jedoch keine Reaktion. Die Ursache des negativen Hauttests könnte eine Allergenlösung sein, die nicht alle IgE-reaktiven Tomatenproteine enthält (Kap. 1.2.1.2).

Auch die Reaktionen nach dem Verzehr anderer Nahrungsmittel (bei 45/70 Patienten) und auf Latex wurden erfasst. Hier bestanden Unterschiede zwischen deutschen und spanischen Patienten. Die deutschen Patienten litten häufig (> 20%) an Symptomen nach dem Verzehr von Birne (52%), Kartoffel (42%), Kirsche (33%), Ananas (33%) und Sellerie (23%). Zusätzlich litten 6 der 21 Patienten an einer Latexallergie. Bei der Patientengruppe von der spanischen Küste waren bei 13 von 15 Patienten Symptome nach dem Verzehr von weiteren Lebensmitteln bekannt. Die häufigsten eine Symptomatik auslösenden Lebensmittel waren hier Pfirsich (77%), Haselnuss (46%), Birne, Kirsche, Mais, Nektarine, Apfel und Walnuss (je 30%) sowie Aprikose und Erdnuss (je 23%). Bei den Patienten aus dem spanischen Inland litten 11 von 19 Patienten unter weiteren Nahrungsmittelallergien. Hier lösten Pfirsich und Melone (je 54%) am häufigsten neben Erdbeere, Avocado und Banane (je 27%) eine Symptomatik nach dem Verzehr aus.

## 5.2 Prävalenz der IgE Sensibilisierung an Lyc e 1, Lyc e 2 und das 9 kDa-Protein

Tab. 5.1: Übersicht über die Häufigkeit der IgE Bindung an Lyc e 1, Lyc e 2 und das 9 kDa Protein

Serum	rLyc e 1 (Immunoblot)	nLyc e 2 (Immunoblot)	n9 kDa Protein Extrakt (Immunoblot)	n9 kDa Protein gereinigt (Immunoblot)	n9 kDa Protein gereinigt (ELISA)
<b>Deutschland</b>					
1 BO 9	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
2 BO 14	-	-	-	n.d.	n.d.
3 BO 15	-	+	n.d.	n.d.	n.d.
4 BO 32	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
5 BO 33	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.
6 BO 41	-	-	-	n.d.	n.d.
7 BO 47	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
8 BO 93	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
9 BO 96	-	+	-	n.d.	n.d.
10 BO 97	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
11 BO 134	-	+	-	n.d.	n.d.
12 BO 191	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
13 PEI 6	-	-	-	n.d.	n.d.
14 PEI 7	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
15 PEI 14	n.d.	+	-	n.d.	n.d.
16 PEI 26	n.d.	+	-	n.d.	n.d.
17 PEI 50	-	-	-	n.d.	n.d.
18 PEI 66	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
19 PEI 87	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
20 PEI 89	-	-	-	n.d.	n.d.
21 PEI 90	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
22 PEI 92	-	-	-	n.d.	n.d.
23 PEI 94	-	-	-	n.d.	n.d.
24 PEI 99	+	n.d.	-	n.d.	n.d.
25 PEI 101	+	-	-	n.d.	n.d.
26 PEI 104	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
27 PEI 115	-	-	-	n.d.	n.d.
28 PEI 122	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
29 PEI 128	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
30 PEI 131	+	-	+	+	+
31 PEI 144	+	n.d.	-	n.d.	n.d.
32 PEI 155	-	+	-	n.d.	n.d.
33 PEI 167	-	-	-	n.d.	n.d.
34 PEI 197	+	+	-	n.d.	n.d.
35 PEI 199	-	-	-	n.d.	n.d.
36 PEI 201	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>spanische Küste</b>					
37 AFC 7241	+	+	-	n.d.	n.d.
38 CS 1	-	n.d.	+	+	+
39 CS 3	-	n.d.	+	+	+
40 CS 4	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
41 CS 5	-	n.d.	+	+	+
42 CS 8	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
43 CS 9	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
44 CS 10	-	n.d.	+	+	+
45 CS 11	-	n.d.	+	+	+
46 EBO 7957	-	-	+	+	-
47 GI 1	+	n.d.	-	n.d.	n.d.
48 GI 2	-	n.d.	+	+	n.d.
49 GVC 6391	-	-	+	+	+
50 MCB 7597	-	n.d.	+	+	+
51 PVS 2934	-	-	+	+	+
<b>spanisches Inland</b>					
52 AGM 2011437	+	+	-	n.d.	n.d.
53 CMC 2010323	-	+	+	n.d.	n.d.
54 ETMP 2011575	+	+	-	n.d.	n.d.
55 GMAM 2020111	-	+	-	n.d.	n.d.
56 GRS 960550	-	-	-	n.d.	n.d.
57 JNM 2011010	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
58 LMC 980567	+	n.d.	-	n.d.	n.d.
59 MAY 981345	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
60 MBM 990690	+	+	-	n.d.	n.d.
61 MCS 990911	+	+	-	n.d.	n.d.
62 MRRM 970772	+	+	-	n.d.	n.d.
63 NLA 971101	-	+	+	+	+
64 PCC 970458	+	+	-	n.d.	n.d.
65 RMD 2010751	+	+	-	n.d.	n.d.
66 RMP 2000909	+	+	-	n.d.	n.d.
67 SCA 2010081	+	+	-	n.d.	n.d.
68 SMJ 2011037	+	+	-	n.d.	n.d.
69 SVP 2100057	-	+	-	n.d.	n.d.
70 VPJA 2020476	-	+	+	n.d.	n.d.

+: positiv, -: negativ, n.d.: nicht detektiert, r: rekombinant, n: natürlich

Einen Überblick über die Häufigkeit der IgE-Bindung an rekombinantes Lyc e 1 und natürliches Lyc e 2 sowie das 9 kDa-Protein im Tomatenschalenextrakt und in gereinigter Form, untersucht im Immunoblot (Kap. 4.2.6), ist in Tabelle 5.1 dargestellt. Das rLyc e 1 wurde in *E.coli* exprimiert (Kap. 4.1.10) und über Poly-L-Prolin Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 4.2.2.4), nLyc e 2 wurde von Dr. Iris Lauer (Paul-Ehrlich-Institut) zur Verfügung gestellt. Herstellung und Charakterisierung von rLyc 1 und nLyc e 2 wurden von Westphal et al. (2003 und 2004) publiziert. Die Patientenseren, die bei Verwendung von Tomatenschalenextrakt eine IgE-Bindung an die 9 kDa Bande zeigten und von denen ausreichend Serum vorhanden war, wurden zusätzlich im Immunoblot (Kap. 4.2.6) und ELISA (Kap. 4.2.7.1) auf das gereinigte (Kap. 4.2.2.2) natürliche 9 kDa-Protein getestet. Auf Grund von Serumknappheit war es nicht möglich, alle Patientenseren auf eine IgE-Bindung mit allen drei Allergenen zu untersuchen. Die Häufigkeit der IgE-Bindung an rLyc e 1 wurde mit 65 Patientenseren untersucht, hiervon zeigten 24 / 65 (ca. 36%) eine IgE-Bindung an rLyc e 1. Von 50 getesteten Patientenseren waren 28 (56%) positiv auf nLyc e 2 und von 57 Seren reagierten 14 (ca. 24%) mit dem 9 kDa-Protein im Tomatenschalenextrakt. Nach Unterscheidung der spanischen und deutschen Patientengruppe ergeben sich Prävalenzen von 29% (D) und 44% (ESP) für Lyc e 1, 35% (D) und 81% (ESP) für nLyc e 2 sowie 4% (D) und 40% (ESP) für das 9 kDa-Protein. Von den 14 Seren, die eine IgE-Bindung an das 9 kDa-Protein im Tomatenschalenextrakt zeigten, wurden alle noch verfügbaren Seren (n=11) auf das gereinigte natürliche 9 kDa-Protein im Immunoblot und ELISA getestet. Im Immunoblot waren alle 11 Seren positiv, im ELISA war 1/11 Seren negativ (EBO 7957). Tomatenallergiker weisen ein breites Sensibilisierungsmuster auf. Innerhalb der untersuchten Patientengruppe gab es kein Serum, welches eine Monosensibilisierung gegen ein Tomatenprotein aufwies.

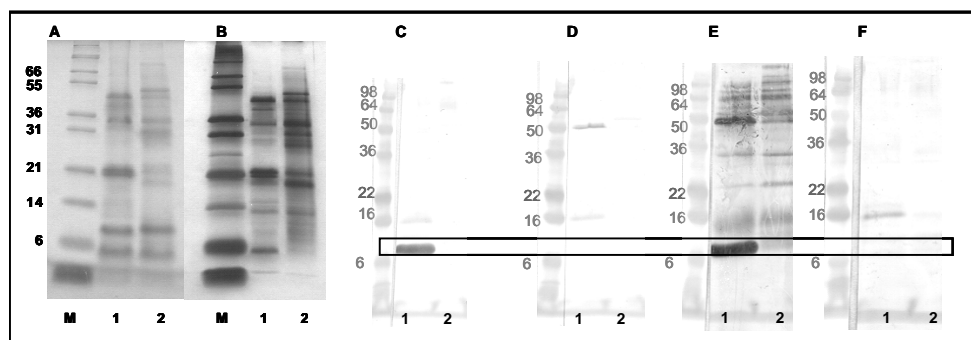
### **5.3 Identifikation und Charakterisierung des 9 kDa-Proteins aus der Tomate**

#### **5.3.1 Generelle Untersuchungen**

##### **5.3.1.1 Optimierung der Anreicherung des 9 kDa-Proteins in Tomatenschalenextrakt**

Aus Vorarbeiten mit Früchten aus der *Rosaceae* Familie (u.a. Kirsche (*Prunus avium*), Pfirsich (*Prunus persica*) war bekannt, dass LTPs hauptsächlich in der Schale vorkommen. Deswegen wurde von der Tomate Schale und Fruchtfleisch getrennt voneinander mittels Tieftemperaturmethode extrahiert (Kap. 4.2.1.1). In der SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) wurden die Extrakte aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie und Silbernitrat gefärbt (Kap. 4.2.5) sowie im Immunoblot mit humanem IgE- und Kaninchen IgG-reaktive Proteine detektiert (Kap. 4.2.6). Die Ergebnisse sind in Abb. 5.1 dargestellt. Nach der Proteinfärbung sind hauptsächlich quantitative Unterschiede zwischen Tomatenschale und -fruchtfleisch zu erkennen. Die in Tomatenschalenextrakt intensive Bande bei 21 kDa ist im Fruchtfleischextrakt nur schwach zu erkennen. Dafür weist der Fruchtfleischextrakt eine Bande im Bereich von 31 kDa auf, die nicht im Schalenextrakt identifiziert werden kann. Im Immunoblot wird deutlich, dass ausschließlich im Tomatenschalenextrakt immunreaktives LTP

vorhanden ist. Bei der Bande oberhalb 6 kDa im Fruchtfleischextrakt scheint es sich nicht um LTP zu handeln.



**Abb. 5.1: Immunreaktives 9 kDa-Protein ist ausschließlich in der Tomatenschale enthalten.** Coomassie [A] und Silber [B] gefärbtes 15%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli mit Tomatenschalen- (1) und -fruchtfleischextrakt (2). Detektion mit dem Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Antiserum [C] und Serum eines nicht immunisierten Kaninchens [D] sowie einem Allergikerserum (Tab. 5.1 Nr. 30) [E] und einem Nichtallergikerserum [F]. Die 9 kDa Bande wurde gekennzeichnet. M: Molekulargewichtsstandard (M12 [A,B] und See Blue Plus [C-F], Invitrogen, Karlsruhe).

Parallel zu einer PBS Extraktion wurde eine Amoniumcarbonatextraktion (Kap. 4.2.1.1) durchgeführt, hiermit konnte jedoch kein LTP aus der Tomatenschale extrahiert werden (Daten nicht gezeigt).

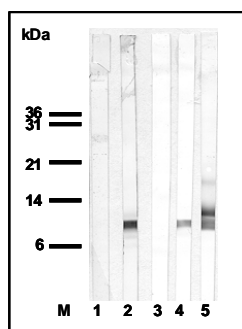
### 5.3.1.2 Reinigung des 9 kDa-Proteins aus Tomatenschalenextrakt

Für die Reinigung von nLyc e 3 aus Tomatenschalenextrakt wurden 2 Strategien verfolgt: die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durch eine präparative SDS-PAGE (Kap. 4.2.2.1) und die Reinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels FPLC (Kap. 4.2.2.2).

#### 5.3.1.2.1 Präparative SDS-PAGE

Die Auftrennung von Tomatenschalenextrakt (Kap. 4.2.1.1) erfolgte nach den Methoden von Laemmli sowie Schägger und von Jagow mittels präparativer SDS-PAGE mit Acrylamidkonzentrationen der Trenngele von 15-17,5% (Kap. 4.2.2.1). Die Fraktionen wurden über eine Tris-Glycin SDS-PAGE nach Laemmli (Kap. 4.2.4.1.1) (15% Acrylamid) und anschließender Silberfärbung (Kap. 4.2.5.2) analysiert. Fraktionen mit einer Bande bei ca. 9 kDa wurden gemischt und über ihre Immunreaktivität durch Immundetektion mit einem Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP Serum (Tab. 3.2) identifiziert. Um die Präsenz von Lyc e 1 (10 kDa) in den Fraktionen auszuschließen, wurde die Immundetektion ebenfalls mit einem kreuzreaktiven Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin Serum durchgeführt. Alle Immundetektionen zeigten, dass weder durch unterschiedliche Gelsysteme (Laemmli vs. Schägger und von Jagow) noch durch Verlängerung der Trennstrecke (7-10 cm) eine Trennung des immunreaktiven 9 kDa-Proteins und Lyc e 1 möglich war. In Abb. 5.2 ist ein Beispiel für die Detektion der immunreaktiven Proteine von einer Fraktion dargestellt.



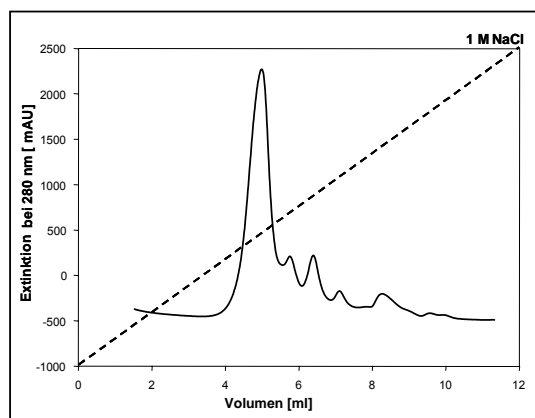


**Abb. 5.2: Mittels präparativer SDS-PAGE konnte die 9 kDa Bande nicht von *Lyc e 1* separiert werden.**

Die Analyse der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE (15% Laemmli), der Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mittels semi-dry Blot. 1: Nichtallergikerserum, 2: Tomatenallergiker (Tab. 5.1 Nr. 30), 3: Kaninchennormalserum, 4: Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP Serum, 5: Kaninchen-anti-Traubenkraut-Proflin Serum. M: Molekulargewichtsstandard M12 (Invitrogen, Karlsruhe).

### 5.3.1.2.2 Chromatographische Auftrennung

Die Reinigung der 9 kDa Bande aus dem Extrakt (Kap. 4.2.1.4) erfolgte analog zu der Reinigung von natürlichem LTP aus Pfirsich (Pru p 3), welche von Pastorello et al. (1999) publiziert wurde. Da LTPs einen basischen isoelektrischen Punkt (pI) von ungefähr 8 haben, wurde eine erste Trennung nach pI über einen Kationenaustauscher mit einer darauffolgenden Trennung nach Größe durchgeführt. Der hierfür in Puffer A vorliegende Extrakt (Kap. 4.2.1.4) wurde über die Superloop auf den Kationenaustauscher MonoS (Kap. 4.2.2.2.1) aufgegeben. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen kontinuierlichen Gradienten zwischen Puffer A und Puffer B von 0 bis 1 M NaCl bei einem pH von 5. In Abb. 5.3 ist das Chromatogramm der Aufreinigung dargestellt.

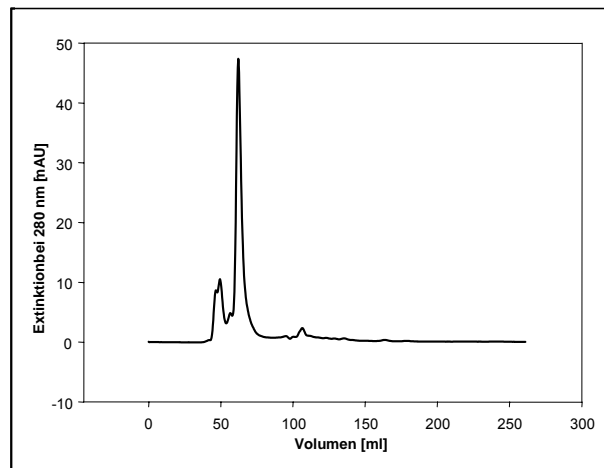


**Abb. 5.3: Das 9 kDa-Protein wird nach 7-9,5 ml von der MonoS eluiert.**

Chromatogramm des ersten Reinigungsschrittes des 9 kDa-Proteins über den Kationenaustauscher MonoS. Gebundene Proteine wurden durch einen kontinuierlichen Gradienten zwischen Puffer A und Puffer B von der Säule eluiert. Nach 7-9,5 ml erfolgte die Elution des 9 kDa-Proteins (grau markiert). Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert.

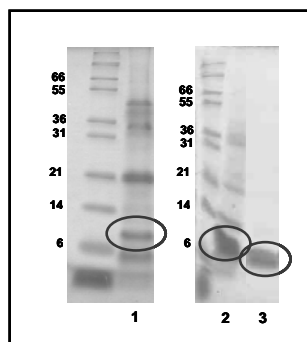
Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) und anschließende Coomassie-Färbung (Kap. 4.2.5.1) der Proteine analysiert. Fraktionen, die das 9 kDa-Protein enthielten, wurden gemischt. Das Protein wurde nach 7-9,5 ml von der Säule eluiert (in Abb. 5.3 in grau dargestellt), was einer Salzkonzentration von ca. 25% entspricht. Da das Protein nach der ersten Reinigung einen Reinheitsgrad von 50% besaß, mussten die höhermolekularen Proteine durch einen weiteren

Reinigungsschritt entfernt werden. Mittels Zentrifugation wurden die Fraktionen auf ein Volumen von 200  $\mu$ l aufkonzentriert und in dem zweiten chromatographischen Schritt über die Superdex 30 (Hi Load 16 / 60) von den verbliebenen Proteinen getrennt (Kap. 4.2.2.2). Nach ungefähr 60 ml wurde das gereinigte Protein von der Säule eluiert. Abb. 5.4 zeigt das Chromatogramm nach der Reinigung über Superdex 30 (Hi Load 16 / 60) und einzelne Schritte der Reinigung sind in Abb. 5.5 dokumentiert. Insgesamt wurden aus 165 g Tomatenschale 1,2 mg gereinigtes 9 kDa-Protein präpariert.



**Abb. 5.4:** Das 9 kDa-Protein wird nach ca. 60 ml von der Superdex 30 eluiert.

Chromatogramm des zweiten Reinigungsschritts des 9 kDa-Proteins über die Größenfraktionierung Superdex 30. Die Proteine wurden durch Elutionspuffer von der Säule eluiert. Nach ca. 60 ml erfolgte die Elution des 9 kDa-Proteins (grau markiert). Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert.



**Abb. 5.5:** Dokumentation der einzelnen Reinigungsschritte bei der chromatographischen Reinigung des 9 kDa-Proteins.

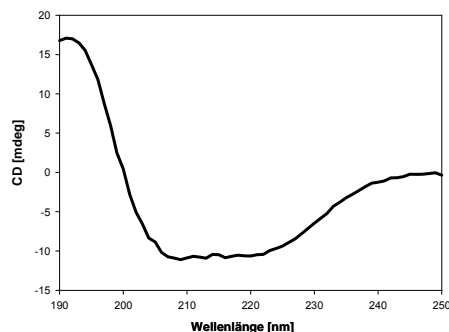
15%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Elektrophorese und Coomassie-Färbung. 1: Tomatenschalenextrakt; 2: Pool nach Aufreinigung über MonoS; 3: gereinigtes 9 kDa-Protein nach Superdex 30. Das Zielprotein ist durch Umkreisungen gekennzeichnet. M: Molekulargewichtsstandard: M12 (Invitrogen, Karlsruhe).

### 5.3.1.3 Strukturelle Untersuchung des 9 kDa-Proteins

#### 5.3.1.3.1 CD-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur des 9 kDa-Proteins wurde mittels CD-Spektrometrie (Kap. 4.2.9.4) gemessen und ist in Abb. 5.6 dargestellt. Ziel war die Identifikation der für LTPs charakteristischen  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur mit ihren charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm. Da davon ausgegangen

wird, dass die natürliche Präparation aus verschiedenen Isoformen besteht, war die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität nicht möglich. Daher können aus dem CD-Spektrum ausschließlich qualitative Aussagen getroffen werden. Die charakteristischen Minima für  $\alpha$ -helikale Proteine mit korrekt gefalteten Sekundärstrukturelementen sind jedoch zu erkennen.



**Abb. 5.6: CD-Spektrum des 9 kDa-Proteins.**

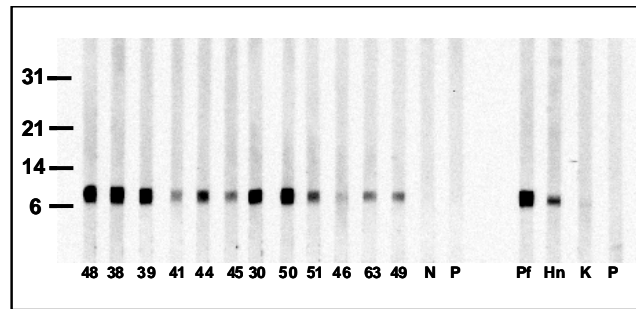
Die Messung erfolgte in 10 mM Kaliumphosphatpuffer bei 20°C. Es wurden 10 Spektren akkumuliert und die identisch aufgenommenen und 10-fach akkumulierten Pufferspektren subtrahiert.

#### 5.3.1.3.2 N-terminale Sequenzierung

Zur Identifikation der IgE- und IgG-reaktiven Bande bei 9 kDa als LTP wurde eine N-terminale Sequenzierung mittels MALDI-TOF (Kap. 4.2.12) durchgeführt. Tomatenschalenextrakt wurde über SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Kap. 4.2.6.1) und diese mittels Coomassieblau gefärbt (Kap. 4.2.5.1). Die vorliegende Sequenz von 13 Aminosäuren L S (C) G Q V E S G L A P (C) identifiziert das 9 kDa-Protein auf Grund des LTP-charakteristischen Cysteins an dritter Position und einer hohen Sequenzidentität zu anderen bekannten LTPs als LTP.

#### 5.3.1.4 Benennung des 9 kDa-Proteins als Tomatenallergen Lyc e 3

Die Prävalenz der IgE-Bindung an das natürliche Tomaten LTP wurde mittels Immunoblot mit Tomatenschalenextrakt auf der Festphase bestimmt (Tab. 5.1). Hierbei zeigten 14/57 (24%) Patientenseren eine IgE-Bindung an das Tomaten LTP. Ein Protein kann als Allergen benannt werden, wenn mindestens 5 Patienten mit einer entsprechenden Allergie spezifische IgE-Antikörper aufweisen. Daher wurde das 9 kDa-Protein als Minorallergen (Prävalenz der IgE-Bindung < 50%) mit dem Namen Lyc e 3 Acc. Nr.: U81996 in die Allergen-Datenbank der International Union of Immunological Societies (IUIS) aufgenommen. In Abb. 5.7 ist ein Immunoblot mit 12 Tomatenallergikerseren dargestellt. Dies sind 12 der 14 Seren, die im Immunoblot mit Tomatenschalenextrakt auf der Festphase eine IgE-Bindung an das Lyc e 3 zeigten. Diese IgE-Reaktivität sollte durch einen Immunoblot mit natürlich gereinigtem Lyc e 3 bestätigt werden. Serum 53 und 57 (Tab. 3.1) konnten für diesen Blot nicht mehr verwendet werden, da sie verbraucht waren.

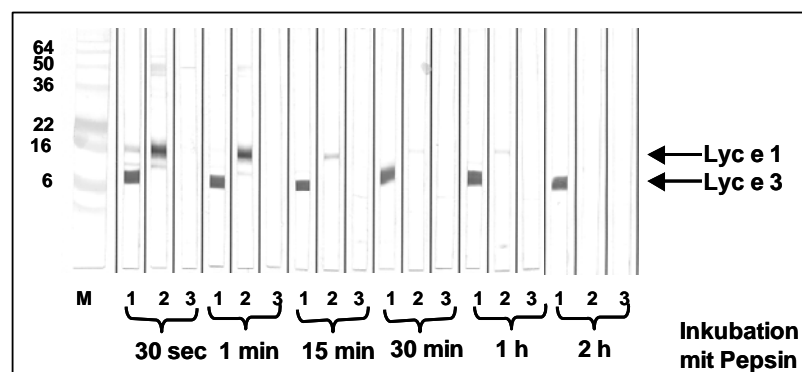


**Abb. 5.7:** Die nLyc e 3 positiven Seren (selektioniert nach IgE-Bindung an Lyc e 3 in Tomatenschalenextrakt) reagierten auch mit gereinigtem nLyc e 3.

Lyc e 3 wurde mit einer Konzentration von 0,5 µg auf der Festphase im Immunoblot verwendet. Die Detektion erfolgte mit 12 Tomatenallergikern, die im Extrakt eine IgE-Bindung bei ca. 9 kDa zeigten. N: Nichtallergiker, P: Pufferkontrolle, Pf: Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP, Hn: Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP, K: Kaninchennormalserum

### 5.3.1.5 Untersuchung der Stabilität von nLyc e 3 nach Verdau mit Pepsin von Tomatenschalenextrakt und in prozessierten Tomaten

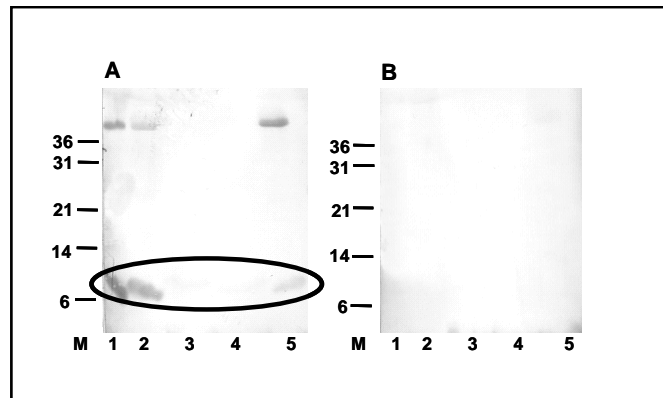
Der mittels Pepsin verdaute Tomatenschalenextrakt (Kap. 4.2.3) wurde über eine SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt (Kap. 4.2.4.1) und auf Nitrocellulose übertragen (Kap. 4.2.6.1). Die Detektion von Lyc e 3 erfolgte mit einem Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP Serum und mit dem Serum eines nicht immunisierten Kaninchens (Kap. 4.2.6.3). Ebenfalls wurde zum Vergleich der Stabilität des natürlichen Tomatenprofilins mit einem kreuzreaktiven Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin Serum detektiert. Noch nach 2 Std. Verdau mit Pepsin konnte IgG-reaktives Lyc e 3 identifiziert werden. Im Vergleich hierzu war das Lyc e 1 nach 15-30 Min. Pepsinverdau bereits abgebaut (Abb. 5.8).



**Abb. 5.8:** Pepsinverdau von Lyc e 3 und Lyc e 1 in Tomatenschalenextrakt.

Detektion von Lyc e 3 und Lyc e 1 nach unterschiedlichen Verdauezeiten. 1: Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP, 2: Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin; 3: Kaninchennormalserum, M: Molekulargewichtsstandard: See Blue Plus.

Zur Untersuchung der Stabilität von Lyc e 3 bei der Prozessierung wurden PBS Extrakte aus der Schale von gekochten Tomaten und aus getrockneten Tomaten hergestellt (Kap. 4.2.1.2). Zusätzlich wurde die wässrige Komponente und Schwebstoffe von Tomatensaft untersucht. Im Immunoblot konnte Lyc e 3 in gekochten Tomaten und getrockneten Tomaten detektiert werden (Abb. 5.9). Das spezifische Serum erkennt bei manchen Extrakten zusätzlich eine Bande im höhermolekularen Bereich (>36 kDa), was zuvor nicht beobachtet wurde. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Oligomerisierung.

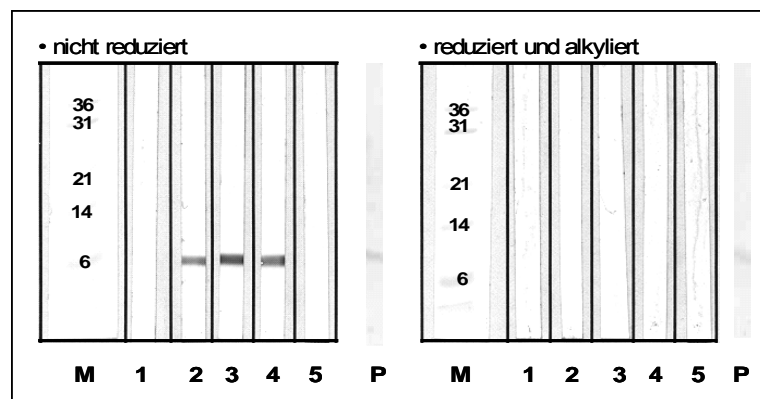


**Abb. 5.9: Lyc e 3 besitzt eine hohe Stabilität bei der Verarbeitung.**

Immunoblot mit 2: Schalenextrakt von gekochten Tomaten, 3: wässrige Bestandteile Tomatensaft, 4: Schwebeteilchen Tomatensaft und 5: getrocknete Tomaten sowie 1: Tomatenschalenextrakt als Positivkontrolle. Detektiert wurde mit einem A: Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Serum und B: Kaninchennormals Serum als Negativkontrolle.

### 5.3.1.6 Untersuchung der Strukturabhängigkeit der IgE-bindenden Epitope von nLyc e 3

Zur Analyse der IgE-bindenden Epitope wurde nLyc e 3 reduziert und alkyliert (Kap. 4.2.11). Durch Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücken und nachfolgender Alkylierung wird die Konformation des Proteins irreversibel zerstört. Reduziertes und alkyliertes sowie nicht reduziertes nLyc e 3 wurde für einen Immunoblot (Kap. 4.2.6) verwendet und mit Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP (Tab. 3.2) und den Lyc e 3 reaktiven Humansenen CS-001 und PEI 131 detektiert. Eine Reduktion und Alkylierung resultierte in der Aufhebung der IgE-Bindung an Lyc e 3. Dies bedeutet, dass die bei der Reduktion zerstörte Tertiärstruktur für die Immunreaktivität von nLyc e 3 verantwortlich ist. Die Immunreaktivität von Lyc e 3 ist also auf die Konformation zurückzuführen.



**Abb. 5.10: Die IgE-Bindung von nLyc e 3 beruht auf der Konformation des Proteins.**

Gegenüberstellung der IgE- und IgG-Bindungskapazität von nicht reduziertem versus reduziertem und alkyliertem Lyc e 3. 1: nicht immunisiertes Kaninchen, 2: Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP, 3: CS-001, 4: PEI 131, 5: Nichtallergiker. P: Färbung des Proteins auf der Nitrocellulosemembran mittels PoncausS; M: Molekulargewichtsstandard M12.

### 5.3.2 Identifikation und Charakterisierung von Lyc e 3 Isoformen

Im Rahmen der Identifikation und Charakterisierung von Isoformen sollten zwei ausgewählte Isoformen, Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2, in *E.coli* exprimiert (Kap. 4.1.10) und deren IgE-Bindungskapazität sowie die biologische Aktivität verglichen werden. Parallel dazu wurde nLyc e 3 zur Identifikation von natürlich vorkommenden Isoformen zweidimensional aufgetrennt (Kap. 4.2.4.2).

#### 5.3.2.1 Klonierung der beiden Isoformen Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2

LTPs bestehen aus einer Multigenfamilie. Zu Beginn der Studie waren 14 „expressed sequence tags“ (EST) oder cDNA Vollängensequenzen für Tomaten LTPs aus verschiedenen Varietäten in der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verfügbar. Elf dieser Sequenzen stammen aus der Tomatenfrucht und 8 hieraus ließen sich auf Grund ihrer Sequenzähnlichkeit in zwei Gruppen einteilen. Jeweils eine cDNA Vollängensequenz wurde als Repräsentant dieser beiden Gruppen von Prof. Dr. U. Sonnewald ausgewählt, als Lyc e 3.1 und 3.2 benannt und in dem Klonierungsvektor pCR-2.1-TOPO zur Verfügung gestellt. Die Aminosäureidentität der beiden Isoformen beträgt 75% (Abb. 5.11). Die Aminosäureidentität der beiden Isoformen mit der N-terminalen Sequenz (Kap. 5.3.1.3.2) beträgt ca. 85%. Zum Vergleich der IgE- und IgG-Bindungskapazität und der allergenen Potenz der beiden Isoformen sollten sie in *E.coli* exprimiert werden. Für die Expression der Isoformen wurden drei verschiedene Expressionssysteme, TOPO- (Kap. 5.3.2.1.1), Glutathion-S-Transferase- (Kap. 5.3.2.1.2) und das Thioredoxin-System (Kap. 5.3.2.1.3), miteinander verglichen.

		1		50
Lyc e 3.1	(1)	LITCGQVTSTLAPCLPYLMNRGPLRNCCDGVKGLLGQA	KTIVDRQAACTCL	
Lyc e 3.2	(1)	LSOGEVTSGLAPCLPYLEGRGPLGGCCGGVKGLLGA	AKTIPEDRKTACTCL	
		51		90
Lyc e 3.1	(51)	KSAASSFTGLNLGKAAALENTCSVNIPYKISPSTDCSKVQ		
Lyc e 3.2	(51)	KSAANSIKGIDTGKAAGLPGVCGVNIPYKISPSTDCSIV-		

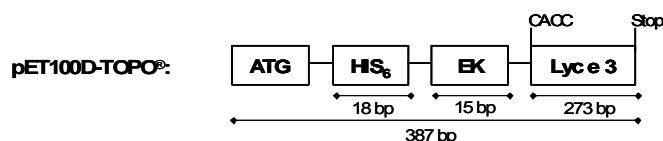
**Abb. 5.11: Die Aminosäuresequenzidentität von Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2 beträgt auf Proteinebene 75%.**

Sequenzvergleich der beiden Isoformen auf Proteinebene, durchgeführt in Vektor NTI. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

#### 5.3.2.1.1 pET100/D-TOPO®

Zur Umklonierung der Isoformen aus dem pCR®2.1-TOPO® Vektor in den Vektor pET100/D-TOPO® (Tab. 3.6) wurde zunächst das 5´Ende der Zielsequenz durch eine PCR (Kap. 4.1.1) um die Sequenz CACC für die gerichtete Ligation verlängert. Da „blunt-ends“ für die Klonierung notwendig waren, wurde die Polymerase *Pwo* für die PCR verwendet. Das PCR Produkt wurde dann im Agarose-Gel aufgetrennt (Kap. 4.1.5), ausgeschnitten, gereinigt (Kap. 4.1.2) und das gereinigte PCR Produkt in den Vektor pET100/D-TOPO® ligiert (Kap. 4.1.4.1). Mit den Ligationsansätzen wurden *E.coli* TOP 10 one shot Zellen transformiert (Kap. 4.1.6). Zur Selektion von positiven Transformanden wurde eine Kolonie-PCR mit Bakterienkolonien und den vektorspezifischen Primern T7 Promotor und T7 Terminator durchgeführt (Kap. 4.1.7.2). Plasmide positiver Kolonien wurden isoliert (Kap. 4.1.8) und

sequenziert (Kap. 4.1.9). Ein selektioniertes Konstrukt wurde anschließend in *E.coli* BL 21 transformiert (Kap. 4.1.6).

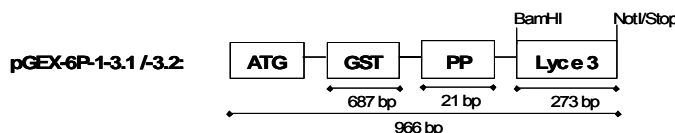


**Abb. 5.12: Schematische Darstellung der pET100/D-TOPO Expressionsprodukte.**

ATG: Starkodon, HIS<sub>6</sub>: Hexahistidinanhang, EK: EKMax Schnittstelle und Lyce 3: jeweilige Lyce 3.1 oder Lyce 3.2 cDNA.

### 5.3.2.1.2 pGEX-6P-1

Ein Expressionsvektor, der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* enthält, wurde als weiterer Expressionsvektor ausgewählt. Das Expressionsprodukt enthält einen GST-Fusionsanteil, sowie eine PreScission<sup>TM</sup> Protease Schnittstelle. Da die PreScission<sup>TM</sup> Protease ebenfalls einen GST-Fusionsanteil besitzt, kann das Protein gespalten und gleichzeitig der abgespaltene GST-Fusionsanteil sowie die Protease in einem Schritt mit Hilfe von Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aus der Lösung entfernt werden. Das Zielprotein liegt nach Spaltung ohne Fusionsanteil vor.



**Abb. 5.13: Schematische Darstellung der pGEX-6P-1 Expressionsprodukte.**

ATG: Starkodon, GST: Glutathion-S-Transferase, PP: PreScission<sup>TM</sup> Protease Erkennungssequenz und Lyce 3: jeweiliges Lyce 3.1 oder Lyce 3.2 cDNA.

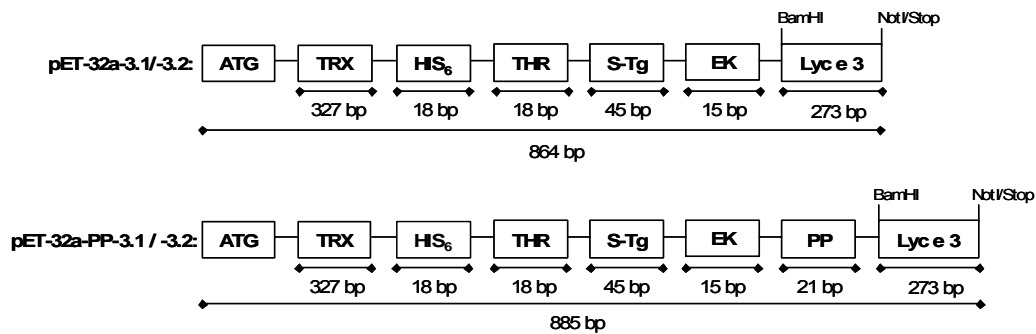
Die Insertion des Zielgens erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I. Zur Konstruktion der pGEX-6P-1 Expressionsprodukte wurde eine PCR (Kap. 4.1.1) mit Taq Polymerase und den unter Kap. 3.2 aufgeführten Primern durchgeführt. Als Matritze dienten pCR-2.1-TOPO-3.1 bzw. -3.2 (Tab. 3.4). Die Amplifikate wurden im Agarose-Gel (Kap. 4.1.5) auf ihre korrekte Größe überprüft, ausgeschnitten und gereinigt (Kap. 4.1.2). Das gereinigte PCR Produkt wurde über den A-Überhang in den linearisierten Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> ligiert (Kap. 4.1.4.1). *E.coli* TOP 10 one shot wurden mit dem Ligationsprodukt, wie unter Kap. 4.1.6 beschrieben, transformiert und auf LB-Amp-X-Gal Platten (Kap. 3.3) ausgestrichen. Da der Vektor pCR-II-TOPO eine blau-weiß-Selektion ermöglicht (Kap. 4.1.7.1), wurden für die Kolonie-PCR (Kap. 4.1.7.2) ausschließlich weiße Kolonien gepickt. Nach der Kolonie-PCR wurden Plasmide mit einem PCR Produkt in der richtigen Größe isoliert (Kap. 4.1.8) und zur Sequenzierung (Kap. 4.1.9) versandt.

Ein positiv selektioniertes Plasmid wurde ausgewählt, vervielfältigt und das Zielgen mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I aus dem Vektor ausgeschnitten (Kap. 4.1.3). Nach Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 4.1.5) wurde das Verdauprodukt aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt (Kap. 4.1.2) und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Not*I geschnittenen, dephosphorylierten und gereinigten pGEX-6P-1 Vektor ligiert (Kap. 4.1.4.2). Nach Transformation (4.1.6) von *E.coli* TOP 10 one shot wurde eine Kolonie PCR zur Identifikation von positiven Transformanden durchgeführt. Die

korrekte Sequenz der präparierten Plasmide wurde durch Sequenzierung (Kap. 4.1.9) verifiziert. Die Plasmide wurden in *E.coli* Origami (DE3) oder BL 21 (DE) transformiert (Kap. 4.1.6).

### 5.3.2.1.3 pET-32a

Für die Klonierung in das Thioredoxin Expressionssystem wurde der Vektor pET-32a verwendet. Bei diesem Vektor wird neben dem Thioredoxinanhang, eine S-Anhangssequenz, eine Hexahistidinsequenz und die Proteaseerkennungssequenzen für EKMax und Thrombin mit dem Zielprotein exprimiert. Für jede Isoform wurden Konstrukte verwendet, die sich ausschließlich durch die Anwesenheit einer PreScission<sup>TM</sup> Protease Schnittstelle in einem Konstrukt (pET-32a-PP-3.1 / -3.2) unterschieden (Abb. 5.14). Die Insertion des Zielgens erfolgte wie bei der Insertion in das pGEX System über die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I und wurde nach demselben Schema durchgeführt. Der einzige Unterschied war die Nutzung der 5'-Primer G1\_Bam\_fow\_PP und G2\_Bam\_fow\_PP\_II (Kap. 3.2) zur Klonierung der Konstrukte pET-32a-PP-3.1 und pET-32a-PP-3.2, durch welche eine zusätzliche Proteaseschnittstelle eingefügt wurde.



**Abb. 5.14: Schematische Darstellung des Aufbaus der Expressionsprodukte nach Expression in pET-32a bzw. pET-32a-PP.**

A: ATG: Starkodon, TRX: Thioredoxinanhang, HIS<sub>6</sub>: Hexahistidinanhang, THR: Thrombin Schnittstelle, S-Tg: S-Anhangssequenz, EK: EKMax Erkennungssequenz und Lyc e 3: jeweiliges Lyc e 3.1 oder Lyc e 3.2 cDNA  
B: zusätzlich mit PP: PreScission<sup>TM</sup> Protease Erkennungssequenz.

## 5.3.2.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Isoformen

### 5.3.2.2.1 Optimierung der Aufschlusseffektivität

Zur Ermittlung eines geeigneten Expressionssystems für die beiden Isoformen wurden die verschiedenen Konstrukte hinsichtlich ihrer Expressionsrate und der Verteilung von Protein in löslicher Fraktion im Überstand und in „inclusion bodies“ nach Zellaufschluss verglichen. Zunächst wurden die Konstrukte pET100/D-TOPO-3.1, pGEX-6P-1-3.1 und pET-32a-3.1 in *E.coli* BL 21 (DE) oder Origami (DE3) exprimiert. Für die Versuche zur Induktion der Proteinsynthese wurden die Expressionsstämme mit den Plasmiden transformiert (Kap. 4.1.6), von den Transformanten jeweils eine Kolonie über Nacht bei 37°C in LB-Amp-Medium kultiviert und am nächsten Morgen die Proteinexpression durchgeführt (Kap. 4.1.10).

Die Expression von Lyc e 3.1 war bei Verwendung des Plasmids pET-32a in *E.coli* Origami (DE3) subjektiv am effizientesten. Die Anwesenheit von Thioredoxin wirkte sich auf die Expressionsrate in *E.coli* Origami mit *trxB/gor* Mutation positiv aus. Bei Verwendung des pET100/D-TOPO<sup>®</sup> Plasmids



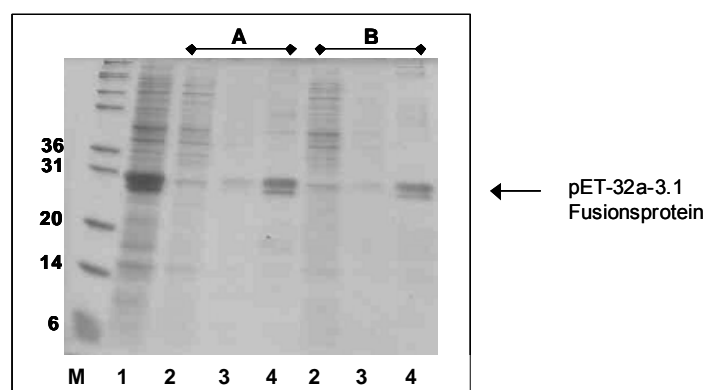
zeigte die Expression eine geringere Effizienz, die subjektiv geringste Expressionsrate wurde nach Verwendung von pGEX-6P-1 verzeichnet. Der Zellaufschluss zur Beurteilung des Expressionslevels erfolgte ausschließlich unter nativen Bedingungen (Kap. 4.1.11.1) durch Einfrieren und Auftauen in flüssigem  $N_2$ . Die Proteinausbeute war bei den einzelnen Systemen sehr unterschiedlich und subjektiv nach Verwendung des pET-32a Expressionssystems am höchsten.

Auf Grund der Vorversuche wurden die Konstrukte pET100/D-TOPO-3.1/-3.2 in *E.coli* BL 21 und pET-32a-3.1/-3.2 in *E.coli* Origami zur Expression im 1 l Maßstab ausgewählt.

Nach nativem Aufschluss der Zellen befand sich noch Zielprotein im Pellet. Deswegen wurde nach Expression des Konstruktes pET-32a-3.1 in *E.coli* Origami ein Aufschluss der Zellen mit Ultraschall (Kap. 4.1.11.3), Harnstoff (Kap. 4.1.11.2) oder Guanidinphosphat (Kap. 4.1.11.2) verglichen. Die Ultraschallbehandlung der Zellen stellte sich als effektivste Methode zum Aufschluss der Zellen heraus. Zusätzlich war hier von Vorteil, dass die Struktur des Proteins nicht durch denaturierende Reagenzien zerstört wurde. Die Expressionsprodukte pET100/D-TOPO-3.1 und -3.2, sowie pET-32a-3.1/-3.2 und pET-32a-PP-3.1/-3.2 wurden über Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 4.2.2.3). Die Aufreinigung der Expression der pGEX-6P-1 Konstrukte wurde auf Grund der geringen Expressionsrate nicht weiter verfolgt.

#### 5.3.2.2.2 Reinigung der Fusionsproteine mittels Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der Fusionsproteine konnte durch die Anwesenheit eines Hexahistidinanhangs mittels Metallionen-Chelat-Affinitätschromatographie (Kap. 4.2.2.3) erfolgen. Hierbei wurden bei der Aufreinigung die Effektivität von  $Ni^{++}$ - gegenüber  $Co^{++}$ -NTA-Agarose am Beispiel des pET-32a-3.1 Expressionsproduktes verglichen. Wie in Abb. 5.15 dargestellt, bestand kein Unterschied bei der Reinheit und Ausbeute des Zielproteins nach Verwendung von  $Ni^{++}$ - oder  $Co^{++}$ -NTA-Agarose. Die Expressionsprodukte des pET100/D-TOPO-3.1/-3.2, pET-32a-3.1/-3.2 und pET-32a-PP-3.1/-3.2 wurden mittels  $Co^{++}$ -NTA-Agarose gereinigt.



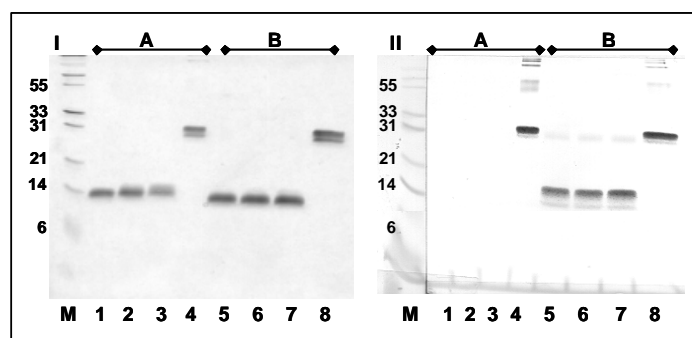
**Abb. 5.15:** Bei der Reinigung des Fusionsproteins pET-32a-3.1 besteht kein Unterschied zwischen  $Ni^{++}$ - und  $Co^{++}$ -NTA-Agarose.

Die Dokumentation der Aufreinigung über  $Ni^{++}$ - [A] und  $Co^{++}$ -NTA-Agarose [B] erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. 1: Überstand nach Lyse, 2: Überstand nach der Bindung an Agarose, 3: Waschpuffer, 4: Elution mit 250 mM Imidazol. M: Molekulargewichtsstandard: M12.

### 5.3.2.3 Proteolytische Spaltungen mit EKMax und Thrombin

Die Fusionsproteine sollten nach ihrer Reinigung proteolytisch in einen Fusionsanteil und einen Lye e 3 Anteil gespalten werden. Vor der Auswahl geeigneter Endoproteasen wurde die Aminosäuresequenz beider Lye e 3 Isoformen auf Erkennungssequenzen von kommerziell erhältlichen Proteasen untersucht. Es wurde keine Erkennungssequenz für EKMax, Thrombin und PreScission™ Protease gefunden.

Die gereinigten Fusionsproteine aus pET100/D-TOPO-3.1 und pET-32a-3.1 wurden in die entsprechenden Puffer für die Spaltung (Kap. 4.2.3) umgepuffert: pET100/D-TOPO-3.1 in EKMax Spaltpuffer und pET-32a-3.1 zu einem Teil in EKMax Spaltpuffer und zum anderen Teil in Thrombin Spaltpuffer. Die unterschiedlichen Verdauansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 4.2.4.1), die Gele mit Silbernitrat gefärbt (Kap. 4.2.5.2) oder die Proteine auf Nitrocellulosemembranen übertragen (Kap. 4.2.6) und die Membranen für eine Immundetektion (Kap. 4.2.6.3) verwendet (Abb. 5.16). Obwohl Lye e 3.1 keine interne EKMax™ Erkennungssequenz ((Asp)<sub>4</sub>-Lys) enthält, ist in Abb. 5.16.A zu erkennen, dass Lye e 3.1 unspezifisch verdaut wurde. Nach EKMax™ Spaltung müssten nach der Silbernitratfärbung zwei Spaltprodukte von 16,5 kDa (Fusionsanteil) und 10,7 kDa (Lye e 3.1) erscheinen. Es wird jedoch ausschließlich der Fusionsanteil oberhalb von 14 kDa detektiert. Ebenfalls ist im Immunoblot keine Reaktion mit dem Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Serum zu erkennen. Die Spaltung mit Thrombin erfolgte hingegen spezifisch (Abb. 5.16.B). Zwanzig µg Fusionsprotein konnten bereits durch 0,005 U Thrombin vollständig verdaut werden. Der Verdau mit Thrombin führte zu der Bildung zweier Spaltprodukte bei ca. 14 kDa. Das errechnete Molekulargewicht der beiden Spaltprodukte liegt für rLye e 3.1 bei 13,6 kDa (Fusionsanteil) und 13,5 kDa (Zielprotein) sowie bei 13,6 kDa (Fusionsanteil) und 12,7 kDa (Zielprotein) für rLye e 3.2. Die Vorversuche zeigten, dass ausschließlich eine Spaltung mit Thrombin zur Entfernung des Fusionsanteils möglich war. Da rLye e 3.1 aus pET100/D-TOPO® ebenfalls durch EKMax unspezifisch gespalten wurde und dieses Expressionsprodukt keine Thrombin Erkennungssequenz (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) enthielt, wurde mit den Expressionsprodukten des pET-32a weiter gearbeitet. Die Ergebnisse der Spaltung mit dem Enzym PreScission™ Protease werden in Kapitel 5.3.2.6.1 beschrieben.

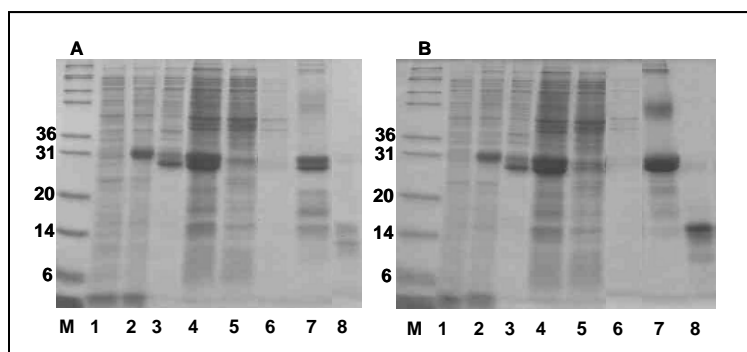


**Abb. 5.16: Analyse des pET-32a-3.1 Expressionsprodukts nach Spaltung mit EKMax und Thrombin.**

Silberfärbung [I] und Immunoblot [II] von Lye e 3.1 mit EKMax [A] und Thrombin [B] verdaut. Verdau durch EK Max mit 1: 4 U; 2: 1 U, 3: 0,1 U, 4: nicht verdautes, in EKMax Puffer umgepuffertes Fusionsprotein. Verdau durch Thrombin mit 5: 0,04 U, 6: 0,02 U, 7: 0,005 U, 8: nicht verdautes, in Thrombin Puffer umgepuffertes Fusionsprotein. Die Immundetektion wurde mit dem Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Serum durchgeführt. M: Molekulargewichtsstandard: M12.

### 5.3.2.4 Herstellung der rekombinanten Isoformen im präparativen Maßstab

Die Ergebnisse zur Optimierung der Expressions-, Aufschluss- und Spaltbedingungen von Lyc e 3.1 wurden zur Etablierung eines Reinigungsprotokolls für die Präparation von rekombantem Lyc e 3.1 und 3.2 (rLyc e 3.1/3.2) genutzt. Die Isoformen wurden als Thioredoxin Fusionsproteine in dem Vektor pET-32a in *E.coli* Origami exprimiert. Die entstandenen Fusionsproteine besaßen eine kalkulierte Größe von 27,1 kDa (Lyc e 3.1) und 26,3 kDa (Lyc e 3.2). Die Lyse erfolgte nach Resuspendierung des Bakterienpellets in Lysispuffer durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff und anschließender Ultraschallbehandlung. Das Fusionsprotein wurde mittels  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose aus dem Bakterienlysat gereinigt (Kap. 4.2.2.3) und danach durch Thrombin gespalten. Die Trennung von rLyc e 3 und dem Thioredoxinanteil erfolgte durch eine zweite Reinigung über  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose, wobei rLyc e 3 im Durchlauf erschien und der His-Fusionsanteil an die Säule gebunden wurde. Da Thrombin Spaltpuffer keine störenden Agenzien für die Bindung des His-Fusionsanteils an  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose enthält, musste die Proteinlösung vor der Entfernung des Fusionsanteils nicht umgepuffert werden. In Abb. 5.17 ist eine typische Reinigung für beide Isoformen dargestellt. Die Ausbeute pro Liter Kultur an Fusionsprotein betrug durchschnittlich ca. 15 mg, die Ausbeute an Endprodukt nach Entfernung des Fusionsanteils durchschnittlich ca. 5 mg. Das apparente Molekulargewicht des Zielproteins liegt bei ca. 14 kDa und nicht bei ca. 10 kDa, wie es für ein LTP zu erwarten wäre. Der Grund ist ein nach Thrombinspaltung an dem Zielprotein verbleibender 38 AS umfassender, ca. 4 kDa großer Anhang. Bei der Bande, die in Abb. 5.17 bei ca. 10 kDa erscheint, handelt es sich nicht um das Zielprotein. Dieses wurde durch einen Immunoblot bei ca. 14 kDa identifiziert.



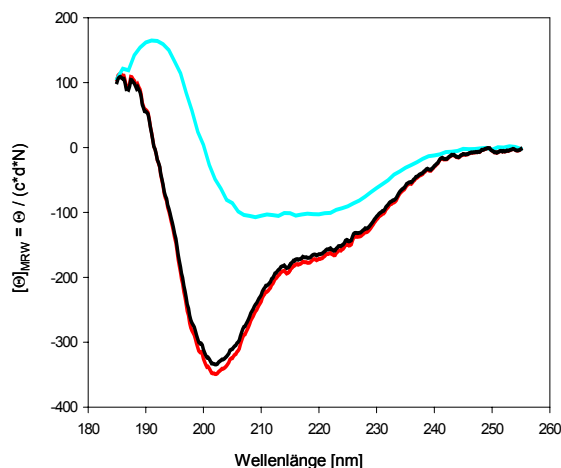
**Abb. 5.17: Verlauf der Reinigung von rLyc e 3.1 [A] und rLyc e 3.2 [B].**

Dokumentation der Reinigung anhand eines 15%igen SDS-Gels nach Coomassie Färbung. Bakteriensuspension 1: vor und 2: nach Zugabe von IPTG, 3: Bakterienpellet und 4: Überstand nach Lyse, 5: Überstand nach Bindung an  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose, 6: Waschpuffer, 7: Eluatfraktion mit 250 mM Imidazol und 8: Zielprotein nach Abspaltung und Entfernung des Thioredoxinanteils mittels Thrombin. M: Molekulargewichtsstandard: M12.

### 5.3.2.5 Strukturelle Untersuchungen der rLyc e 3 Isoformen

Die Sekundärstruktur der gereinigten rekombinanten Lyc e 3 Isoformen (Kap. 5.3.2.4) wurde mittels CD-Spektroskopie (Kap. 4.2.9.4) untersucht. Die CD-Spektren der rekombinanten Isoformen wurden normiert und miteinander und mit dem CD-Spektrum der natürlichen Lyc e 3 Präparation (nicht normiert) verglichen (Abb. 5.18). Die CD-Spektren der rekombinanten Isoformen sind nach Berechnung der mittleren molaren Elliptizität identisch. Sie sind durch Minima bei 202 und 222 nm als

$\alpha$ -helikale Struktur gekennzeichnet, wobei das Minimum bei 202 nm stärker ausgeprägt ist. Verglichen mit dem CD-Spektrum des natürlichen Lyc e 3 weisen die Isoformen eine nach links verschobene Kurve auf. Der Schnittpunkt mit der x-Achse liegt bei den rekombinanten Isoformen bei einer Wellenlänge von ca. 195 nm, bei der natürlichen Präparation bei ca. 200 nm. Diese Unterschiede können durch die 38 Aminosäuren umfassende, 4 kDa große Anhangssequenz am N-terminus entstehen, welche nach Thrombinspaltung an dem Zielprotein verbleibt.



**Abb. 5.18: CD-Spektroskopie von rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 im Vergleich zu nLyc e 3.**

Alle Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 bei 20°C durchgeführt. Die Konzentration der rekombinanten Proteine betrug für rLyc e 3.1 (rot) 2  $\mu$ M und für rLyc e 3.2 (schwarz) 4  $\mu$ M. Die exakte Konzentration von nLyc e 3 (türkis) konnte durch die Anwesenheit mehrerer Isoformen in einem unbekanntem Verhältnis nicht ermittelt werden. Die molare Elliptizität wurde dementsprechend nur für die rekombinanten Lyc e 3 Isoformen berechnet.

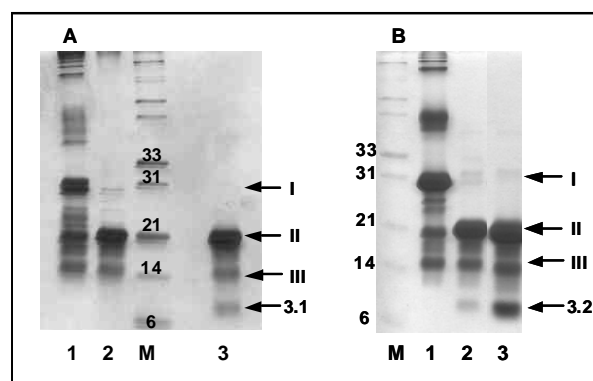
### 5.3.2.6 Herstellung von rLyc e 3 ohne Anhangssequenz am Beispiel von rLyc e 3.1

Die Unterschiede des CD-Spektrums der rekombinanten Isoformen (Kap. 5.3.2.5) und der natürlichen Präparation könnten durch den 4 kDa umfassenden artifiziiellen Überhang nach Thrombinspaltung (Kap. 4.2.3) entstehen. Dieser Überhang hat eventuell einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine. Diese Hypothese sollte durch die Produktion eines Proteins ohne jeglichen Überhang verifiziert werden, um bei einem Vergleich der Immunreaktivität beider Isoformen mit der natürlichen Präparation jeglichen Einfluss dieser Überhänge auszuschließen. Da das Enzym EKMax<sup>TM</sup> nicht zur Herstellung eines solchen Proteins verwendet werden konnte, wurde das Konstrukt pET-32a-PP-3.1/-3.2 kreiert. Die Expression, Lyse und Reinigung erfolgte analog zu der in 5.3.2.4 beschriebenen Abfolge für pET-32a-3.1/-3.2.

#### 5.3.2.6.1 Proteolytische Spaltungen mit dem Enzym PreScission<sup>TM</sup> Protease

Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgte mit der PreScission<sup>TM</sup> Protease im PreScission<sup>TM</sup> Protease Spaltpuffer (Kap. 4.2.3). Da eine Reduktion der Disulfidbrücken vermieden werden sollte, wurde das Protein zu Beginn in einem nach Herstellerangaben modifizierten Spaltpuffer ohne DTT und EDTA geschnitten. Die Silbernitratfärbung in Abb. 5.19 zeigt die Fusionsproteine rLyc e 3.1 (A) und 3.2 (B) vor der Spaltung mit PreScission<sup>TM</sup> Protease (Spalte 1), nach der Spaltung in modifiziertem Spaltpuffer (Spalte 2) und nach der Spaltung in Spaltpuffer mit DTT und EDTA (Spalte 3). Das Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 31 kDa, nach der Spaltung wären zwei

Spaltprodukte mit Molekulargewichten von 22 kDa und 9 kDa zu erwarten. In Abb. 5.19.A, Spalte 2 ist nach Silberfärbung ein Zunahme der 21 kDa Bande zu erkennen, jedoch kein Spaltprodukt bei ca. 9 kDa. Das Fehlen des Lyc e 3.1 Zielproduktes konnte durch einen Immunoblot bestätigt werden (nicht gezeigt). Zusätzlich befindet sich ein ca. 14 kDa großes Protein als Verunreinigung in der Präparation. Rekombinantes Lyc e 3.1 wird bei einer Spaltung in modifiziertem Puffer durch die PreScission™ Protease unspezifisch geschnitten. Die Bande des Zielproduktes Lyc e 3.2 ist in Abb. 5.19.B Spalte 2 sehr schwach zu erkennen. Im Immunoblot reagierte diese Bande mit dem Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Serum (nicht gezeigt). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Spaltung unter reduzierenden Bedingungen mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA durchgeführt. Hier sind die beiden Zielproteine Lyc e 3.1 und 3.2 (mit einem Pfeil gekennzeichnet) zu erkennen. Die beiden Zielproteine wurden von dem Fusionsprotein abgespalten, liegen jedoch in Lösung zusammen mit dem Fusionsprotein (Bande bei ca. 22 kDa) und einer Verunreinigung (Bande bei ca. 14 kDa) vor.

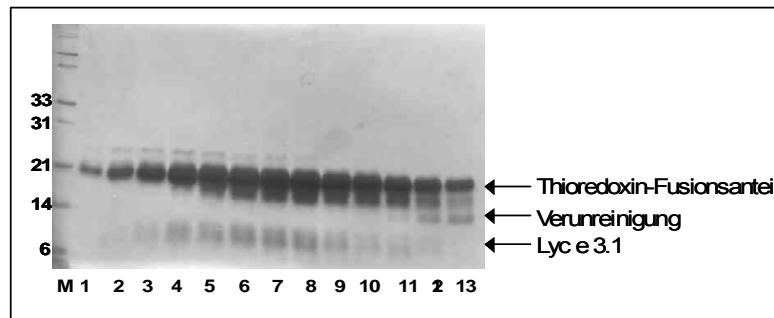


**Abb.5.19: Spaltung der beiden Isoformen in Anwesenheit und Abwesenheit von DTT und EDTA.**

SDS-PAGE 15% Laemmli mit anschließender Silberfärbung des Gels. Lyc e 3.1 [A] und Lyc e 3.2 [B] wurden umgepuffert in Spaltbuffer [1], nach Spaltung mit PreScission™ Protease ohne Anwesenheit von DTT und EDTA [2] und nach Spaltung in DTT und EDTA-haltigem (1 mM DTT; 1 mM EDTA) Spaltbuffer [3]. [I]: Fusionsprotein, [II]: abgespaltener Fusionsanteil, [III]: Verunreinigung bei 14 kDa, M: Molekulargewichtsstandard: M12.

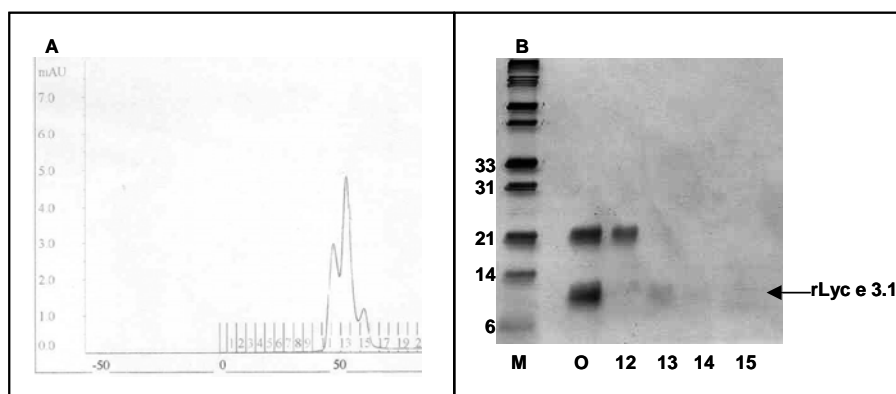
### 5.3.2.6.2 Reinigung

Nach der Spaltung des Expressionsproduktes pET-32a-PP-3.1/-3.2 mittels PreScission™ Protease musste der abgespaltene Thioredoxinanhang (Bande bei ca. 22 kDa) und die Verunreinigung bei ca. 14 kDa aus der Lösung entfernt werden. Da der abgespaltene Thioredoxinanhang eine zusätzliche Polyhistidinsequenz besaß, konnte dieser durch Co<sup>++</sup>-NTA-Agarose, wie in Kap. 4.2.2.3 für die Expressionsprodukte pET-32a-3.1/-3.2 beschrieben, entfernt werden, nicht aber die Verunreinigung bei 14 kDa (nicht gezeigt). Um beide Proteine in einem Schritt von dem Zielprotein abzutrennen, wurde daher eine Größenfraktionierung mit der Superdex 30 (16/60) durchgeführt.



**Abb. 5.20: Überprüfung der Fraktionen von der Aufreinigung von rLyc e 3.1 mittels Superdex 30 (16 / 60).**  
 SDS-PAGE 15% Laemmli, Auftrennung der einzelnen Fraktionen [1-13] und anschließende Silberfärbung des Gels. M: Molekulargewichtsstandard: M12.

Wie in Abb. 5.20 gezeigt, konnte nur eine Trennung des Zielproteins von der 14 kDa Verunreinigung erreicht werden, nicht jedoch von dem Thioredoxinanhang. Das Zielprotein wurde zusammen mit dem Thioredoxin-Fusionsanteil vor der 14 kDa Verunreinigung von der Säule eluiert. Der Thioredoxin-Fusionsanteil muss mit Hilfe von  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose aus der Proteinlösung entfernt werden. Hierfür wurden die Fraktionen 4-9 aus Abb. 5.20 zusammengefasst und der Anhang durch Inkubation mit  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose (Kap. 4.2.2.3) entfernt. In Abb. 5.21.B ist in Spur O zu erkennen, dass das Protein danach immer noch relativ stark verunreinigt war. Aus diesem Grund wurde es über die Größenfraktionierung weiter gereinigt. Abb. 5.21 sind das Chromatogramm [A] und die Silbernitratfärbung (Kap. 4.2.5.2) einer SDS-PAGE (Kap. 4.2.4.1) mit den Fraktionen 12-15 der chromatographischen Aufreinigung von Lyc e 3.1 (aus Konstrukt pET-32a-PP-3.1) zu entnehmen. Fraktion 13 enthält die mit einem Pfeil gekennzeichnete, gereinigte rekombinante Lyc e 3.1 Isoform ohne Anhangssequenz.

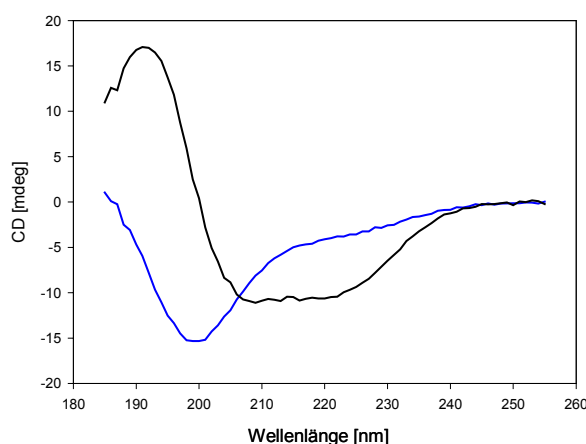


**Abb. 5.21. Reinigung des Fusionsproteins mittels Größenausschlusschromatographie.**  
 [A] Chromatogramm der größenausschlusschromatographischen Reinigung von Lyc e 3.1 (pET-32a-PP-3.1).  
 [B] Analyse der eluierten Fraktionen (12-15) anhand eines 15%igen Laemmli Gels nach Silberfärbung. O: Original Probe, Fraktionen 4-9 aus Abb. 5.20, die vorher noch über  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose gereinigt wurden; M: Molekulargewichtsstandard: M12.

### 5.3.2.6.3 Strukturelle Untersuchung

Die Untersuchung der Sekundärstruktur von rLyc e 3.1 ohne Anhangssequenz erfolgte durch CD-spektroskopische Untersuchungen (Kap. 4.2.9.4). Diese Sekundärstruktur sollte mit der von natürlichem, gereinigtem Lyc e 3 verglichen werden. Es sollte festgestellt werden, ob die Anhangssequenz, die bei der Expression des pET-32a-3.1 (Kap. 5.3.2.4) Konstrukts entsteht, die Sekundärstruktur des rekombinanten Proteins beeinflusst oder ob in *E.coli* hergestelltes LTP anders

gefaltet ist. Die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität war nicht möglich, da die Proteinkonzentration auf Grund der geringen Proteinausbeute nicht bestimmt werden konnte. Aus dem CD-Spektrum können jedoch qualitative Aussagen getroffen werden. In Abb. 5.22 sind bei rLyc e 3.1 ohne Anhangssequenz (blau) keine charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm zu erkennen. Die Verschiebung der Kurve nach links im Vergleich zu der Kurve von nLyc e 3 (schwarz) deutet auf einen dominanten Anteil an ungefaltetem Material hin. Mit Hilfe der oben genannten Spaltungs- und Reinigungsstrategie konnte kein Protein ohne Anhangssequenz mit einer Sekundärstruktur entsprechend der Sekundärstruktur der natürlichen Präparation hergestellt werden. Im Vergleich zu der rLyc e 3.1 Präparation, die unter 5.3.2.4 hergestellt wurde, liegt in dieser Präparation ein noch höherer Anteil an ungefaltetem Material vor.



**Abb. 5.22: CD-Spektroskopie von rLyc e 3.1 im Vergleich zu nLyc e 3.**

Alle Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 bei 20°C durchgeführt. Die exakte Konzentration von nLyc e 3 (schwarz) bzw. rLyc e 3.1 (blau) konnte durch die Anwesenheit mehrerer Isoformen in einem unbekanntem Verhältnis bzw. auf Grund der für eine Proteinbestimmung zu geringen Ausbeute nicht ermittelt werden.

#### 5.3.2.6.4 Weitere Versuche zur Expression rekombinanter Proteine ohne Anhangssequenz

Um eine ausreichende Menge an korrekt gefaltetem rLyc e 3 ohne Anhangssequenz für den Vergleich mit nLyc e 3 zu erhalten, wurden weitere Versuche zur Proteinreinigung durchgeführt. Ein Versuch war die Lyse, Aufreinigung und Spaltung sowie der Auftrag von rLyc e 3.1 auf die Superdex 30 (16 / 60) unter denaturierenden Bedingungen (Kap. 4.1.11.2). Die Lyse und Aufreinigung erfolgte unter Anwesenheit von 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, danach wurden die Proteine in PreScission<sup>TM</sup> Protease Spaltpuffer, welcher als Reduktionsmittel DTT enthielt, umgepuffert und der Fusionsanteil proteolytisch abgespalten. Diese Lösung wurde auf 2 ml mittels Vivaspin Röhren (Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa aufkonzentriert und größenchromatographisch aufgetrennt (Kap. 4.2.2.2). Eluiert wurde ohne Zusatz von DTT mit Elutionspuffer. Hierdurch sollte eine langsame Rückfaltung des Proteins erzielt werden.

Des Weiteren wurde nach Lyse und Aufreinigung unter nativen Bedingungen (Kap. 4.1.11.1, 4.2.2.3) die Abspaltung der Anhangssequenz in modifiziertem PreScission<sup>TM</sup> Protease Spaltpuffer ohne DTT mit EDTA (Kap. 4.2.3) durchgeführt, um die Struktur der Proteine nicht durch DTT zu zerstören. Unter diesen Bedingungen spaltet die PreScission<sup>TM</sup> Protease beide rekombinanten Isoformen spezifisch,

aber mit einer geringeren Effizienz. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte wiederum nach Aufkonzentrieren auf ein Volumen von 1 ml über Superdex 30 (16 / 60) (Kap. 4.2.2.2).

Die Sekundärstruktur der wie hier beschriebenen rekombinant hergestellten Lyc e 3.1 Isoformen aus dem Konstrukt pET-32a-PP-3.1 wurde mittels CD-Spektroskopie (Kap. 4.2.9.4) bestimmt (nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit keiner dieser Variationen rekombinantes Protein mit einer Sekundärstruktur ähnlich oder gleich der Sekundärstruktur von nLyc e 3 produziert werden konnte.

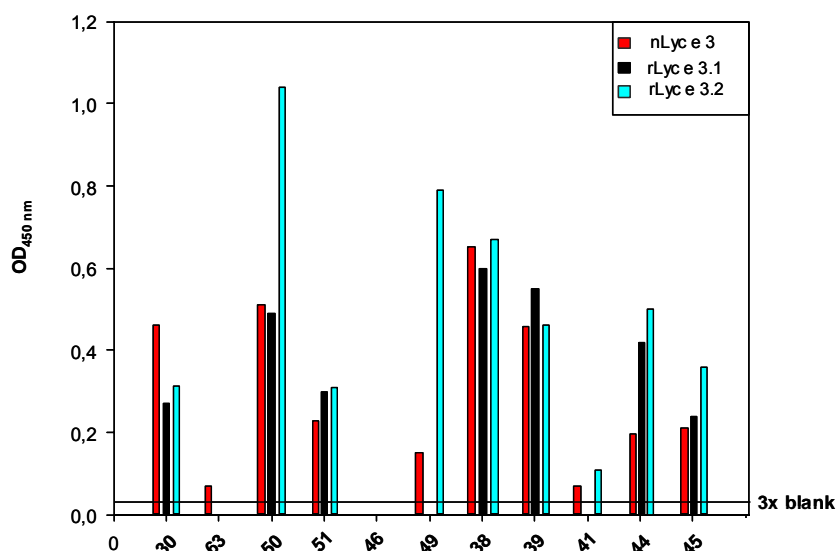
### **5.3.3 Biochemische und immunologische Charakterisierung von rLyc e 3.1 und 3.2 sowie nLyc e 3**

Für die immunologische Charakterisierung der Relevanz verschiedener Isoformen standen die rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2, die in dem Konstrukt pET-32a-3.1/-3.2 exprimiert und wie unter Kap. 5.3.2.4 beschrieben, hergestellt wurden, zur Verfügung. Beide Isoformen besitzen untereinander vergleichbare Sekundärstrukturen, die Sekundärstruktur von nLyc e 3 weist jedoch erhebliche Unterschiede auf.

#### **5.3.3.1 Spezifische IgE-Konzentrationen im Serum**

Zum Vergleich der IgE-Bindungskapazität von nLyc e 3 und den rekombinanten Lyc e 3 Isoformen wurde ein IgE-ELISA (Kap. 4.2.7.1) durchgeführt. Im IgE-ELISA wurden 11 der 14 im Immunoblot mit Tomatenschalenextrakt positiven Seren getestet, die Ergebnisse sind Abb. 5.23 zu entnehmen. Zehn der 11 Seren zeigten eine Bindung von spezifischem IgE an mindestens eines der getesteten Proteine. Ausschließlich Serum 46 war im ELISA mit allen 3 Proteinen negativ, jedoch im Immunoblot mit gereinigtem natürlichem Lyc e 3, wenn auch schwach, positiv (Abb. 5.7, Serum 46). Bei allen anderen Patienten konnte spezifisches IgE gegen nLyc e 3 in ELISA nachgewiesen werden. Die ermittelte  $OD_{450\text{ nm}}$  Werte lagen zwischen 0,08-0,65. Spezifisches IgE gegen rLyc e 3.1 wurde bei 7 der 10 positiven Seren festgestellt, die  $OD_{450\text{ nm}}$  Werte lagen im Bereich 0,23-0,6. Gegen rLyc e 3.2 wurde bei 9 der 10 Seren spezifisches IgE ermittelt, die Werte lagen zwischen  $OD_{450\text{ nm}} = 0,1-1,05$ . Acht der 10 positiven Seren besitzen eine geringere Konzentration an spezifischem IgE gegen nLyc e 3 als für mindestens eine rekombinante Isoform. Zwei Patienten (30, 63) besitzen die stärkste Reaktivität gegen nLyc e 3. Ein Patient besitzt am meisten spezifisches IgE gegen rLyc e 3.1 (39). Tendenziell war die Konzentration an spezifischem IgE gegen rLyc e 3.2 höher als für Lyc e 3.1.





**Abb. 5.23: Ermittlung des spezifischen IgE für nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 im ELISA.**  
Der ELISA wurde mit 11 im Western Blot mit nLyc e 3 positiven Seren durchgeführt. Die Maxisorb-Platte wurde mit 1 µg/ml Allergen gebunden und die Extinktion bei einer OD<sub>450nm</sub> gemessen. Extinktionen von OD<sub>450nm</sub> > 3x blank (0,041) wurden als positiv eingestuft.

### 5.3.3.2 Optimale Serum- und Antigenverdünnung für Inhibitionstests

Die optimale Serum- und Antigenverdünnungen für den Vergleich der IgE-Bindungs Kapazität mittels ELISA-Inhibitionen wurden mit Hilfe der Schachbrett titration ermittelt. In diesem Versuch wird die Maximal extinktion unter Abwesenheit des Inhibitors für unverdünntes und verdünntes Serum bestimmt. Dabei sollte die Extinktion des verdünnten Serums ca. 50% der Extinktion des unverdünnten Serums betragen. Somit wird sichergestellt, dass im Inhibitionstest der Inhibitor im Überschuss bzw. das spezifische IgE im Unterschuss vorliegt. Die Schachbrett titration wurde für nLyc e 3 und die beiden rekombinanten Isoformen für alle Seren durchgeführt. Als Seren für die Inhibitionsversuche wurden auf Grund der Verfügbarkeit CS-001 (Serum Nr. 38) und PEI 131 (Serum Nr. 30) ausgewählt. Die Ergebnisse der Schachbrett titration sind Tabelle 5.2 zu entnehmen. Hierbei wurde die für die ELISA-Inhibition geeignete Serum- und Antigenkonzentration ermittelt.

**Tab. 5.2: Geeignete Serum- und Antigenkonzentration für die ELISA-Inhibition mit den Seren CS-001 und PEI 131.**

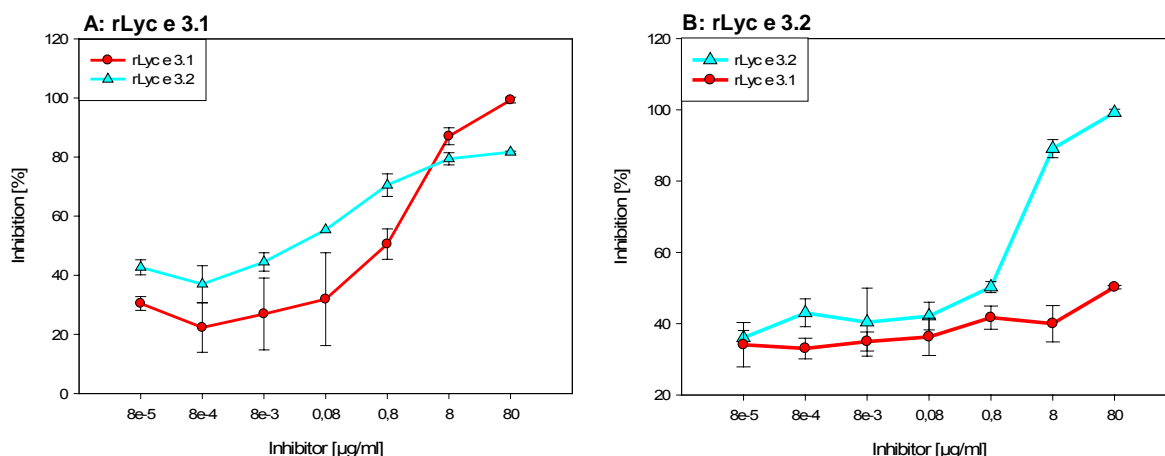
Serum (Verd.)	CS-001	PEI 131
<b>Allergen (µg/ml)</b>		
nLyc e 3	1:9 0,25	1:9 1
rLyc e 3.1	1:9 0,5	1:9 1
rLyc e 3.2	1:27 0,125	1:9 0,5

Verd.: Verdünnung

### 5.3.3.3 Vergleich der IgE-Bindungs Kapazität von rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2

Auf Basis der Ergebnisse der Schachbrett titration (Tab. 5.2) wurde die dosisabhängige ELISA-Inhibition (Kap. 4.2.7.2) mit dem Serum CS-001 und Lyc e 3.1 bzw. Lyc e 3.2 auf der Festphase und

als Inhibitor durchgeführt. Da Serum PEI 131 mit rLyc e 3.1 auf der Festphase unverdünnt hätte eingesetzt werden müssen, wurde dies aufgrund des hohen Serumverbrauchs nicht durchgeführt. In Abb. 5.24 ist zu erkennen, dass durch Eigeninhibition bei beiden Isoformen eine 100%ige Hemmung der IgE-Bindung an das entsprechende Allergen auf der Festphase erreicht werden konnte. Die IgE-Bindung an rLyc e 3.1 konnte durch rLyc e 3.2 maximal zu ca. 80% gehemmt werden, die Kurven weisen zusätzlich eine unterschiedliche Steigung auf. Im Gegensatz dazu war eine Hemmung der IgE-Bindung mit rLyc e 3.1 als Inhibitor an rLyc e 3.2 nur zu maximal 50% möglich. Rekombinantes Lyc e 3.2 besitzt also bei diesem Serum eine höhere IgE-Bindungskapazität als rLyc e 3.1.



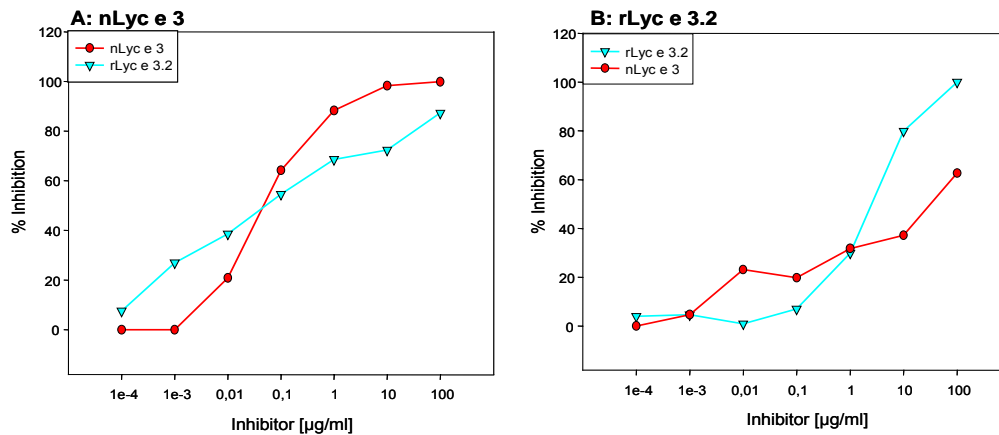
**Abb. 5.24: In der dosisabhängigen ELISA-Inhibition mit dem Patientenserum CS-001 besitzt rLyc e 3.2 eine höhere IgE-Bindungskapazität als rLyc e 3.1.**

A: Dosisabhängige ELISA-Inhibition mit  $0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$  rLyc e 3.1 an der Festphase, die Inhibition wurde mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen und einer Serumverdünnung von 1:9 durchgeführt.

B: Dosisabhängige ELISA-Inhibition mit  $0,125 \mu\text{g} / \text{ml}$  rLyc e 3.2 an der Festphase, die Inhibition wurde mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration und einer Serumverdünnung von 1:27 durchgeführt.

### 5.3.3.4 Vergleich der IgE-Bindungskapazität von nLyc e 3 und rLyc e 3.2

Da die rekombinante Isoform Lyc e 3.2 im Vergleich zu rLyc e 3.1 eine höhere IgE-Bindungskapazität in der ELISA Inhibition mit Serum CS-001 besaß, wurde die IgE-Bindungskapazität dieser Isoform mit der natürlichen Präparation verglichen. Auf Basis der Ergebnisse der Schachbretttitration wurde die ELISA-Inhibition mit den Seren CS-001 und PEI 131 durchgeführt. Bei dem Serum CS-001 konnte mit dem homologen Inhibitor jeweils die IgE-Bindung komplett inhibiert werden (Positivkontrolle). Während mit rLyc e 3.2 die IgE-Bindung an das nLyc e 3 zu ca. 85% inhibiert werden konnte, war eine Inhibition der IgE-Bindung an rLyc e 3.2 mit nLyc e 3 in der maximalen Konzentration nur zu ca. 60% möglich (Abb. 5.25). Bei Betrachtung der Werte für eine 50%ige Inhibition stellt man fest, dass für diese Hemmung der IgE-Bindung an nLyc e 3 dieselbe Menge (Kurvenschnittpunkt) rLyc e 3.2 benötigt wurde. Im Gegensatz dazu wurde von nLyc e 3 ungefähr die 10-50-fache Menge für eine 50%ige Hemmung der IgE-Bindung an rLyc e 3.2 benötigt.

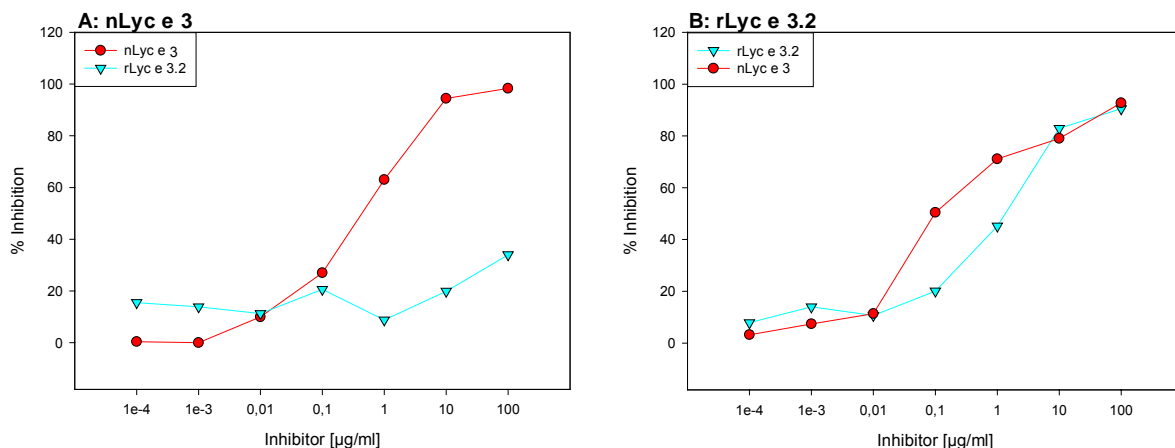


**Abb. 5.25: Dosisabhängige ELISA-Inhibition der IgE-Reaktivitäten mit dem Patientenserum CS-001, nLyc e 3 und rLyc e 3.2 an der Festphase.**

A: Dosisabhängige ELISA-Inhibition mit  $0,25 \mu\text{g/ml}$  nLyc e 3 an der Festphase, die Inhibition wurde mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen und einer Serumverdünnung von 1:9 durchgeführt.

B: Dosisabhängige ELISA-Inhibition mit  $0,125 \mu\text{g/ml}$  rLyc e 3.2 auf der Festphase, die Inhibition wurde mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration und einer Serumverdünnung von 1:27 durchgeführt.

Auch für das Serum PEI 131 erfolgte der Versuchsaufbau auf Basis der Schachbretttitration (Tab. 5.2). Die maximale Hemmung der IgE-Bindung durch Eigeninhibition mit dem jeweiligen Protein lag bei 100%. Während mit rLyc e 3.2 die IgE-Bindung an das nLyc e 3 nur zu ca. 40% inhibiert werden konnte, war eine Inhibition der IgE-Bindung an rLyc e 3.2 mit nLyc e 3 zu ca. 100% möglich (Abb. 5.26). Halbmaximale Inhibitionswerte konnten hier nicht miteinander verglichen werden. Bereits für die 40%ige Hemmung der IgE-Bindung an nLyc e 3 wurde die 100fache Menge an rLyc e 3.2 im Vergleich zu nLyc e 3 benötigt. Für die 50%ige Hemmung der IgE-Bindung an rLyc e 3.2 wurde sogar ein zehnfaches weniger an nLyc e 3 im Vergleich zu rLyc e 3.2 benötigt. Bei Serum PEI 131 besaß nLyc e 3 eine höhere IgE-Bindungskapazität im Vergleich zu rLyc e 3.2.



**Abb. 5.26: Bei Serum PEI 131 besitzt Lyc e 3 eine höhere IgE-Bindungskapazität im Vergleich zu rLyc e 3.2.**

A: Dosisabhängige ELISA-Inhibition mit  $1 \mu\text{g/ml}$  nLyc e 3 an der Festphase, die Inhibition wurde mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen und einer Serumverdünnung von 1:9 durchgeführt.

B: Dosisabhängige ELISA-Inhibition mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  rLyc e 3.2 auf der Festphase, die Inhibition wurde mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration und einer Serumverdünnung von 1:9 durchgeführt.

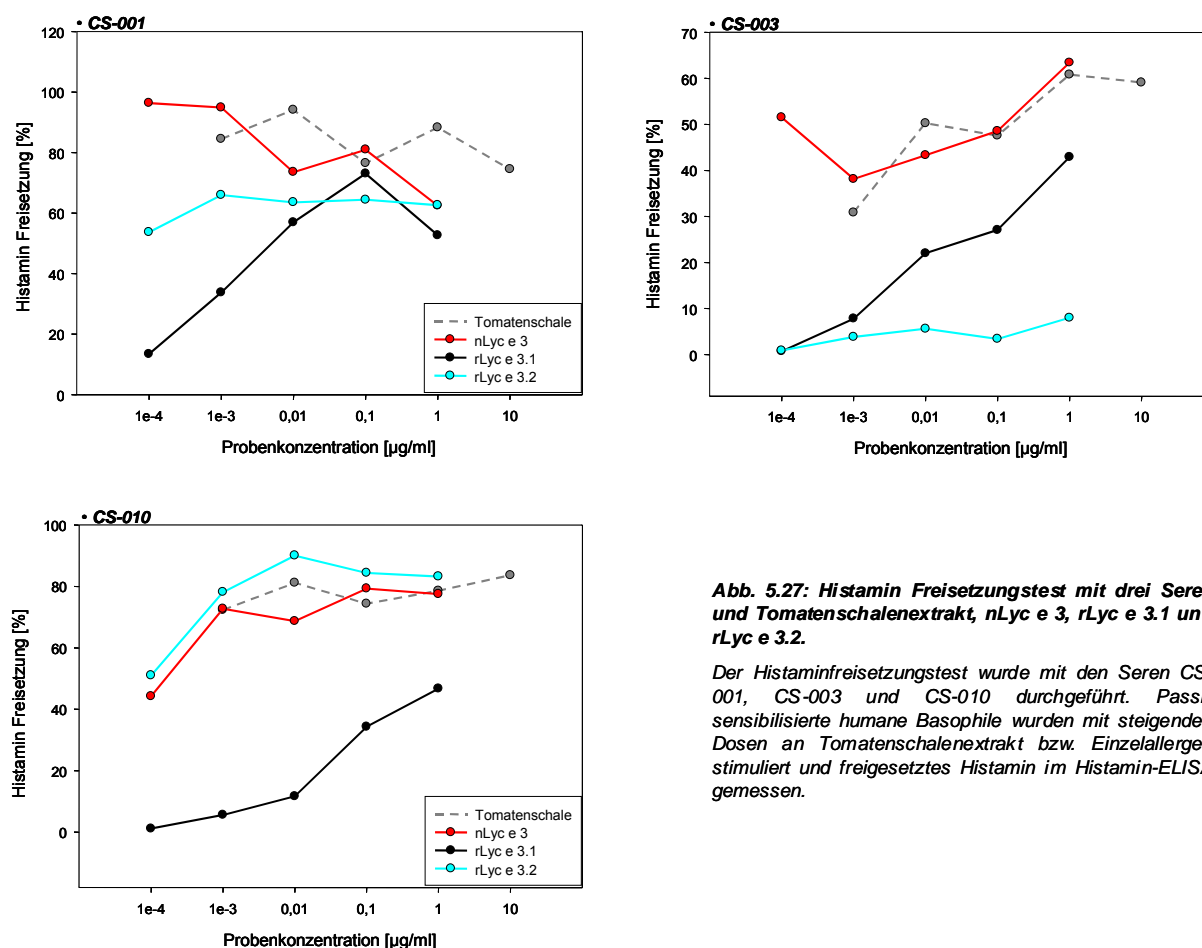
### 5.3.3.5 Vergleich der biologischen Aktivität im basophilen Histaminfreisetzungstest

Mit Hilfe des basophilen Histaminfreisetzungstestes sollte untersucht werden, ob die Unterschiede in der IgE-Bindungskapazität auch bei der Untersuchung der biologischen Aktivität festgestellt werden

können. Der basophile Histaminfreisetzungstest (Kap. 4.2.10) wurde mit den Seren CS-001, CS-003 und CS-010 (Tab. 5.1, Nr. 38, 39, 44) durchgeführt. Serum PEI 131 lieferte bei diesem Test keine verwertbaren Daten, da der spezifische IgE-Titer gegen die drei untersuchten Allergene zu gering war. Die drei verwendeten Seren zeigten im ELISA eine IgE-Bindung gegen nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 (Tab. 5.1). Die passiv sensibilisierten Basophilen eines Nichtallergikers wurden mit Tomatenschalenextrakt nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.27 dargestellt.

Bei Betrachtung des Serums CS-001 war festzustellen, dass nLyc e 3 und Tomatenschalenextrakt die stärkste Freisetzung an Histamin induzierten. Die Kurvenverläufe von rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 zeigten, dass von rLyc e 3.1 eine um das 100fache höhere Proteinmenge eingesetzt werden musste, um dieselbe Menge an Histamin freizusetzen. Die biologische Aktivität von rLyc e 3.2 war bei diesem Serum also um ein hundertfaches höher als die von Lyc e 3.1. Die stärkste Histaminfreisetzung bei Serum CS-003 wurde durch Tomatenschalenextrakt und nLyc e 3 induziert (ca. 60%). Die Kurvenverläufe von nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 zeigen, dass nLyc e 3 die höchste biologische Aktivität besitzt: um eine Histaminfreisetzung von 40% zu induzieren, wurde von nLyc e 3 ungefähr 100mal weniger benötigt als von Lyc e 3.1. Lyc e 3.2 konnte bei diesem Serum keine Freisetzung von Histamin induzieren. Bei Serum CS-010 besaß Tomatenschalenextrakt, nLyc e 3 und rLyc e 3.2 nahezu dieselbe biologische Aktivität. Ihre Kurvenverläufe waren nahezu identisch. Im Gegensatz dazu wurde ungefähr die 10000fache Menge von Lyc e 3.1 benötigt, um die Freisetzung von 40% Histamin zu induzieren.

Die Ergebnisse des Inhibitionstests und des Histamin Freisetzungstests geben einen Hinweis darauf, dass bei den verwendeten Seren deutliche Unterschiede in Bezug auf die IgE-Bindungskapazität und die biologische Aktivität der untersuchten Allergene bestehen. Allgemeine Aussagen können auf Grund der geringen Anzahl an verwendeten Seren nicht gemacht werden.



**Abb. 5.27: Histamin Freisetzungstest mit drei Seren und Tomatenschalenextrakt, nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2.**

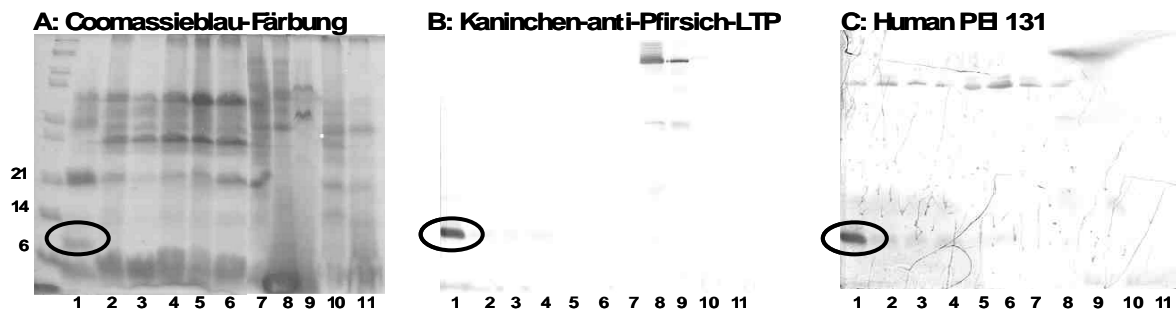
Der Histaminfreisetzungstest wurde mit den Seren CS-001, CS-003 und CS-010 durchgeführt. Passiv sensibilisierte humane Basophile wurden mit steigenden Dosen an Tomatenschalenextrakt bzw. Einzelallergen stimuliert und freigesetztes Histamin im Histamin-ELISA gemessen.

### 5.3.4 Identifikation von nLyc e 3 Isoformen

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D GE) sollten natürlich vorkommende Lyc e 3 Isoformen identifiziert werden. Hierbei wurde das Proteingemisch zuerst nach dem isoelektrischem Punkt (pI) und anschließend nach dem Molekulargewicht aufgetrennt.

#### 5.3.4.1 Optimierung des Extraktionspuffers für die 2D GE

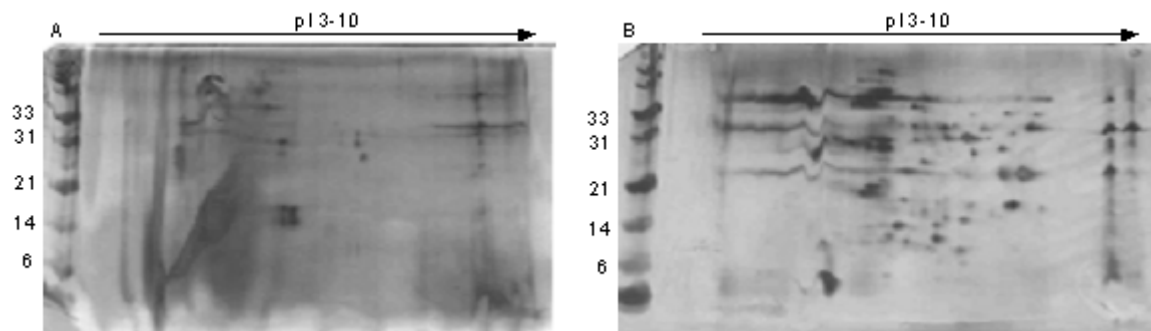
Bei der 2D GE sind die Extraktionspuffer ein kritischer Faktor: es muss soviel Zielprotein wie möglich angereichert werden, damit sichtbare Proteinspots erscheinen. Die Probe, die in der ersten Dimension aufgetrennt wird, darf jedoch kein Salz enthalten. Ansonsten steigt die elektrische Spannung zu stark an und der Gelstreifen schmilzt. Die in Kap. 4.2.1.5 beschriebenen Extraktionsmethoden wurden hinsichtlich der Anreicherung von nLyc e 3 miteinander verglichen.



**Abb. 5.28: Überprüfung des LTP Gehaltes der Extrakte nach verschiedenen Extraktionsmethoden.**

Die subjektive Überprüfung des LTP Gehaltes der Extrakte erfolgte durch die Auftrennung von 20 µg Extrakt / cm Protein in einem 15%igen Laemmli Gel und anschließender Coomassie Färbung [A] oder eines Immunoblots [B,C]. Die Detektion erfolgte mit Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP [B], dem Tomaten LTP positiven Humanserum PEI 131 [C] und den entsprechenden Negativkontrollen (nicht gezeigt). Extraktion mit 1: PBS pH 7,2; 2: Kaliumphosphatpuffer pH 5; 3: 10 mM HCl pH 2; 4: 2 mM HCl pH 2,7; 5: Glycinpuffer; 6: Na-Phosphatpuffer pH 5; 7: Ammoniumcarbonat pH 8,1; 8: Phenolextraktion pH 7,5; 9: TCA-B pH 7,5; 10: ReadyPrep pH 9,7; 11: ReadyPrep-TBP pH 9,7.

Abbildung 5.28 zeigt, dass natürliches Lyc e 3 ausschließlich durch PBS extrahiert werden konnte. Daher musste vor dem Auftrag NaCl aus der Probe entfernt werden. Dazu wurde eine Acetonfällung (Kap. 4.2.1.5) im Vergleich zu einer Reinigung mit dem Clear up Kit von BioRad durchgeführt. Nach der Fällung von in PBS extrahiertem Tomatenschalenextrakt durch Aceton bzw. das Clear up Kit, wurde das Proteinpellet in Rehydratisierungslösung aufgenommen und zweidimensional aufgetrennt (Kap. 4.2.4.2). Abbildung 5.29 zeigt, dass nach der Acetonfällung zu viele störende Substanzen in der Probe verblieben, so dass eine zweidimensionale Auftrennung in Proteinspots nicht möglich war. Im Gegensatz hierzu konnte die mittels Clear up Kit gefällte Probe im pI Bereich von 3-10 und Molekulargewichtsbereich von 6-33 kDa in der 2D GE in einzelne Proteinspots aufgetrennt werden.



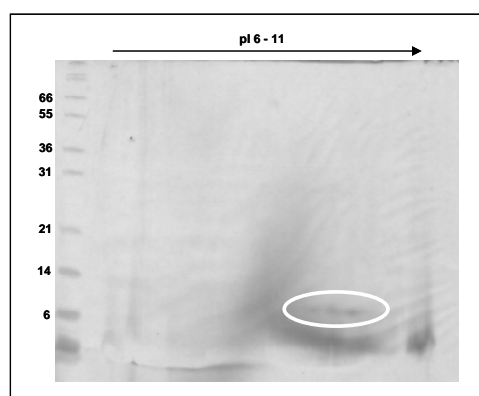
**Abb. 5.29: Vergleich der 2D GE nach Acetonfällung und Fällung und Reinigung mit dem Clear up Kit.**

Zweidimensionale Elektrophorese mit 30 µg Tomatenschalenextrakt nach Acetonfällung [A] und nach Reinigung und Fällung mit dem Clear up Kit (BioRad) [B]. Beide Extrakte wurden in der ersten Dimension über Streifen mit einem pI von 3-10 aufgetrennt, in der zweiten Dimension erfolgte die Trennung über Maxi Gele (15%ige Tris-Glycin) nach Laemmli. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese mittels Silberfärbung angefärbt.

Lipid Transfer Proteine haben einen erwarteten pI von 8-9. Da bei einem Molekulargewicht von 9 kDa und einem pI von 8-9 jedoch keine Spots zu erkennen sind, besteht die Möglichkeit, dass Lyc e 3 bei Nutzung eines Streifens mit pI 3-10 nicht optimal aufgetrennt wurde. Daher wurde die erste Dimension mit Gelstreifen pI 7-10 und Gelstreifen pI 6-11 im Vergleich durchgeführt. Des Weiteren sollten die Versuche mit natürlichem, gereinigtem Lyc e 3 durchgeführt werden, um Störeffekte durch die Matrix zu vermeiden. Da gereinigtes nLyc e 3 zu Beginn der Studie noch nicht zur Verfügung stand, wurden Vorversuche mit gereinigtem nPru p 3, dem LTP aus Pfirsich, durchgeführt.

### 5.3.4.2 Vorarbeiten mit nPru p 3

Natürliches Pru p 3 (7 µg Protein / Streifen) wurde von Christina Hartz (Paul-Ehrlich-Institut) zur Verfügung gestellt. Pru p 3 besitzt wie alle LTPs ein Molekulargewicht von ca. 9 kDa und einen pI zwischen 8-9. Nachdem die Auftrennung in dem Bereich pI 7-10 ebenfalls nicht erfolgreich war, wurde eine Auftrennung im Bereich pI 6-11 gewählt. Außerdem wurde das natürliche Protein mittels „Cup loading“ auf den Streifen aufgegeben (Kap. 4.2.4.2.1), eine Methode, die für basische Proteine empfohlen wird (Görg et al., 2004). Abbildung 5.30 zeigt die Coomassie-Färbung (Kap. 4.2.5.1) eines 2D Gels mit der Auftrennung von nPru p 3 über einen Bereich von pI 6-11. Mögliche Proteinspots sind bei einem Molekulargewicht von ca. 9 kDa und einem isoelektrischen Punkt ca. zwischen pI 9-10 durch einen weißen Kreis gekennzeichnet.



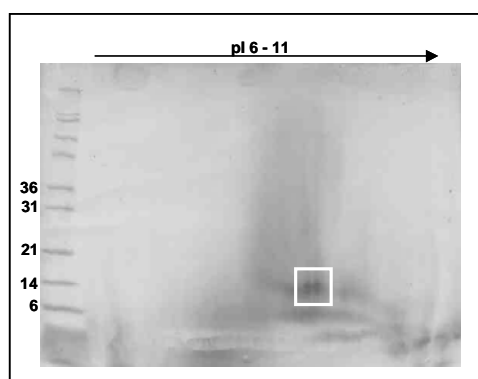
**Abb: 5.30: 2D GE von nPru p 3 über einen pI von 6-11 und ein 15%iges Laemmli Gel.**

Natürliches Pru p 3 (7 µg) wurde in der ersten Dimension über Cup loading auf den rehydratisierten IEF Streifen pI 6-11 gegeben. Nach Reduktion und Alkylierung wurde das Protein in einem Maxi Gel (15% Tris-Glycin nach Laemmli) nach Molekulargewicht aufgetrennt. Molekulargewichtsstandard: M12

Da nach der Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension über ein 15%iges Tris-Glycin Gel nach Laemmli (Kap. 4.2.4.1.1) die Spots nicht klar zu erkennen waren, wurden die Bedingungen für die zweite Dimension durch ein 16%iges Tris-Tricin Gel nach Schagger und von Jagow (Kap. 4.2.4.1.2) geändert. Die Verwendung von Tris-Tricin Gelen resultierte nicht in einer schärferen Auftrennung von nPru p 3 (nicht gezeigt). Daher wurde wieder die Auftrennung im 15%igen Tris-Glycin System durchgeführt und dafür die Bedingungen in der ersten Dimension minimal geändert. Das reduzierende Agens DTT wurde durch TBP (Tributylphosphine) ersetzt. TBP wird bei Nutzung von basischen IEF Streifen und bei der Auftrennung von Proteinen mit einem hohen Anteil an Cysteinen empfohlen (Görg et al., 2004), da es die artifizielle Bildung von Disulfidbrücken verhindert. Eine Reduktion mit DTT und anschließende Alkylierung war vor der zweiten Dimension nicht notwendig. Daher wurde der Gelstreifen nach der ersten Dimension nur in SDS-haltigem Laufpuffer mit SDS beladen.

Auch durch eine Reduktion mit TBP statt mit DTT vor der ersten Dimension konnte keine klarere Auftrennung von Spots erzielt werden. Für den nächsten Versuch wurde die Reduktion mit TBP jedoch beibehalten und das Protein in der zweiten Dimension über ein 10–20%iges Tris-Glycin (Laemmli) Gradientengel (Fertiggel, BioRad, München) aufgetrennt. Der Streifen wurde wie bei selbst hergestellten Gelen vor der zweiten Dimension mit Agaroselösung auf dem Fertiggel fixiert.

Abb. 5.31 zeigt, dass zwei Spots voneinander getrennt werden konnten. Diese beiden Spots sollten zur Identifikation von A. Conti aminoterminal sequenziert (Kap. 4.2.12) werden. Jedoch war eine Sequenzierung entweder auf Grund von zu geringen Proteinmengen oder N-terminaler Blockierung nicht möglich. Eventuell könnte eine Blockierung des N-Terminus durch die Anwesenheit von Harnstoff ausgelöst worden sein. Harnstoff steht im Gleichgewicht mit Ammonium(iso)Cyanat. Dieses kann mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus und der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten reagieren. Auch durch den Einsatz anderer Rehydratisierungslösungen (native Rehydratisierungslösung, Rehydratisierungslösung II), wurde keine Auftrennung des nPru p 3 in mehrere sequenzierbare Spots erreicht.



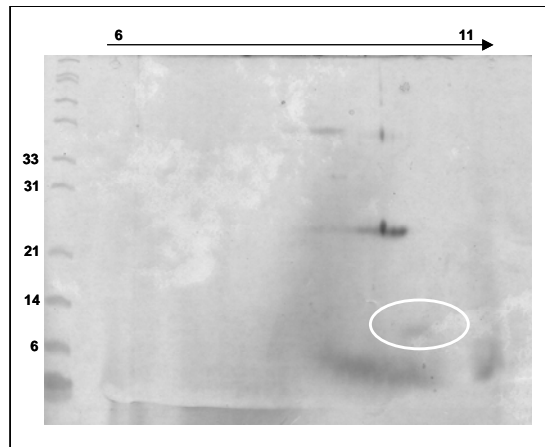
**Abb: 5.31: Zweidimensionale Elektrophorese von nPru p 3 über einen pI von 6-11 in einem 10-20%igen Tris-Glycin Gradientengel.**

nPru p 3 (7  $\mu$ g) wurde in der ersten Dimension über Cup loading auf den rehydratisierten IEF Streifen 6-11 aufgegeben, wobei der Streifen mit TBP-haltiger Rehydratisierungslösung rehydratisiert wurde. Natürliches Pru p 3 wurde ebenfalls in TBP-haltiger Rehydratisierungslösung aufgenommen. Das Protein wurde nach Beladen mit SDS in einem 10-20%igen Laemmli Gradientengel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Molekulargewichtsstandard: M12.

### 5.3.4.3 2D GE mit Lyc e 3

Zusätzlich zu nPru p 3 wurde partiell gereinigtes nLyc e 3 nach dem ersten chromatographischen Reinigungsschritt (Kap. 4.2.2.2, Abb. 5.5.) zweidimensional aufgetrennt. Die erste 2D GE erfolgte durch aktive Rehydratisierung des IEF Streifens mit 10  $\mu$ g partiell gereinigtem nLyc e 3. Nach der ersten Dimension wurde der IEF Streifen equilibriert, auf einem 15%igen Maxi Tris-Glycin Gel nach Laemmli (Kap. 4.2.4.1.1) mit Agarose fixiert und nach Molekulargewicht aufgetrennt (analog zu nPru p 3; Abb 5.30).

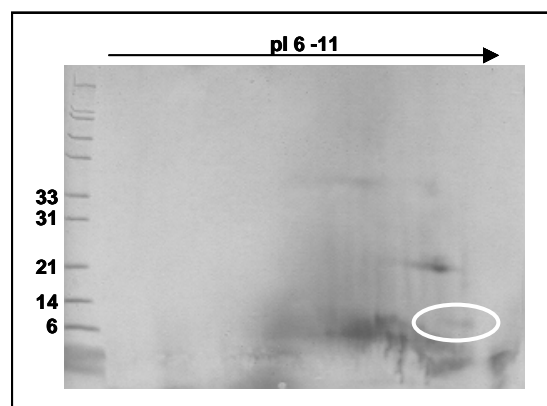




**Abb: 5.32: Zweidimensionale Elektrophorese von partiell gereinigtem nLyc e 3 über einen pI von 6-11 und ein 15%iges Tris-Glycin Gel nach Laemmli.**

Partiell gereinigtes nLyc e 3 (10 µg) wurde in der ersten Dimension während der Rehydratisierung auf den IEF Streifen 6-11 aufgegeben. Nach Reduktion und Alkylierung wurde das Protein in einem großen 15%igen Laemmli Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Molekulargewichtsstandard: M12.

Abb. 5.32 zeigt, dass nach dieser Methode nur ein unklarer Spot im niedermolekularen Bereich ausgemacht werden konnte. Da bei den Vorarbeiten mit nPru p 3 ausschließlich nach Reduktion des Proteins mit TBP, Cup loading, Auftrennung der Probe über einen pI von 6-11 und eine zweite Dimension mit BioRad Fertiggelen mehrere Spots klar erkennbar waren (Abb. 5.31), wurde diese Methode auch mit partiell gereinigtem nLyc e 3 durchgeführt und das Ergebnis in Abb. 5.33 dargestellt.



**Abb: 5.33: Zweidimensionale Elektrophorese von partiell gereinigtem Lyc e 3 über einen pI von 6-11 in einem 10-20%igen Tris-Glycin Gradientengel.**

Partiell gereinigtes nLyc e 3 (10 µg) wurde in der ersten Dimension über Cup loading auf den rehydratisierten IEF Streifen 6-11 aufgegeben, wobei der Streifen mit TBP-haltiger Rehydratisierungslösung rehydratisiert wurde. Lyc e 3 wurde ebenfalls in TBP-haltiger Rehydratisierungslösung aufgenommen. Das Protein wurde nach Beladen mit SDS in einem 10-20%igen Laemmli Gradientengel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Molekulargewichtsstandard: M12.

Natürliches Pru p 3 und partiell gereinigtes Lyc e 3 konnten durch die 2D GE nicht in mehreren scharfen Spots zur Identifikation von Isoformen aufgetrennt werden. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue, da diese Färbung nicht so starke Unterschiede in der Proteinfärbung aufweist, wie eine Silberfärbung. Daher können ungefähre Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinmenge pro Spot im Gel gezogen werden. Eine Silberfärbung von nLTPs war nach einer Aufreinigung über MonoS und Superdex 30 ebenso wie eine Sypro Ruby Färbung nicht möglich und wurde deswegen bei der 2D GE von gereinigten Proteinen nicht angewandt.

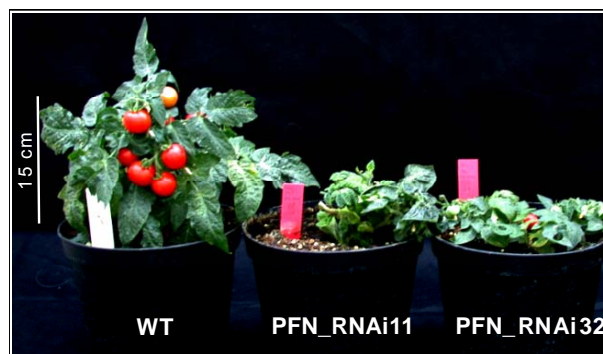


## 5.4 Analyse der gentechnisch veränderten Pflanzen

Auf der Basis der Vorarbeiten zur Charakterisierung der Tomatenallergene wurden Lyc e 1 und Lyc e 3 als Modellallergene für die RNAi vermittelte Hemmung der Genexpression ausgewählt. Die gentechnisch veränderten Pflanzen wurden in der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Prof. Dr. U. Sonnewald von L. LeQuynh an der Friedrich-Wilhelm-Universität in Erlangen hergestellt. Das „gene silencing“ erfolgte bei Lyc e 1 zum einen organspezifisch und zum anderen konstitutiv. Da sich auf Grund von Vorarbeiten das konstitutive „gene silencing“ als die erfolgreichere Variante herausstellte, soll im Folgenden nur auf diese eingegangen werden. Das „gene silencing“ von Lyc e 3 erfolgte auf Grund der Vorarbeiten mit Lyc e 1 ausschließlich konstitutiv.

### 5.4.1 Analyse der Lyc e 1 reduzierten Pflanzen

Das Lyc e 1 „gene silencing“ erfolgte wie in Kap. 4.3.2.1 beschrieben. Die gentechnisch veränderten Linien (PFN\_RNAi Linien) wiesen erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Phänotypes im Vergleich mit dem WT auf. Wachstum und Fruchtentwicklung waren stark verlangsamt, außerdem erreichten die RNAi Pflanzen nie dieselbe Wuchshöhe wie der WT (Abb. 5.35). Die Unterdrückung der Expression von Lyc e 1 wirkte sich also negativ auf die Entwicklung der Pflanzen aus.

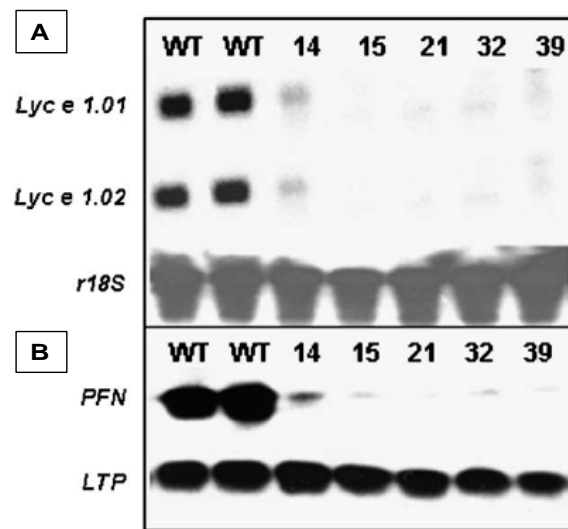


**Abb. 5.35:** Die PFN RNAi Pflanzen zeigten ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wild Typ. Vergleich des Wachstums von gleichaltrigen Wild Typ (WT) und gentechnisch veränderten Pflanzen (PFN\_RNAi 11 und PFN\_RNAi 32). PFN\_RNAi 11: Linie 11, PFN\_RNAi 32: Linie 32.

#### 5.4.1.1 *In vitro* Analysen

Die Lyc e 1 supprimierten Früchte wurden von L. LeQuynh zur Analyse der IgE- und IgG-Reaktivität bereitgestellt. Alle Früchte wurden vor dem Versand im Northern Blot auf mRNA Kopien des Zielproteins untersucht. Ausschließlich Früchte von Pflanzen, bei denen im Northern Blot keine Lyc e 1 mRNA mehr detektiert wurden, wurden für die weitere Analyse ausgewählt. In Abbildung 5.36.A ist ein Northern Blot mit Früchten von WT und gentechnisch veränderten Pflanzen dargestellt. Für Lyc e 1 sind zwei unterschiedliche Isoformen bekannt, das „silencing“ wurde jedoch nur mit der Lyc e 1.02 Isoform durchgeführt (Kap. 4.3.2.1). Deshalb wurde im Northern Blot untersucht, ob durch das „silencing“ der Lyc e 1.02 Isoform auch die Bildung von mRNA für die zweite Isoform gehemmt wurde. Bei vier (Linie 15, 21, 32, 39) der fünf gentechnisch veränderten Pflanzen war keine Lyc e 1.02 und Lyc e 1.01 mRNA mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten bei den WT Pflanzen Lyc e 1.02

und Lyc e 1.01 mRNA nachgewiesen werden. In Abbildung 5.36.B ist ein Western Blot (Kap. 4.2.6) mit Proteinextrakten von Früchten des Wild Typs und Lyc e 1 RNAi Pflanzen dargestellt. Die Detektion erfolgte mit dem Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin Antiserum. Auch auf Proteinebene wurde kein Lyc e 1 bei den Linien 15, 21, 32, 39 detektiert. Das „silencing“ erfolgte also für beide Isoformen auf mRNA Ebene und auf Proteinebene sehr effizient. Die Detektion des r18S Gens erfolgte als Kontrolle, dass für alle Linien dieselben Mengen mRNA für den Northern Blot verwendet wurde. Dieselbe Funktion hatte die Detektion des LTP im Western Blot.

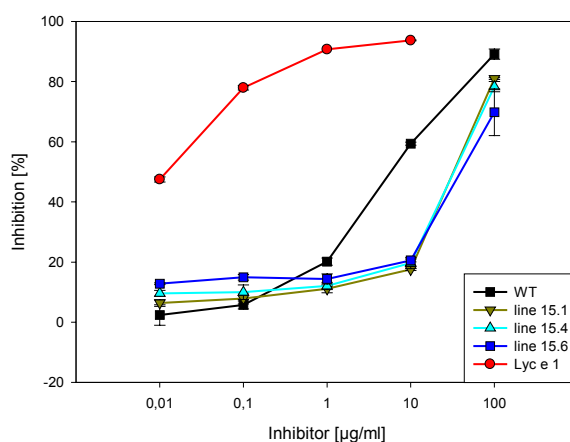


**Abb. 5.36: Das „gene silencing“ von Lyc e 1 erfolgte auf mRNA und Proteinebene sehr effektiv.**

A: Northern Blot Analyse der transgenen Pflanzen (14-39) und des Wild Typs (WT) als Kontrolle. 20 µg gesamt RNA wurden pro Spur aufgetrennt und mit radiomarkierter Lyc e 1.01, Lyc e 1.02 und r18S (Kontrolle) cDNA hybridisiert.

B: Western Blot Analyse der Tomatenfruchtextrakte. Die Detektion erfolgte mit dem Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin Serum und mit dem Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Serum als Kontrolle.

Durch eine dosisabhängige ELISA Inhibition (Kap. 4.2.7.2) mit rLyc e 1.02 auf der Festphase und den Tomatenfruchtextrakten (WT und RNAi) als Inhibitoren wurde das Ausmaß des „gene silencing“ in den Früchten verifiziert (Abb. 5.37). Nach einer Präinkubation des Patientenserums (Verdünnung 1:10) mit einer Maximaldosis an rLyc e 1.02 (10 µg/ml) und Microtom Wild Typ Extrakt (100 µg/ml) wurde eine nahezu 100%ige Inhibition der IgE-Bindung an rLyc e 1.02 erreicht. Auch durch Präinkubation des Patientenserums mit den RNAi Linien 15.1, 15.4 und 15.6 wurde mit der Maximaldosis nahezu eine 100%ige Inhibition erreicht. Jedoch besteht zwischen den Kurven der RNAi Pflanzen und des Wild Typs eine Verschiebung. Halbmaximale Inhibitionswerte (50% Inhibition) wurden mit dem Extrakt von WT Früchten mit ca. 10 µg/ml erreicht, mit Extrakt von den RNAi Pflanzen benötigte man etwa eine 10-fach höhere Konzentration, um dieselbe Inhibition zu erreichen. Das heißt, die Extrakte aus Früchten der RNAi Pflanzen enthielten um etwa ein 10-faches weniger Lyc e 1 (LeQuynh et al., 2006b).



**Abb. 5.37: Dosisabhängige ELISA Inhibition mit rLyc e 1 auf der Festphase und WT und RNAi Linien als Inhibitoren.** Dosisabhängige ELISA Inhibition mit 50 ng/Kavität rLyc e 1 auf der Festphase mit einem profilinreaktiven Tomatenallergikerserum (PEI 131), Verdünnung 1:10. Die dosisabhängige Eigeninhibition mit rLyc e 1 erfolgte als Positivkontrolle. Die Extrakte von WT und RNAi Früchten wurden auf eine Proteinkonzentration von 100 µg/ml eingestellt und dann 1:10 verdünnt. Der Mittelwert aus Doppelbestimmungen ist hier gezeigt.

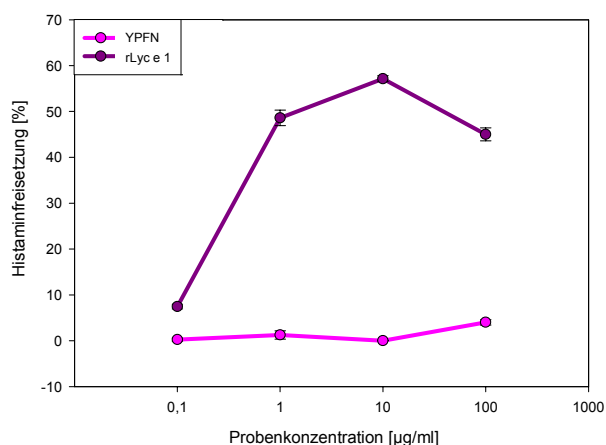
#### 5.4.1.2 *In vivo* Tests

Mit Hilfe des SPT (Prick-zu-Prick, Kap. 4.2.14) wurde die Reduktion von Lyc e 1 *in vivo* mit drei Lyc e 1 positiven Tomatenallergikern durch PD Dr. V. Mahler (Abteilung Dermatologie, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) untersucht. Die Ergebnisse des Hauttests sind in Abb. 5.38 dargestellt. Die Reduktion der allergenen Potenz *in vivo* war abhängig von der Sensibilisierung des Patienten auf andere Tomatenallergene. Der Patient (Nr. 013), der ausschließlich auf Lyc e 1 sensibilisiert war, zeigte eine Reduktion des Quaddeldurchmessers von 60-100% im Vergleich zum WT. Bei den Patienten (Nr. 023 und 002), die zusätzlich auf andere Allergene sensibilisiert waren, reduzierte sich die Quaddelgröße zwischen 15-25% im Vergleich zum Wild Typ (LeQuynh et al., 2006b).

	013	023	002
Histamin			
Natriumchlorid			
Wild Typ			
PFN RNAi			
	Quaddeldurchmesser [mm]	Quaddeldurchmesser [mm]	Quaddeldurchmesser [mm]
Histamin	8,5	8,5	7
Natriumchlorid	0	0	0
Wild Typ	9,5	6	6
PFN RNAi	3,5	4,5	5

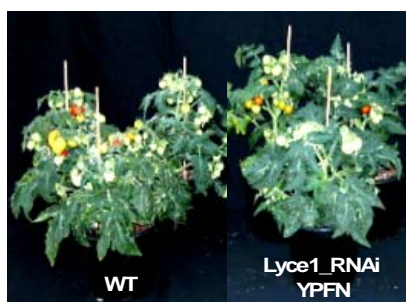
**Abb. 5.38: Die profilinreduzierten Tomatenfrüchte zeigen eine geringere allergene Potenz im Hauttest.** Ergebnisse des Hauttests bei Lyc e 1 sensibilisierten Tomatenallergikern (013, 023, 002) mit untransformierten (Wild Typ) und transformierten (PFN-RNAi) Pflanzen.





**Abb. 5.40: Dosisabhängiger Histamin Freisetzungstest mit passiv sensibilisierten humanen Basophilen.** Basophile Granulozyten eines Nichtallergikers wurden passiv mit IgE eines Tomatenallergikers sensibilisiert (PEI 131) und mit unterschiedlichen Dosen rLyc e 1 und rYPFN stimuliert. Die Quantifizierung des freigesetzten Histamins erfolgte im ELISA.

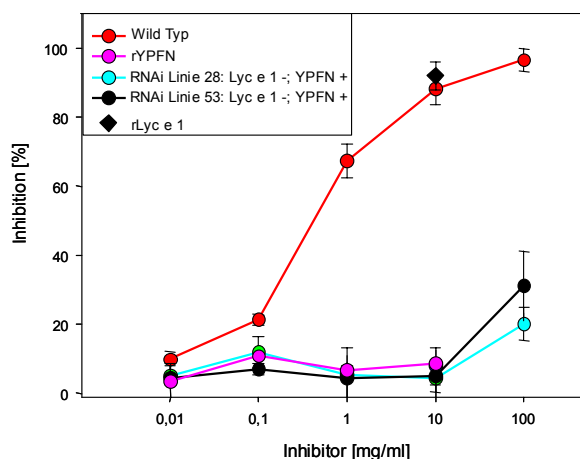
Auf Grund dieser Daten wurde YPFN für die Substitution von Lyc e 1 in Lyc e 1 RNAi Pflanzen ausgewählt. Innerhalb eines Ansatzes wurde Lyc e 1 in den Pflanzen ausgeschaltet und gleichzeitig YPFN exprimiert. Phänotypisch sind keine Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten Pflanzen und dem WT zu erkennen.



**Abb. 5.41: Die Lyc e 1 RNAi, mit Hefeprofilin rekonstituierten Pflanzen zeigten phänotypisch keinen Unterschied zu dem WT.**

Vergleich des Wachstums von gleichaltrigen Wild Typ (WT) und gentechnisch veränderten Pflanzen (Lyc e 1\_RNAi YPFN).

Zu diesem Zeitpunkt lagen nur initiale Daten in Form eines Northern Blots und einer ELISA Inhibition sowie eines Histamin Freisetzungstestes mit dem Serum PEI 131 und zwei Linien (RNAi Linie 28 und 53) vor. Im Northern Blot (Kap. 4.3.5) konnte keine mRNA für Lyc e 1 mehr detektiert werden. Die Ergebnisse der ELISA Inhibition (Kap. 4.2.7.2) mit rLyc e 1.02 auf der Festphase sind in Abbildung 5.41 dargestellt. Durch Präinkubation des Patientenserums mit Extrakten der Linien 28 und 53 konnte die IgE-Bindung an rLyc e 1.02 nur zu ca. 20 bzw. 30% mit der höchsten Proteinkonzentration gehemmt werden. Es scheint, dass die Lyc e 1.02 Konzentration in dem Extrakt der RNAi Pflanzen im Vergleich zum Wild Typ um ein 1000faches reduziert ist. Eine Inhibition der IgE-Bindung durch Präinkubation von PEI 131 mit rekombinantem Hefeprofilin war nicht möglich. Dies zeigt, dass Lyc e 1.02 spezifisches IgE dieses Serums nicht mit rYPFN reagiert.

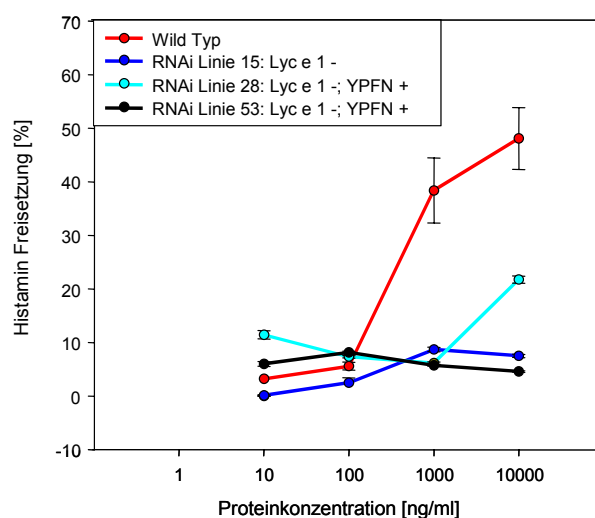


**Abb. 5.42:** Die Lyc e 1.02 spezifische IgE-Bindungskapazität der gentechnisch veränderten Pflanzen ist um ein 1000faches geringer als die des Wild Typs.

ELISA Inhibition mit 50 ng/Kavität rLyc e 1.02 auf der Festphase. Die Inhibition der IgE-Bindung erfolgte durch Präinkubation des Patientenserums PEI 131 mit Extrakten aus Früchten von Wild Typ und rekonstituierten Linien 28 und 53 sowie rYPFN (Negativkontrolle) und rLyc e 1.02 (Positivkontrolle).

Bei einem Vergleich der ELISA Inhibition von Extrakten der Lyc e 1.02 RNAi (Kap. 4.2.7.2) und der Lyc e 1.02 RNAi-YPFN rekonstituierten Früchte war auffällig, dass die Lyc e 1.02 RNAi Pflanzen eine 10fach geringere Hemmung der IgE-Bindung im Vergleich mit dem Wild Typ induzierten (Abb. 5.37). Die Lyc e 1.02 RNAi-YPFN rekonstituierten Pflanzen wiesen jedoch eine um das 1000fach verringerte Hemmung der IgE-Bindung auf. Die Ursache hierfür ist bisher ungeklärt.

Ein Histamin Freisetzungstest (Kap. 4.2.10) wurde mit Extrakten von YPFN rekonstituierten Pflanzen und WT durchgeführt. Das Serum PEI 131 wurde genutzt, um basophile Granulozyten passiv zu sensibilisieren. Hier induzierten die mit YPFN rekonstituierten Pflanzen keine bzw. eine geringere Freisetzung von Histamin im Vergleich zum WT (Abb. 5.42). Um eine vorher definierte Menge an Histamin freizusetzen (ca. 20%), wird von Linie 28 ungefähr die 150fache Menge an Protein benötigt. Mit Linien 15 und 53 konnte keine dosisabhängige Freisetzung von Histamin induziert werden.



**Abb. 5.43:** Die Lyc e 1.02 RNAi-YPFN rekonstituierten Pflanzen zeigen im basophilen Histamin Freisetzungstest eine stark verringerte allergene Potenz im Vergleich zum Wild Typ.

Basophile Granulozyten eines Nichtallergikers wurden passiv mit IgE des Tomatenallergikers PEI 131sensibilisiert und mit unterschiedlichen Dosen Extrakt (Wild Typ-, Lyc e 1.02 RNAi und Lyc e 1.02 RNAi-YPFN rekonstituiert) stimuliert. Die Quantifizierung der Histamin Freisetzung erfolgte im ELISA.

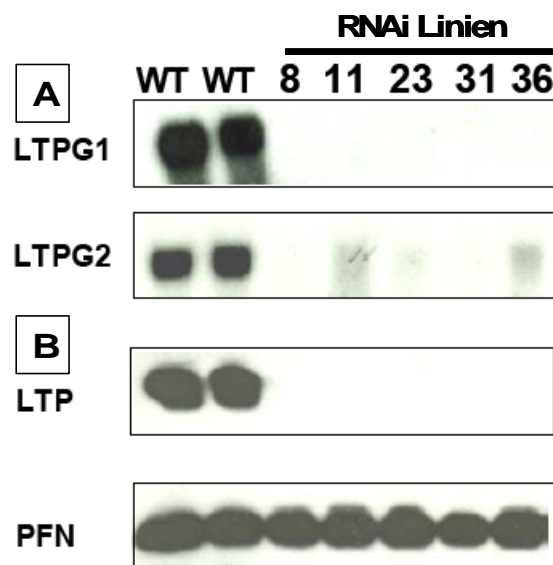


## 5.4.2 Analyse der Lyc e 3 reduzierten Pflanzen

Die Lyc e 3 reduzierten (Lyc e 3 RNAi) Pflanzen wurden in Erlangen von L. LeQuynh analog zu den Lyc e 1 reduzierten Pflanzen (Kap. 4.3.2.2) hergestellt. Die Reduktion der Lyc e 3 Transkription wurde im Northern Blot (Kap. 4.3.5) überprüft und die Früchte, bei denen keine mRNA für Lyc e 3 mehr detektiert werden konnten, wurden im Paul-Ehrlich-Institut weiter untersucht.

### 5.4.2.1 *In vitro* Analysen

Bei der Analyse der LTP defizienten Pflanzen wurde die erste Generation der gentechnisch veränderten Pflanzen untersucht, sowie bei einer ausgewählten Linie die dazugehörige Tochtergeneration. In Abbildung 5.43.A wird ein Northern Blot (Kap. 4.3.5) mit Lyc e 3 RNAi Pflanzen gezeigt, bereitgestellt durch L. LeQuynh. Alle in 5.43 dargestellten Linien wurden mit einem RNAi-Konstrukt hergestellt, welches die Sequenz der Lyc e 3.1 Isoform beinhaltet. Möglicherweise ist die Hemmung der Transkription für die Isoform Lyc e 3.1 (LTPG1) effizienter, da bei der Hybridisierung mit <sup>32</sup>P markierter LTPG2 cDNA eine geringe Menge an Lyc e 3.2 spezifischer mRNA festgestellt werden konnte. Im Immunoblot (Abb. 5.43.B) konnte kein Lyc e 3 durch IgG-Bindung des Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Antiserums detektiert werden. Ein Immunoblot mit dem Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin wurde als Positivkontrolle und Ladungskontrolle durchgeführt. Mit dem RNAi-Konstrukt, welches die Sequenz für Lyc e 3.2 enthielt, konnte die Expression beider Isoformen ebenfalls gehemmt werden (Daten nicht gezeigt).



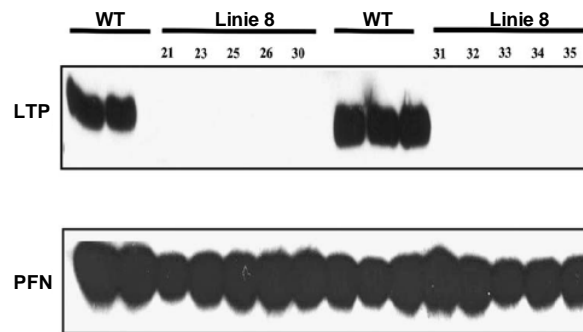
**Abb. 5.44: Northern Blot [A] und Immunoblot [B] von Lyc e 3 RNAi Linien.**

A: Gesamt RNA wurde von zwei Wild Typ (WT) und fünf unabhängigen gentechnisch veränderten Linien (Lyc e 3.1-RNAi Linien 8, 11, 23, 31, 36) isoliert und je 20 µg/Bande aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit <sup>32</sup>P markierter cDNA von Lyc e 3.1 (LTPG1) und Lyc e 3.2 (LTPG2).

B: Im Immunoblot wurde mit Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Antiserum die Bindung von IgG an Lyc e 3 in Extrakt von WT und RNAi Linien untersucht. Als Positivkontrolle wurde das Kaninchen-anti-Traubenkraut-Profilin Antiserum verwendet.

Linie 8 wurde aus den unter Abb. 5.43 dargestellten Linien für die Herstellung der Tochtergeneration ausgewählt. Der in Abb 5.44 dargestellte Immunoblot zeigt 10 unabhängige Tochterlinien (21, 23, 25,

26, 30, 31, 32, 33, 34, 35), die aus der ersten Generation gezüchtet wurden. Bei keiner Linie der Tochtergeneration konnte Lyc e 3 im Immunoblot nachgewiesen werden.

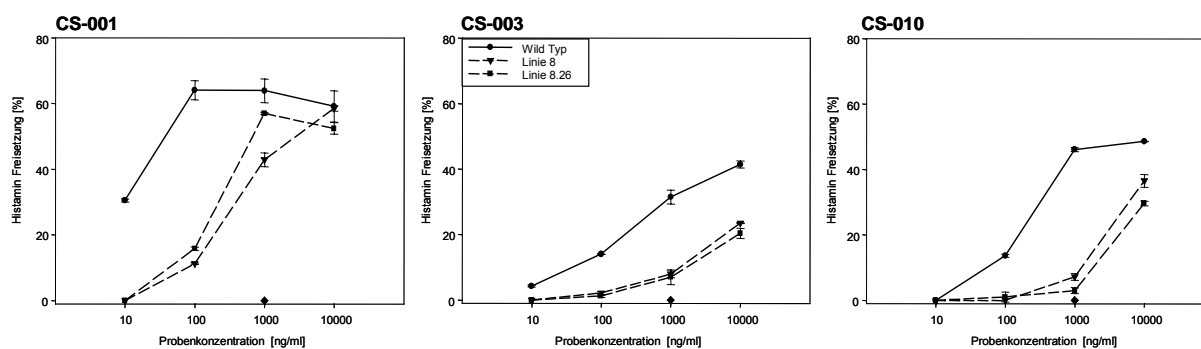


**Abb. 5.45: Auch bei den Tochtergenerationen der Linie 8 ist kein LTP im Immunoblot nachweisbar.**

Im Immunoblot wurde mit Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Antiserum die Bindung von IgG an Lyc e 3 in Extrakt von WT und den Tochtergenerationen der RNAi Linie 8 untersucht. Als Positivkontrolle wurde das Kaninchen-anti-Traubenkraut-Proflin Antiserum verwendet.

Für Linie 8 und eine dazugehörige Tochterlinie 8.26 wurde die allergene Potenz im Histamin Freisetzungstest bestimmt (Kap. 4.2.10). Die Ergebnisse des Histaminfreisetzungstestes sind in Abb. 5.45 für die Seren CS-001, CS-003 und CS-010 dargestellt. Die Extrakte der transgenen Linien und des WT induzieren eine Histaminfreisetzung bei allen drei Seren. Bei Serum CS-001 induzierte die Stimulation mit allen drei Linien dieselbe maximale Histaminfreisetzung von 60%, jedoch wurde diese mit WT Extrakt bereits nach Stimulation mit ca. 100 ng/ml erreicht. Im Gegensatz hierzu wurde die maximale Histaminfreisetzung erst nach Stimulation durch RNAi Linien mit einer um das 10fach höheren Proteinmenge erreicht. Bei den Seren CS-003 und CS-010 wurde nach Stimulation mit der maximalen Proteinmenge an WT Extrakt ungefähr 40% bzw. 50% Histamin freigesetzt. Die Reaktion auf die RNAi Linien lag ungefähr bei 20% Histaminfreisetzung für CS-003 und bei 40% für CS-010 nach Stimulation mit der höchsten Proteinkonzentration. Der größte Unterschied bei dem Vergleich WT und RNAi Linien lag in der Kurvenverschiebung. Von den RNAi Linien wurde bei allen drei Seren 10 bis 100fach mehr Proteinextrakt benötigt, um dieselbe Menge an Histaminfreisetzung zu induzieren wie der WT.

Es bestanden keine Unterschiede in den Kurvenverläufen zwischen der ersten und der zweiten Generation. Bei allen drei Seren sind die Kurven nahezu identisch, was auf eine stabile Unterdrückung der Lyc e 3 Expression in der Tochtergeneration hinweist. Der Histamin Freisetzungstest wurde zusätzlich für zwei andere Seren durchgeführt (CS-005 und CS-011), welche tendenziell dieselben Ergebnisse aufwiesen. Jedoch war die spezifische IgE-Konzentration und somit auch die Histamin Freisetzung bei diesen beiden Seren zu gering, um Aussagen zu treffen. Die spezifische IgE-Konzentration auf Tomatenextrakt, gemessen im CAP, betrug bei den Seren CS-001, CS-003 und CS-010 51,4 kU/L, 15,8 kU/L und 9,1 kU/L. Bei den Seren CS-005 und CS-011 betrug diese nur 1,6 kU/L und 5,0 kU/L.

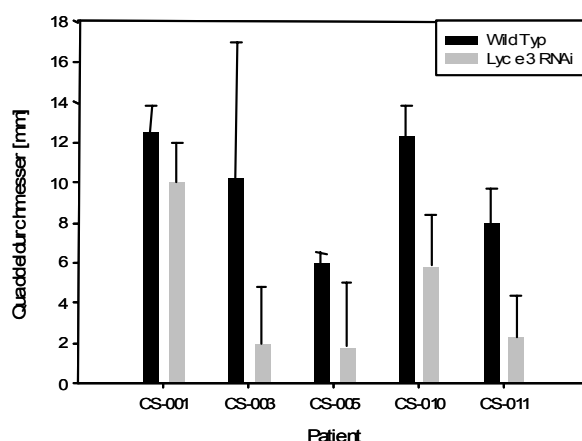


**Abb. 5.46: Histamin Freisetzungstest mit 3 Seren und WT sowie RNAi Extrakt einer ersten und zweiten Generation.** Der Histamin Freisetzungstest zeigt eine reduzierte allergene Potenz der transgenen Tomatenlinien *in vitro*. Passiv sensibilisierte Basophile wurden mit steigenden Dosen an Proteinextrakt von WT und RNAi Linien (T0 und T1 Generation) stimuliert. BSA wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Der Test wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

#### 5.4.2.2 *In vivo* Tests

Zur Untersuchung der allergenen Potenz *in vivo* wurden durch Dr. E. Enrique (Castellón, Spanien) Hauttests mit 5 Tomatenallergikern mit nachgewiesener Lyc e 3 Sensibilisierung durchgeführt (Kap. 4.2.14). Die durchschnittliche Hautreaktivität (Durchmesser der Quaddeln) nach „Prick-zu-Prick“ mit WT Früchten lag zwischen 6-12,5 mm Durchmesser (Abb. 5.46). Im Gegensatz dazu lag die durchschnittliche Hautreaktivität nach Prick zu Prick mit den transgenen Linien bei 2-10 mm Durchmesser. Bei drei der fünf Patienten (CS-003, CS-005, CS-011) lag die Hautreaktion nach Test der transgenen Linien unter 3 mm und konnte daher als negativ eingestuft werden. Die Restreaktivität der RNAi Pflanzen betrug ca. 30 % im Vergleich zum WT (CS-003: 19%, CS-005: 30%, CS-011: 29% verglichen mit dem WT). Bei den anderen beiden Patienten lag die Restreaktivität bei 80% (CS-001) und 47% (CS-010). Histamindihydrochlorid wurde als Positivkontrolle verwendet und induzierte bei allen Patienten die Bildung von Quaddeln mit einem Durchmesser von 7-10 mm.

Die Unterschiede der Reaktivität von WT und RNAi Linien waren statistisch signifikant ( $P = 0.0053$ ) (Kap. 4.2.14).



**Abb. 5.47: Im SPT zeigen die RNAi Linien bei allen Patienten eine geringere allergene Potenz als der Wild Typ.** Der Prick-zu-Prick Test wurde bei 5 Tomatenallergikern durchgeführt, die auf Lyc e 3 sensibilisiert waren. Es wurde eine deutliche Reduktion der Hautreaktivität nach Prick-zu-Prick mit den Lyc e 3 RNAi Linien im Vergleich zum Wild Typ festgestellt. Der Test wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

## 6. Diskussion

### 6.1 Das Sensibilisierungsmuster bei der Tomatenallergie

#### 6.1.1 Prävalenz der IgE-Bindung an die Tomatenallergene

Die Prävalenz der IgE-Bindung an das natürliche Tomaten LTP wurde mittels eines Immunoblots mit Tomatenschalenextrakt bestimmt. Von 57 getesteten Seren besaßen 14 (ca. 24%) spezifisches IgE gegen das Zielprotein. Da die Prävalenz der IgE-Bindung größer 5% und die Anzahl der positiven Patientenserum > 5 war, konnte das Tomaten LTP als Allergen benannt werden. Mit einer Prävalenz der IgE-Bindung von 24% wurde es als Minorallergen mit dem Namen Lyc e 3 in die IUIS Datenbank aufgenommen. Die IgE-Bindung an das natürliche Lyc e 3 in Tomatenschalenextrakt wurde mit Hilfe eines Immunoblotts mit natürlich gereinigtem Lyc e 3 auf der Festphase bestätigt. Vorhandene Seren (11/14), die im Immunoblot mit Tomatenschalenextrakt eine IgE-Bindung an das nLyc e 3 zeigten, reagierten ebenfalls im Immunoblot mit gereinigtem nLyc e 3 positiv (11/11). Diese Seren wurden alle je nach Verfügbarkeit (11/14) im ELISA auf gereinigtes nLyc e 3 getestet. Hier zeigte ein Serum (EBO 7957; Nr. 46) keine IgE-Bindung. Die Reaktion dieses Serums im Immunoblot mit gereinigtem nLyc e 3 war sehr schwach. Dies lässt darauf schließen, dass die Sensitivität des Immunoblot unter den gewählten Bedingungen größer ist, als die des ELISA.

Zur Zeit (15.11.2006) sind 16 LTPs als Nahrungsmittelallergene in der IUIS Datenbank registriert. Dreizehn der bekannten LTPs wurden als Hauptallergene beschrieben, nur Cit s 3 aus Orange (*Citrus sinensis*) (Ahrazem et al., 2005) und Fra a 3 aus Erdbeere (*Fragaria ananassa*) (Zuidmeer et al., 2006) sind neben dem Lyc e 3 (Le et al., 2006a) als Minorallergene beschrieben. Die Sequenzidentität zwischen den LTPs, die im mediterranen Bereich Minorallergene sind, ist gering. Daher lassen sich auf Grund der Sequenz keine Rückschlüsse auf das LTP als Major- oder Minorallergen ziehen.

Die Häufigkeit der IgE-Bindung an rLyc e 1, gemessen im Immunoblot, lag innerhalb der untersuchten Patientengruppe bei 36%. Auch bei anderen Untersuchungen wurde Lyc e 1 als Minorallergen identifiziert. Willerroider et al. (2003) untersuchten eine Gruppe von Paprikaallergikern, unter der sich 23 Tomatenallergiker befanden. Im Immunoblot mit Tomatenextrakt oder rLyc e 1 auf der Festphase zeigten 48% dieser Patienten eine Sensibilisierung auf nLyc e 1 bzw. rLyc e 1. Westphal et al. (2004) stellten in einer Gruppe von deutschen und spanischen Tomatenallergikern im Immunoblot eine IgE-Sensibilisierung auf rLyc e 1 von 22% fest. Die Häufigkeit der Profilinsensibilisierung bei anderen Nahrungsmittelallergien liegt bei 8-25% für Haselnuss- (Hirschwehr et al., 1992; Pastorello et al., 2002), 16% für Kirsch- (Scheurer et al., 2001), 17-30% für Sellerie- (Jankiewicz et al., 1996; Lüttkopf et al., 2000; Ballmer-Weber et al., 2002), 20% für Karotten- (Ballmer-Weber et al., 2001), 34% für Paprika- (Willerroider et al., 2003), 42% für Ananas- und 44% für Bananen- (Reindl et al., 2002) sowie 57% für Pfirsich- (Pastorello et al., 1994), 70% für Lychee- (Vieths et al., 2002), 95% für Orangen- (Crespo et al., 2006) und 100% für Melonen-Allergiker (Lopez-Torrejon et al., 2005). In den meisten Fällen ist das Nahrungsmittelprofilin ein Minorallergen.

Das Lyc e 2 der Tomate ist innerhalb dieser Patientengruppe ein Majorallergen, die Häufigkeit der IgE-Sensibilisierung betrug 56%. In der Studie von Westphal et al. (2003) zeigten nur 17% der Seren

von Tomatenallergikern eine IgE-Bindung an nLyc e 2. Dieser Unterschied besteht wahrscheinlich auf Grund der Rekrutierung der Patienten in unterschiedlichen Zentren.

Innerhalb der vorliegenden Patientengruppe war das häufigste Symptom nach Verzehr von Tomaten das Orale Allergie Syndrom. Nur drei Patienten reagierten mit einem anaphylaktischen Schock. Keiner der drei Patienten mit anaphylaktischem Schock war auf Lyc e 3 sensibilisiert. Eine Sensibilisierung auf das Tomaten LTP ging also nicht mit einer schweren Symptomatik einher. Im Rahmen von anderen Studien konnte die Korrelation einer Sensibilisierung auf LTPs mit einer schweren Symptomatik festgestellt werden (Ballmer-Weber et al., 2002; San Miguel-Moncín et al., 2003; Pastorello et al., 2004; Reuter et al., 2006). Ballmer-Weber et al., (2002) stellten Unterschiede in der Schwere der Symptomatik bei Pru av 1 bzw. Pru av 3 monosensibilisierten Kirschallergikern fest. Innerhalb der Gruppe der Pru av 1 bzw. Pru av 3 monosensibilisierten Patienten litten 55% bzw. 25% ausschließlich an Symptomen des OAS. Im Vergleich hierzu litten in der Gruppe der Pru av 3 monosensibilisierten Patienten 66% der Patienten unter Urtikaria und Angioödem nach Verzehr von Kirschen. Diese Symptome konnten bei Pru av 1 Monosensibilisierten nicht festgestellt werden. Auch Reuter et al. (2006) stellten eine Korrelation der Sensibilisierung auf Pru av 3 mit einer schweren systemischen Symptomatik fest. Innerhalb einer Gruppe von Salatallergikern reagierten 50% (7/14) der Patienten mit einem anaphylaktischen Schock auf den Verzehr von Salat. Fünf dieser 7 Patienten zeigten eine Sensibilisierung auf das Salat LTP Lac s 1 (San Miguel-Moncín et al., 2003). Auch im Rahmen der Studie von Pastorello et al. (2004) litten die Walnuss LTP positiven Patienten häufiger unter einer schweren Symptomatik, im Vergleich zu den Patienten, die keine Sensibilisierung auf das LTP zeigten.

### **6.1.2 Beteiligung der anderen IgE-bindenden Proteine an der Tomatenallergie**

Ein Anteil der untersuchten deutschen Tomatenallergiker reagierte nicht auf die bereits beschriebenen Allergene Lyc e 1, Lyc e 2 und Lyc e 3. Da eine anamnestisch erfasste Symptomatik sowie spezifisches IgE gegen Tomate, gemessen im CAP vorliegt (Tab. 3.1), wird davon ausgegangen, dass bei diesen Seren andere Tomatenallergene Auslöser der Symptomatik sind. Viele Patientenserum zeigen im Immunoblot mit Tomatenschalenextrakt auf der Festphase multiple IgE-Bindungen im Bereich von 30-60 kDa (nicht gezeigt). Bereits beschriebene IgE-bindende Proteine in der entsprechenden Größe sind: die Chitinase (30-45 kDa), ein Sol t 1 und Hev b 7 homologes Protein (41 kDa), die Peroxidase (45 kDa) sowie die Polygalakturonase (46 kDa) (Kap. 1.2.3.4). Ob diese oder andere Proteine für die IgE-Bindung und die Symptomatik bei diesen Patienten verantwortlich sind, bleibt zu klären.

### **6.1.3 Problematik bei der Diagnose der Tomatenallergie**

Bei Betrachtung der Tabelle 3.1 ist auffällig, dass 11 Tomatenallergiker mit Symptomen nach dem Verzehr von Tomaten reagierten (anamnestisch erfasst) und spezifisches IgE gegen Tomate besaßen, jedoch im Skin Prick Test negativ war (Patientennummer: 1, 2, 7, 11, 18, 21, 23, 28, 31, 55, 64). Dieser Unterschied könnte auf die Qualität der Testlösung für den SPT zurückzuführen sein.

Scheurer et al. (2004) untersuchten zwei unterschiedliche SPT Lösungen der Kirsche in Bezug auf ihren Gehalt an IgE- und IgG-reaktivem Pru av 1 und Pru av 3. Beide Lösungen unterschieden sowohl in ihrem Proteinpattern als auch in ihrem Gehalt an Pru av 3. Pru av 1 war in beiden Lösungen nicht detektierbar. Die Verwendung dieser Lösungen könnte also bei Pru av 1 positiven Kirschallergikern in falsch negativen Ergebnissen resultieren. Reagieren anamnestisch erfasste Tomatenallergiker nicht im SPT mit kommerzieller SPT Lösung, so könnte dies auf das Fehlen von den entsprechenden IgE-reaktiven Proteinen in der Lösung zurückzuführen sein. Die Ursache für das Fehlen von IgE-reaktiven Proteinen in der SPT-Lösung könnte zum einen die geringe Stabilität mancher Proteine sein. Diese Proteine wurden zwar extrahiert, sind jedoch in Anwesenheit des Enzyms Polyphenoloxidase sehr instabil (Scheurer et al., 2004). Eine andere Ursache könnte die Extraktionsmethode darstellen. Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Proteinpattern mit der Extraktionsmethode variieren kann (Kap. 5.3.1.1 und Kap. 5.3.4.1). Der SPT als Prick-zu-Prick Test mit Tomatenfrüchten ist eine Alternative. Dieser hat jedoch den Nachteil, dass er nicht standardisiert und somit oftmals nicht vergleichbar ist. Retrospektiv ist nicht mehr nachzuvollziehen, ob der SPT mit kommerzieller Lösung oder als Prick-zu-Prick erfolgte. Eine weitere Ursache für falsch positive anamnestische Daten könnte der hohe endogene Histamingehalt der Tomate sein. Laut einer Informationsbroschüre des Allergie-Zentrum der Charité beträgt der endogene Histamingehalt 2,2 mg/100 g Tomate. Bei histaminempfindlichen Personen kann es bei hoher Zufuhr von Histamin zu Beschwerden kommen. Wäre bei diesen Patienten eine Histaminüberempfindlichkeit die Ursache der Symptomatik nach dem Verzehr von Tomaten, dürfte jedoch im CAP kein tomatenspezifisches IgE festzustellen sein. Da ein positiver CAP jedoch bei der Patientengruppe ein Einschlusskriterium war, wird davon ausgegangen, dass es sich bei der betrachteten Patientengruppe um Typ I-Tomatenallergiker handelt.

#### **6.1.4 Vergleich des Sensibilisierungsmusters der Tomatenallergiker aus Nord- und Südeuropa**

Nach Einteilung der Patienten in eine deutsche und spanische Gruppe, ergaben sich sehr unterschiedliche Prävalenzen der IgE-Bindung an die drei bekannten Tomatenallergene. Es fällt auf, dass die Sensibilisierungsrate für alle drei Allergene innerhalb der spanischen Patientengruppe höher ist, als bei der deutschen Patientengruppe.

Für Lyc e 3 ergaben sich für die deutsche Patientengruppe Prävalenzen der IgE-Bindung von 4% gegenüber 40% für die spanischen Patienten. Die geringe Häufigkeit der Sensibilisierung auf LTPs in Mittel- und Nordeuropa ist bekannt (Ballmer-Weber, 2002). Innerhalb einer Gruppe von 108 deutschen und italienischen Kirschallergikern fanden Scheurer et al. (2001) bei der deutschen Gruppe ebenfalls nur eine Sensibilisierungsrate von 3% auf das LTP der Kirsche, Pru av 3. Die Häufigkeit der IgE-Bindung an Pru av 3 bei der italienischen Patientengruppe lag bei 100%. Im Skin Prick Test mit den rekombinanten Kirschallergenen rPru av 1, rPru av 3 und rPru av 4 lag die Häufigkeit der Sensibilisierung auf rPru av 3 innerhalb der Gruppe der spanischen Patienten bei 89% und bei den Patienten aus Mitteleuropa bei 4% (Ballmer-Weber et al., 2002). Eine Sensibilisierung auf LTPs wird häufig bei Patienten im mediterranen Raum festgestellt (Scheurer et al., 2001; Ballmer-Weber et al., 2002; Fernandez-Rivas et al., 2003; Pastorello et al., 2004; Reuter et al., 2006). Der Unterschied des

Sensibilisierungsmusters zwischen Zentral- und Südeuropa konnte in einer aktuellen Studie von Reuter et al. (2006) eindrucksvoll dargestellt werden. Eine Sensibilisierung auf rPru av 1 wurde bei 96% bzw. 5% der Patienten aus Zentral- bzw. Südeuropa festgestellt. Demgegenüber lag die Sensibilisierungsrate auf Pru av 3 bei den Patienten aus Zentral- bzw. Südeuropa bei 11% bzw. 91%. In Deutschland ist die Ursache einer Nahrungsmittelallergie häufig eine Birkenpollinose. Zwischen 50-93% der Birkenpollenallergiker leiden an einer Nahrungsmittelallergie (Wüthrich und Jäger, 2002). Das Birkenpollenallergen Bet v 1 ist am häufigsten für die Auslösung der Kreuzallergie verantwortlich. Meist entwickeln Birkenpollenallergiker eine Allergie auf Apfel (Vanek-Krebitz et al., 1995), Kirsche (Scheurer et al., 1997) und Haselnuss (Lüttkopf et al., 2002). Auch in der Tomate wurde ein Bet v 1 homologes Protein beschrieben (Sree Vidya et al., 1999). Ob dieses Protein bei den deutschen Tomatenallergikern eine Rolle spielt, müsste anhand weiterer Studien überprüft werden. Bei einigen Patientenseren wird eine IgE-Bindung an ein Protein im 17 kDa-Bereich beobachtet.

Bei einer Unterteilung der Gruppe der spanischen Patienten in eine Inlands- und eine Küstenregion beträgt die Häufigkeit der IgE-Bindung an Lyc e 3 für die Küstenregion 67% (10/15) und für das spanische Inland 18% (3/17). Die Prävalenzen der IgE-Bindung an rLyc e 1 betragen 29% bei der deutschen und 44% bei der spanischen Gruppe. Bei einer getrennten Untersuchung der spanischen Küste und des Inlandes, bestehen wiederum starke Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit der IgE-Bindung an rLyc e 1. Die Häufigkeit der IgE-Bindung an rLyc e 1 innerhalb der Gruppe von der spanischen Küste bzw. des Inlandes beträgt 13% (2/15) bzw. 68% (13/19). Bei der Untersuchung von nLyc e 2 bestehen die drastischsten Unterschiede: 35% Deutschland, 81% Spanien. Nach Trennung der spanischen Patientengruppe ergeben sich Werte von 25% (1/4) für die Küste und 94% (17/18) für das Inland. Des Weiteren ist auffällig, dass innerhalb der Gruppe der Seren aus dem spanischen Inland eine sehr hohe Prävalenz der IgE-Bindung an rLyc e 1 und nLyc e 2 besteht. In der Literatur sind beide Proteine als Minorallergene auch innerhalb der spanischen Bevölkerung beschrieben (Westphal et al., 2002 und 2003). Eine zusätzliche Allergie auf exotische Früchte, wie Melone oder Ananas ist in dieser Gruppe sehr häufig (8/11). Die Ursache der hohen Sensibilisierungsrate kann jedoch retrospektiv nicht mehr geklärt werden.

## 6.2 Die Bedeutung von Lyc e 3 als Tomatenallergen

### 6.2.1 Identifikation und Sequenzvergleich mit anderen LTPs

Die 9 kDa Bande im Tomatenschalenextrakt wurde durch N-terminale Sequenzierung als Lipid Transfer Protein identifiziert. Die Lokalisation des Tomaten LTP in der Schale ist typisch für ein LTP, alle bekannten Nahrungsmittel LTPs aus Pflanzen der *Rosaceen*-Familie sind vornehmlich in der Schale lokalisiert (Fernandez-Rivas et al., 1999). Die Sequenzidentität von Lyc e 3 zu den LTPs Pru av 3, Cor a 8 und Pru p 3, liegt bei 54%, 51% bzw. 50%. Trotz dieser relativ geringen Sequenzidentität mit den anderen LTPs besitzen sie alle eine nahezu identische Tertiärstruktur auf Grund eines konservierten Cysteinumusters ( $X_n-C-X_n-C-X_n-CC-X_n-C-X-C-X_n-C-X_n-C-X_n$ ).

### 6.2.2 Reinigung von nLyc e 3

Die Aufreinigung von nLyc e 3 erfolgte mittels zwei unterschiedlicher Strategien: präparative Gelelektrophorese und zweistufiger Chromatographie. Bei der Aufreinigung über die präparative Gelelektrophorese war es nicht möglich, Lyc e 3 von Lyc e 1 zu trennen, obwohl LTP ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 8 kDa und Lyc e 1 von ca. 14 kDa besitzt. Die Berechnung des Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes erfolgte in Vektor NTI, wobei jeweils eine ausgewählte Isoform als Berechnungsgrundlage (Lyc e 3.2: Gi1816534; Lyc e 1.02: AY061819) diente. Eine Änderung der Gelzusammensetzung von Tris-Glycin nach Laemmli in Tris-Tricin Gele nach Schägger und v. Jagow sowie eine Steigerung der Acrylamidkonzentration verbesserte das Trennergebnis nicht. Auch durch die Ausdehnung der Trennstrecke durch Verlängerung des Trenngeles konnte Lyc e 3 nicht von Lyc e 1 getrennt werden.

Durch die zweistufige Chromatographie sollten die Proteine in einem ersten Schritt mit Hilfe der Säule MonoS getrennt werden. Da Lyc e 3 einen errechneten pI von ca. 8, Lyc e 1 jedoch einen errechneten pI von ca. 4,45 besitzt, konnten die beiden Proteine durch den Kationenaustauscher MonoS voneinander separiert werden. In der Lösung verbliebene höhermolekulare Proteine wurden in einem zweiten Schritt durch die Größenfraktionierung mit Hilfe der Säule Superdex (16/60) abgetrennt.

Die Proteinausbeute war durch den geringen Schalenanteil bei der Tomate beschränkt. Aus 2 kg Tomaten konnten ca. 165 g Tomatenschale separiert werden, woraus sich ca. 1,2 mg LTP ergaben.

### 6.2.3 Charakterisierung und Stabilität bei der Verarbeitung

Bevor Untersuchungen mit dem Tomaten LTP durchgeführt werden konnten, musste die Sekundärstruktur überprüft werden (Kap. 5.3.1.3.1). Da Aussagen über sequenzielle oder konformationelle Epitope gemacht werden sollten, ist eine richtige Faltung des Tomaten LTP essentiell. Im CD-Spektrum zeigte Tomaten LTP eine für Lipid Transfer Proteine typische  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur mit Minima bei 208 und 222 nm. Lipid Transfer Proteine sind sehr stabil gegenüber Pepsinverdau und Hitze (Brenna et al., 2000; Asero et al., 2001; Duffort et al., 2002; Pastorello et al., 2002 und 2003; Scheurer et al., 2004). Ihre hohe Stabilität im Magen-Darm-Trakt gegenüber



proteolytischem Verdau könnte eine mögliche Ursache für die von ihnen ausgelöste schwere Symptomatik sein (van Ree, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität von Lyc e 1 und Lyc e 3 bei Pepsinverdau (Kap. 4.2.3 und 5.3.1.5) untersucht. Die Pepsinspaltstellen (Phe ↓ Tyr Trp Leu) von Lyc e 3 wurden mit Hilfe des „PeptideCutters“ (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter>) identifiziert. Das Protein besitzt insgesamt 19 potentielle Pepsinspaltstellen, die gleichmäßig über die gesamte Proteinsequenz verteilt sind. Lyc e 3 im Tomatenschalenextrakt wurde auch nach Verdau mit Pepsin über zwei Stunden nicht abgebaut und war immer noch IgG-reaktiv. Die IgG-Reaktivität wurde mit dem Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP Serum detektiert, welches nach eigenen Erkenntnissen ausschließlich Konformationsepitope erkennt (Kap. 5.3.1.6). Daher wird davon ausgegangen, dass die Konformation von Lyc e 3 auch nach 2 stündigem Pepsinverdau intakt ist. Eine intakte Konformation ist ebenfalls Voraussetzung für die IgE-Reaktivität des Lyc e 3 (Kap. 5.3.1.6). Daher wird auf Basis dieser Ergebnisse davon ausgegangen, dass über 2 Std. verdautes Lyc e 3 IgE-reaktiv wäre. Diese Ergebnisse werden durch Studien bestätigt, bei denen ebenfalls LTPs mit Pepsin verdaut wurden. Hier konnte nach zwei Stunden Pepsinverdau noch eine IgG-Reaktivität von Pru p 3, Pru av 3 bzw. Karotten LTP gezeigt werden (Asero et al., 2000 und 2001, Duffort et al., 2002; Scheurer et al., 2004). Pepsin verdauter Kirscheextrakt induzierte im basophilen Histamin Freisetzungstest eine dosisabhängige Histaminfreisetzung (Scheurer et al., 2004). Demgegenüber war Lyc e 1 bereits nach einem Verdau über 15-20 Min. nicht mehr IgG-reaktiv. Eine geringe Stabilität des Kirschprofilins Pru av 4 bei Pepsinverdau wurde von Scheurer et al. (2004) beobachtet. Rekombinantes Pru av 4 konnte nach einem Verdau über 15 Min. nicht mehr detektiert werden. Durch den Verdau mit gereinigten Proteasen können die physiologischen Bedingungen im Magen nicht genau nachgestellt werden. Des Weiteren kann auf Grund des Verdaus von Schalenextrakt nicht gewährleistet werden, dass Lyc e 1 und Lyc e 3 in derselben Menge in dem Extrakt enthalten sind. Daher können die genauen Zeitpunkte des Verdaus nicht miteinander verglichen werden. Jedoch lässt sich auf Grund der rapiden Abnahme der IgG-Reaktivität von Lyc e 1 sagen, dass Lyc e 1 tendenziell anfälliger gegenüber Pepsinverdau ist als Lyc e 3. Dies könnte an der kompakten Struktur der LTPs liegen, bei der 4  $\alpha$ -helikale Bereiche durch 4 Disulfidbrücken stabilisiert werden. Disulfidbrücken gelten allgemein als stabilisierender Faktor der nativen Proteinstruktur (Matsumura & Matthews 1989). Lehmann et al. (2006) stellten fest, dass es sich bei den proteasestabilen Anteilen des Erdnussallergens Ara h 2 um disulfidverbrückte Untereinheiten handelt. Das 2S-Albumin Ara h 2 gehört wie die LTPs zu den Proteinen der Prolamin-Superfamilie.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Präsenz von Lyc e 3 in verarbeiteten Lebensmitteln mittels Immunoblot untersucht (Kap. 5.3.1.5). Lyc e 3 konnte in der Schale von gekochten Tomaten und in getrockneten Tomaten identifiziert werden. In Tomatensaft wurde kein Lyc e 3 detektiert, dies ist auf die Produktion von Tomatensaft zurückzuführen. Hierbei wird die Tomatenschale vor der Saftproduktion durch kurzes Erhitzen und nachfolgendes Schälen der Tomaten entfernt. Da Lyc e 3 in der Schale lokalisiert ist, wird es durch diese Prozedur eliminiert. Vor allem in Mittelmeerländern werden häufig Tomaten mit Schale für die Zubereitung von Tomatensoßen und –suppen verwendet und auch der Verzehr von getrockneten Tomaten ist hier hoch. In Bezug auf die Stabilität von LTPs in verarbeiteten Lebensmitteln wurde bereits festgestellt, dass hohe Temperaturen zwar andere Proteine des Pfirsich zerstören, Pru p 3 jedoch IgE-reaktiv bleibt (Brenna et al., 2000). Auch das LTP der

Gerste ist nach dem Prozess des Bierbrauens noch IgE-reaktiv (Garcia-Casado et al., 2001). Mais-LTP wurde bis zu 160 Min. bei 100°C erhitzt und anschließend die IgE-Reaktivität des Mais LTP nachgewiesen (Pastorello et al., 2003). Auch die allergene Potenz von gereinigtem Mal d 3 des Apfels wurde bereits nach Hitzeinwirkung untersucht (Sancho et al., 2005). Hier wurde zwischen milder (90°C, 20 Min.) und starker Erhitzung (100°C, 2 Std.) unterschieden. In ELISA Inhibitionstests wurde dann untersucht, ob die erhitzten LTPs die IgE-Bindung an das native Mal d 3 inhibieren können. Nach milder Erhitzung wurde kein Unterschied zu dem nicht erhitzten Mal d 3 festgestellt. Stark erhitztes Mal d 3 konnte die IgE-Bindung an natives Mal d 3 zwar zu 100% inhibieren, jedoch war hierfür eine um das 100fach höhere Konzentration notwendig. Im Histamin Freisetzungstest konnte eine um das 100-1000fach reduzierte allergene Potenz von thermisch prozessiertem Mal d 3 bestätigt werden. Auch in verarbeiteten Lebensmitteln wie Polenta (Pastorello et al., 2003), Kirschsaff, eingemachte Kirschen und Kirschmarmelade (Scheurer et al., 2004) konnte LTP im Immunoblot noch nachgewiesen werden. Extrakt aus den Kirschprodukten waren zusätzlich in der Lage im basophilen Histamin Freisetzungstest eine dosisabhängige Histaminfreisetzung bei Kirschallergikern zu induzieren. Ebenso war die IgE-Reaktivität von Cor a 8 nach der Röstung von Haselnüssen unverändert (Pastorello et al., 2002).

Durch die Stabilität von LTPs bei der Verarbeitung und die häufige Korrelation einer LTP Sensibilisierung mit einer schweren Symptomatik dürfen verarbeitete Produkte bei Verzehrsempfehlungen für Nahrungsmittelallergiker nicht vernachlässigt werden.

#### **6.2.4 Untersuchung der Strukturabhängigkeit der IgE-bindenden Epitope**

Die IgE-bindenden Epitope von Lyc e 3 wurden durch Reduktion und Alkylierung von natürlichem gereinigtem Lyc e 3 untersucht. Die IgE-Bindungskapazität von nLyc e 3 war nach Reduktion und Alkylierung vollständig aufgehoben (Kap. 5.3.1.6, Abb. 5.10). Auch das Kaninchen-anti-Pfirsich-LTP Serum zeigte keine IgG-Bindung mehr an das reduzierte und alkylierte Protein. Diese Ergebnisse zeigen, dass die IgE- und IgG-Bindung von nLyc e 3 strukturabhängig ist. IgE-bindende Epitope von Nahrungsmittel LTPs wurden bisher von García-Casado et al. (2003) am Beispiel von Pru p 3 untersucht. Hier wurde ein Peptid Map mit synthetisch hergestellten Peptiden (10 mer; Überhang 5 Aminosäuren) durchgeführt. Die Regionen zwischen den Aminosäuren 11-25, 31-45 und 71-80 wurden als stark IgE-bindende Bereiche identifiziert. Die IgE-Bindung von Pru p 3 scheint auf Basis dieser Ergebnisse durch Sequenzepitope determiniert zu sein. Leider wurde im Rahmen dieser Studie keine Reduktion und Alkylierung des natürlichen oder rekombinanten Pru p 3 mit nachfolgender Immundetektion durchgeführt. Eigene Vorarbeiten bestätigen die Theorie, dass es sich bei den IgE-bindenden Epitopen von LTPs um strukturabhängige Epitope handelt: nach Reduktion und Alkylierung von rPru av 3 konnte mit Seren von Kirschallergikern keine IgE-Bindung mehr festgestellt werden (nicht gezeigt).

### 6.3 Relevanz der Lyc e 3 Isoformen

#### 6.3.1 Identifikation von natürlichen Lyc e 3 Isoformen

Obwohl LTPs als Multigenfamilie bekannt sind, ist die Existenz von Isoformen auf Proteinebene noch unklar. Bei Vorarbeiten von Prof. Dr. U. Sonnewald wurden mittels RT-PCR unterschiedliche Lyc e 3 Isoformen in der Tomatenfrucht identifiziert. Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2 wurden als Vertreter dieser Isoformen zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Ob und in welcher Menge diese Isoformen exprimiert werden, sollte mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese überprüft werden. Einzelne Proteinspots sollten dann zur Identifikation sequenziert werden. Auch für die Überprüfung des „gene silencing“ ist die Identifizierung von Lyc e 3 Isoformen auf Proteinebene von Bedeutung. Nach dem „gene silencing“ mit einem RNAi Konstrukt sollte die Expression aller IgE-reaktiven Lyc e 3 Isoformen inhibiert werden. Ist die Expressionsrate der unterschiedlichen Lyc e 3 Isoformen bekannt, kann der Erfolg des „gene silencing“ verifiziert werden.

Vor der Auftrennung von Tomatenschalenextrakt durch die 2D GE musste eine Extraktionsmethode etabliert werden, um die Ausbeute an Lyc e 3 zu optimieren. Des Weiteren musste der Extrakt für die erste Dimension der 2D GE geeignet sein (geringe Salzkonzentration). Tomatenextrakt wurde bereits von Fötisch et al. (2001) zweidimensional aufgetrennt. Die Extraktion der Tomatenproteine erfolgte durch PBS, die zweidimensionale Auftrennung über einen Bereich von pI 3,5-9,3 und 14-94 kDa und erfasste daher nicht die Proteine der LTP-Familie. Ausschließlich das Weizen LTP wurde bisher in einer 2D GE dargestellt, die Extraktion erfolgte mit harnstoffhaltiger Rehydratisierungslösung. Unterschiedliche Isoformen des Weizen LTP wurden jedoch nicht identifiziert (Kitta et al., 2006). Bei der 2D GE von Kirscheextrakt wurde zur Anreicherung von Pru av 1 Ammoniumcarbonatpuffer pH 8.1 verwendet (Reuter et al., 2005). Zur zweidimensionalen Analyse diverser Tomatengewebe verglichen Saravanan und Rose (2004) zwei auf TCA Fällung basierenden Extraktionen mit einer Phenolextraktion. Da LTPs einen basischen isoelektrischen Punkt haben, wurde angenommen, dass sie sich durch saure Extraktionspuffer leichter anreichern lassen. Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Extraktion in diversen Puffern oder Lösungen mit pH 5 bis pH 2 durchgeführt (Kap. 5.3.4.1). Die PBS Extraktion erfolgte parallel zu jeder Extraktion als Positivkontrolle. Im Gegensatz zu vorherigen Annahmen konnte Lyc e 3 ausschließlich mit PBS extrahiert werden. Da PBS jedoch durch eine hohe Salzkonzentration für die erste Dimension der 2D GE kein optimaler Puffer war, musste vor der ersten Dimension eine Proteinfällung erfolgen. Hier stellte sich die auf einer TCA Fällung basierende Reinigung durch das Clear up Kit (BioRad, München) als Methode der Wahl heraus. Vorarbeiten mit nPru p 3 zeigten (Kap. 5.3.4.2), dass der errechnete pI entweder nicht mit dem tatsächlichen pI übereinstimmt oder dass die IPG Streifen im Randbereich keine scharfe Trennung ermöglichen. Der errechnete pI von Pru p 3 beträgt 9, wird die erste Dimension jedoch mit Streifen von pI 7-10 durchgeführt, so erfolgt keine Auftrennung des Proteins. Durch die Verwendung von IPG Streifen von pI 6-11 ist eine bessere Auftrennung von Pru p 3 in der ersten Dimension möglich (Abb. 5.30). Pru p 3 erscheint, wie Lyc e 3 (Abb. 5.33), entweder als ein Spot oder als eine perlenschnurartige Aneinanderreihung mehrerer verschwommener Spots. Weder durch die 2D GE von Pru p 3 als auch

von Lyc e 3 konnten mehrere verschiedene LTP Isoformen identifiziert werden (Kap. 5.3.4.2 und Kap. 5.3.4.3).

Bei der nano-HPLC nano ESI-MS/MS Analyse von gereinigtem Lyc e 3 (Kap. 5.3.4.4) durch Dr. A. Reuter wurde ausschließlich die Isoform mit der Ac.No.: CAA39512 identifiziert. Diese Isoform entspricht weder der Lyc e 3.1 noch der Lyc e 3.2 Isoform. Wahrscheinlich sind die anderen Isoformen, die in der Varietät Mikrotom in der Schale durch RT-PCR von Prof. Dr. U. Sonnewald bestätigt werden konnten, in einer durch nano-HPLC nano ESI-MS/MS nicht nachweisbaren Menge in der Präparation vorhanden. Zudem wurde nicht die Varietät Mikrotom sondern gereinigtes nLyc e 3 aus spanischen Tomaten vom Markt für die Versuche verwendet. Auf Grund der knappen Ausbeute an nLyc e 3 aus Tomatenschalenextrakt (1,2 mg aus 2 kg Tomaten) und der geringen Größe und beschränkten Verfügbarkeit von Mikrotom Tomaten, war die Aufreinigung von nLyc e 3 aus der Varietät Mikrotom nicht möglich. Die Identifikation von ausschließlich einer Isoform mittels nano-HPLC nano ESI-MS/MS erklärt, warum bei der 2D GE mit nLyc e 3 aus spanischen Tomaten keine weiteren Isoformen als zusätzliche Spots erkennbar waren. Reuter et al. (2005) identifizierten zwei Isoformen des Kirschallergens Pru av 1 (Pru av 1.0101 und Pru av 1.0201) über eine cDNA Expressionsgenbibliothek und eine RT-PCR Strategie und identifizierten sie auf Proteinebene mittels 2D GE. Prinzipiell ist eine Visualisierung von Isoformen, die mittels RT-PCR identifiziert wurden also auch in der 2D GE möglich. Jedoch wurden in der Studie ursprünglich drei Pru av 1 Isoformen mittels RT-PCR identifiziert, eine Isoform (Pru av 1.0203) wurde auf Proteinebene nicht detektiert. Die Autoren ziehen hier auch als Ursache eine sehr geringe Expressionsrate dieser Isoform auf Proteinebene, die massenspektroskopisch nicht erfasst werden kann, in Betracht.

In einem Gel mit natürlich gereinigtem Pru p 3 (Abb. 5.31) waren 2 Spots zu erkennen. Diese konnten jedoch nicht N-terminal ansequenziert werden, um sie als LTP zu identifizieren. Entweder war die Proteinmenge zu gering oder die Proteine waren N-terminal blockiert. Die N-terminale Blockierung könnte, wie im Ergebnisteil beschrieben, durch die Anwesenheit von Harnstoff im Rehydratisierungspuffer ausgelöst worden sein. Es könnte sich jedoch auch um eine einzige Isoform handeln, die durch nichtenzymatische Deamidierung von Asparagin oder Glutamin in mehreren Spots erscheinen kann (Reuter et al., 2005). Je nachdem an welcher Stelle die Deamidierung erfolgt, können Spots als perlenschnurartige Artefakte erscheinen. Pru p 3 besitzt zwar kein Asparagin, jedoch drei Glutaminreste, daher könnte es sich bei den beiden sichtbaren Spots um ein solches Artefakt handeln.

Bisher ist das Vorkommen von LTP Isoformen ausschließlich bei den Pollen des Glaskrauts bekannt und untersucht. Asturias et al. (2003) untersuchten die IgE-bindenden Epitope der beiden LTPs Par j 1 und Par j 2. Die beiden Proteine besitzen eine Sequenzidentität von 45% und drei ähnliche IgE-bindende Epitope. Zuidmeer et al. (2006) identifizierten in einer cDNA Bibliothek 6 Isoformen des Erdbeer LTP Fra a 3, konnten jedoch nur eine Isoform in *P.pastoris* exprimieren.

### 6.3.2 Klonierung und Expression von Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2

Die rekombinante Herstellung ist die einzige Möglichkeit zur Gewinnung größerer gereinigter Mengen der beiden Lyc e 3 Isoformen für Vergleichsstudien. Eine Aufreinigung der natürlichen Isoformen aus der nLyc e 3 Präparation wäre auf Grund von ähnlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten nicht möglich. Da die IgE-Bindung von Lyc e 3 auf Konformationsepitopen basiert (Kap. 5.3.1.6), ist die richtige Faltung der rekombinanten Proteine notwendig. Die korrekte Ausbildung der 4 Disulphidbrücken stellt eine entscheidende Schwierigkeit in *E.coli* dar. Durch erfolgreiche Expressionen von LTPs oder anderen Proteinen der Prolamin Superfamilie im prokaryotischen Expressionssystem *E.coli* (Scheurer et al., 2001; Lehmann et al., 2003), schien eine *E. coli* basierte Expression jedoch prinzipiell geeignet. Um eine korrekte Ausbildung der 4 intramolekularen Disulphidbrücken zu gewährleisten sowie um die Proteinausbeute zu erhöhen, wird in neueren Arbeiten die Expression von LTPs in dem Hefesystem *Pichia pastoris* (*P.pastoris*) durchgeführt (Ballmer-Weber et al., 2005; Zuidmeer et al., 2005). Dies sind geeignete Expressionssysteme, da natürlich vorkommende LTPs posttranslational nicht modifiziert sind.

Drei unterschiedliche Expressionsvektoren wurden für die Expression der Lyc e 3 Isoformen in *E. coli* getestet: pET100/D-TOPO<sup>®</sup> (Kap. 5.3.2.1.1), pGEX-6P-1 (Kap. 5.3.2.1.2) und pET-32a (Kap. 5.3.2.1.3). Mit Hilfe des pET-32a wurde bereits die Expression eines  $\alpha$ -helikalen Proteins der Prolamin Superfamilie (Ara h 2) erfolgreich durchgeführt (Lehmann et al., 2003). Der Expressionsvektor pET-32a erhöht genauso wie der Vektor pGEX-6P-1 die Löslichkeit des exprimierten Proteins durch eine Koexpression des stark löslichen Thioredoxin (pET-32a) bzw. Glutathion-S-Transferase (pGEX-6P-1) als Anhangssequenz. Thioredoxin katalysiert zusätzlich die Bildung von Disulfidbrücken, was bei der Expression eines LTPs sinnvoll ist. Als Expressionszellen wurden bei den Vektoren pET100/D-TOPO<sup>®</sup> und pGEX-6P-1 *E.coli* BL 21, bei pET-32a *E.coli* Origami verwendet. Die Origami Zellen enthalten eine Mutation des Glutathionreduktase (*gor*) und des Thioredoxinreduktase (*trxB*) Gens und erhöhen somit die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma (Prinz et al., 1997).

Die Expression wurde zuerst mit dem Konstrukt pET100/D-TOPO-3.1/-3.2 in BL 21 durchgeführt. Unter den beschriebenen Bedingungen wurden Proteinausbeuten von ca. 800  $\mu\text{g/l}$  Kultur erzielt. Dies entsprach zwar zuvor erzielten Ausbeuten bei der Expression von rPru av 3 in dem Vektor pET-16b (Scheurer et al., 2001), war jedoch für die geplanten Untersuchungen eine nicht ausreichende Menge. Deswegen wurden die Expressionsraten der Konstrukte pET-32a und pGEX-6P-1 verglichen. Nach dem Vergleich der Expression vor Induktion der Proteinsynthese und nach 4 Std. war bei dem pET-32a eine eindeutige Expression des Zielproteins zu erkennen, jedoch nicht bei pGEX-6P-1. Daher wurden die Versuche mit dem Konstrukt pET-32a weitergeführt. Die Anwesenheit von Thioredoxin schien sich positiv auf die Expressionsrate in dem Origami Stamm mit *trxB/gor* Mutation auszuwirken. Die Reinigung des Fusionsproteins aus dem Bakterienlysat erfolgte affinitätschromatographisch über  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose (Kap. 5.3.2.2.2). Bei einem Vergleich der Effektivität der Aufreinigung der Fusionsproteine konnte zwischen  $\text{Ni}^{++}$ - und  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose kein Unterschied festgestellt werden. Die Auswahl von  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose erfolgte willkürlich.

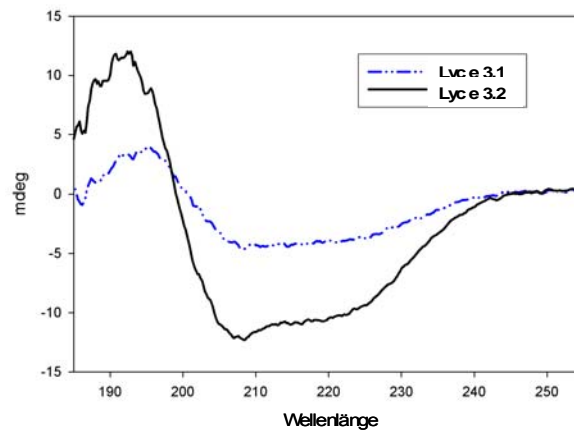
Nach der Reinigung erfolgte die Abspaltung der Anhangssequenz (Kap. 5.3.2.3) zunächst mit der Enterokinase EKMax. Obwohl beide Isoformen keine Erkennungssequenzen für die EKMax

enthielten, wurde die Lyc e 3.1 Isoform unspezifisch gespalten (Abb. 5.16). Daher erwies sich die Spaltung mit der EKMax in diesem Fall als nicht praktikabel, da beide Proteine unter einheitlichen Bedingungen hergestellt werden sollten. Die Spaltung mit der Protease Thrombin erfolgte sehr spezifisch und effizient. Da jedoch nach Abspaltung der Anhangssequenz auf Grund der Position der Thrombinschnittstelle ein 4 kDa großer Fusionsanteil an dem Zielprotein verblieb, wurde das Konstrukt pET-32a-PP hergestellt (Abb. 5.14). Hier wurde genau unmittelbar am N-terminalen Ende des Zielproteins eine PreScission Protease (PP) Erkennungssequenz eingefügt. Die Spaltung mit der PreScission Protease wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass wieder die Isoform Lyc e 3.1 unspezifisch gespalten wurde (Abb. 5.19.A). Nach enzymatischem Verdau unter Anwesenheit von DTT und EDTA erfolgte die Spaltung spezifisch (Abb. 5.19.B). Offensichtlich wird die Spezifität der PP durch DTT und EDTA erhöht. Die PP spaltet das Protein an der Erkennungssequenz (L-E-V-L-F-Q/G-P). Diese Sequenz hat unter nicht reduzierten Bedingungen eine gewisse Konformation. Eventuell besitzt die Lyc e 3.1 Isoform Abschnitte, deren Konformation ähnlich der Konformation der PP Erkennungssequenz ist. Unter nicht reduzierenden Bedingungen spaltet die PP also auch an diesen Stellen. Im Gegensatz hierzu erkennt die PP nach Aufhebung der Konformation des Proteins durch Zugabe des Reduktionsmittels DTT ausschließlich die Erkennungssequenz. Nach Zugabe von EDTA spaltet die PP ebenfalls spezifisch. EDTA könnte die Aktivität der PP verringern, so dass sie nicht mehr an Stellen spaltet, deren Konformation ähnlich der Konformation der Erkennungssequenz ist. Die Proteinausbeute nach Spaltung durch PP und Entfernung des Fusionsanteils mittels Größenchromatographie war jedoch sehr gering. Nach der Spaltung und Aufreinigung von Protein aus 1 l Kultur ergab sich eine so geringe Menge Protein, dass keine Proteinbestimmung mehr möglich war. Für die Herstellung von rekombinanten Proteinen im präparativen Maßstab war diese Methode ungeeignet.

Die Spaltung mit Thrombin erwies sich als einzige effiziente Methode, um die rekombinanten Proteine in größeren Mengen herzustellen (Kap. 5.3.2.4). Daher wurde der am Zielprotein verbleibende 4 kDa große Fusionsanteil akzeptiert. Die Spaltung wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen für Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2 identisch durchgeführt. Die Struktur der Proteine wurde nicht durch Zugabe von reduzierenden Agenzien wie DTT zerstört. Eine Rückfaltung der reduzierten Proteine wäre wiederum mit Proteinverlusten verbunden gewesen.

Die Reinigung der Spaltprodukte erfolgte affinitätschromatographisch über  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose, analog zu der Aufreinigung der Fusionsproteine aus dem Bakterienlysat. Der Fusionsanteil wurde an die  $\text{Co}^{++}$ -NTA-Agarose gebunden und das Zielprotein befand sich im Durchlauf. Nach der Aufreinigung lag die Proteinausbeute für rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2, die in dem pET-32a System ohne PP Erkennungssequenz exprimiert wurden, bei ca. 5 mg/l (Kap. 5.3.2.4).

Mit keinem der drei Konstrukte unter Verwendung der entsprechenden Expressionszellen und Proteasen zur Abspaltung der Anhangssequenz konnte ein rekombinantes Protein in präparativem Maßstab hergestellt werden, welches dieselbe Sekundärstruktur besaß wie die natürliche Lyc e 3 Präparation. Eine ähnliche Sekundärstruktur mit den Minima bei 208 und 222 nm und einem Schnittpunkt der x-Achse bei 200 nm wurde ausschließlich nach Verwendung des Konstruktes pET100/D-TOPO-3.2 erreicht. Das CD-Spektrum ist in Abb. 6.1 dargestellt.



**Abb. 6.1: CD-Spektroskopie von rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 nach Verwendung der Konstrukte pET100/D-TOPO-3.1 und -3.2.**

Alle Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 bei 20°C durchgeführt. Die molare Elliptizität wurde nicht berechnet.

Das Problem bei Verwendung dieser Konstrukte war jedoch neben der geringen Proteinausbeute, dass das oben gezeigte CD-Spektrum vor allem für rLyc e 3.1 nicht bei jeder Präparation reproduzierbar war. Die Histidinanhangssequenz hatte keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur. Dies konnte von Scheurer et al. (2004) am Beispiel von rPru av 3, welches in den Vektor pET-16b kloniert wurde, gezeigt werden. Rekombinantes Pru av 3, welches einen Histidinfraktionsanteil enthielt, zeigte ein für LTPs typisches CD-Spektrum (analog zu dem CD-Spektrum von rLyc e 3.2 in Abb. 6.1).

Die Proteine, die mit Hilfe des Konstruktes pET-32a-3.1 und -3.2 exprimiert wurden, enthielten nach Abspaltung des Fusionsanteils durch Thrombin eine Anhangssequenz von ca. 4 kDa. Diese Anhangssequenz könnte die Unterschiede des CD-Spektrums des rekombinanten im Vergleich zum natürlichen Protein erklären. Über den Einfluss des S-Fusionsanteils auf die Sekundärstruktur von rekombinanten Proteinen ist bisher nichts bekannt. Die Minima lagen bei 200 und 222 nm. Diese Verschiebung der Kurve kann durch die Anwesenheit von teilweise ungefaltetem Material erfolgen. Gleichzeitig ist in Abb. 5.17 zu erkennen, dass sich neben dem Zielprotein bei einem Molekulargewicht von 14 kDa mindestens ein weiteres Fremdprotein in der Präparation befindet. Dieses Fremdprotein konnte nicht entfernt werden und könnte ebenfalls die Ursache für die veränderten CD-Spektren sein. Da sich die CD-Spektren für rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 nicht unterschieden (Abb. 5.18), sollte die IgE-Bindungskapazität dieser beiden Präparationen ermittelt und miteinander verglichen werden. Besitzen die beiden Isoformen eine hohe IgE-Bindungskapazität, so sollte auch die natürliche Präparation in die Untersuchungen einbezogen werden.

Eine Alternative zur Expression von rekombinanten Allergenen in *E.coli* ist die Expression in *P. pastoris*. Das Fra a 3 aus der Erdbeere (Zuidmeer et al., 2005), das Mal d 3 aus dem Apfel (Zuidmeer et al., 2005) und das LTP der Karotte (Asero et al., 2000) wurden bereits in dem Hefesystem exprimiert. Jedoch wird in keiner Publikation auf die Sekundärstruktur des Proteins eingegangen.

### 6.3.3 Charakterisierung der Isoformen rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2

Die Experimente zur Charakterisierung der Isoformen wurden mit einer geringen Anzahl an Patientenserum durchgeföhrt. Außerdem weisen die rekombinanten Isoformen im Vergleich zu der natürlichen Präparation Differenzen in der Sekundärstruktur auf. Daher geben die vorliegenden Experimente ausschließlich Hinweise zu Unterschieden in der IgE-Bindungskapazität und der biologischen Aktivität. Die Reaktivität von nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 mit spezifischem IgE im Serum von LTP positiven Tomatenallergikern wurde mit Hilfe des ELISA ermittelt (Kap. 5.3.3.1). Tendenziell besitzen die Patienten am meisten spezifisches IgE gegen rLyc e 3.2. Die Bedeutung der spezifischen IgE-Konzentration für die allergene Potenz des Proteins wird später diskutiert.

Bei einem dosisabhängigen ELISA Inhibitionsversuch mit einem Serum (CS-001) und rLyc e 3.1 bzw. rLyc e 3.2 an der Festphase (Kap. 5.3.3.3) wurde eine höhere IgE-Bindungskapazität für rLyc e 3.2 festgestellt (Abb. 5.24). Es war möglich, die IgE-Bindung an rLyc e 3.1 durch Präinkubation des Patientenserums mit rLyc e 3.2 zu ca. 80% zu hemmen. Die IgE-Bindungskapazität ist auf Grund der Verschiebung der Inhibitionskurve um eine Zehnerpotenz bei diesem Patienten für rLyc e 3.2 um ein Zehnfaches höher als für rLyc e 3.1. Umgekehrt konnte die IgE-Bindung an rLyc e 3.2 auf der Festphase nicht durch rLyc e 3.1 inhibiert werden. Die IgE-bindenden Epitope der Isoform Lyc e 3.1 kommen also fast vollständig auf der Lyc e 3.2 Isoform vor, während Lyc e 3.2 zusätzliche IgE-bindende Epitope besitzen müsste, die nicht auf Lyc e 3.1 exponiert sind. Diese Untersuchungen wurden ausschließlich mit einem Serum durchgeföhrt. Aussagen über die unterschiedliche IgE-Bindungskapazität der Isoformen können also nur für dieses Serum getroffen werden.

Obwohl rLyc e 3.2 partiell ungefaltetes Material enthielt und im Vergleich zu der natürlichen Präparation eine deutlich unterschiedliche Sekundärstruktur aufwies, wurden beide Moleküle hinsichtlich ihrer IgE-Bindungseigenschaften verglichen (Kap. 5.3.3.4). Ein Vergleich der IgE-Bindung zwischen der natürlichen und rekombinanten Präparation wurde auf Grund der höheren IgE-Bindungskapazität der 3.2 Isoform ausschließlich mit dieser Form durchgeföhrt. Bei Betrachtung des Serums CS-001 (Abb. 5.25) ist zu erkennen, dass die IgE-Bindung an nLyc e 3 durch rLyc e 3.2 konzentrationsabhängig bis zu 100% inhibiert werden konnte. Umgekehrt war es nur möglich, die IgE-Bindung an rLyc e 3.2 mit nLyc e 3 konzentrationsabhängig bis zu 60% zu hemmen. Es könnte jedoch sein, dass durch den Einsatz von höheren Proteinmengen des Inhibitors nLyc e 3 eine 100%ige Inhibition der IgE-Bindung an rLyc e 3.2 erreicht werden könnte. In beiden Fällen lief die Inhibitionskurven nicht parallel zueinander, was auf Unterschiede der IgE-bindenden Epitope hinweist. Bei Serum PEI 131 (Abb. 5.26) war es nicht möglich, die IgE-Bindung an nLyc e 3 mit rLyc e 3.2 zu inhibieren. Die IgE-Bindung an rLyc e 3.2 konnte jedoch mit nLyc e 3 zu 100% gehemmt werden. Bei den ELISA-Inhibitionen für die beiden unterschiedlichen Seren ergeben sich gegensätzliche Ergebnisse. Die getesteten Lyc e 3 Formen sind für die beiden getesteten Patienten unterschiedlich Relevant. Die hinsichtlich der IgE-Bindung bei Patient CS-001 involvierten Epitope sind auf nLyc e 3 und rLyc e 3.2 präsent. Die für Patient PEI 131 relevanten IgE-bindenden Epitope scheinen zwar auf nLyc e 3, nicht jedoch auf rLyc e 3.2 präsentiert zu werden. An diesem Beispiel wird klar, dass an der IgE-Bindung wahrscheinlich unterschiedliche und für Patienten individuelle IgE-bindende Epitope involviert sind und dass die unterschiedlichen Isoformen möglicherweise unterschiedliche Epitope



aufweisen. Auch in Bezug auf die allergene Potenz, gemessen im basophilen Histamin Freisetzungstest (Kap. 5.3.3.5), können keine allgemeinen Aussagen für nLyc e 3, rLyc e 3.1 und rLyc e 3.2 gemacht werden. Für natürliches Lyc e 3 konnte bei allen 3 getesteten Seren eine starke dosisabhängige Histaminfreisetzung gezeigt werden. Die Konzentration an Lyc e 3 spezifischem IgE betrug bei CS-001, CS-003 bzw. CS-010 ca.  $OD_{450} = 0,7, 0,5$  bzw.  $0,3$ . (Abb. 5.23). Dies zeigt, dass die Konzentration an spezifischem IgE nicht mit der biologischen Aktivität des Proteins korrelieren muss. Die Affinität zwischen dem spezifischem IgE und dem Allergen spielt bei der biologischen Aktivität eine maßgebliche Rolle. Ein weiteres Indiz hierfür sind die Ergebnisse des Histamin Freisetzungstestes für Serum CS-003. Obwohl der spezifische IgE-Titer des Serums für nLyc e 3 und rLyc e 3.2 identisch ist, zeigt rLyc e 3.2 keine allergene Potenz im Histamin Freisetzungstest.

Dass Isoformen eines Allergens eine unterschiedliche IgE-Bindungskapazität haben, wurde von Ballmer-Weber et al. (2005) bewiesen. Zwei rekombinante Isoformen des Allergens aus Karotte (*Daucus carota*) Dau c 1 wurden kloniert und exprimiert. Isoformspezifisches IgE der Patienten wurde im ELISA gemessen, obwohl die Sekundärstruktur der beiden Isoformen (wie bei nLyc e 3 und rLyc e 3.2) nicht identisch war. Die Häufigkeit der IgE-Bindung an rDau c 1.0104 war mit 98% höher als an rDau c 1.0201 mit 65%. Bei einem Vergleich der IgE-Bindungskapazität der beiden Isoformen im Rahmen einer ELISA-Inhibition, konnte bei 19/24 Seren die IgE-Bindung an rDau c 1.0104 nur zu durchschnittlich 26% mit rDau c 1.0201 gehemmt werden. Bei den restlichen Seren lag die Hemmung der IgE-Bindung bei durchschnittlich 75%. Die IgE-Bindung an rDau c 1.0201 konnte mit rDau c 1.0104 bei 4/5 Seren gar nicht oder nur sehr schwach inhibiert werden, nur bei einem Serum erfolgte eine Inhibition von ca. 75%. Die Ergebnisse für die Dau c 1 Isoformen zeigen genau wie die Ergebnisse für die Lyc e 3 Isoformen, dass unterschiedliche IgE-bindende Epitope auf den Isoformen eines Allergens vorhanden sein könnten. Des Weiteren ist die Erkennung der IgE-bindenden Epitopen sehr spezifisch für jeden Patienten.

Von dem Bet v 1 homologen Mal d 1 beschrieben Son et al. (1999) und Helsper et al. (2002) vier Isoformen, jedoch wurden keine Vergleiche der IgE-Bindungskapazität gemacht. Für ein anderes Bet v 1 homologes Allergen, das Pru av 1 der Kirsche, wurde eine zweite Isoform durch eine cDNA Bibliothek identifiziert. Die beiden Isoformen (Pru av 1.0101 und Pru av 1.0201) besitzen auf Aminosäurenebene eine Sequenzähnlichkeit von 73%. Die IgE-Bindung an die Pru av 1.0201 konnte im 2D-Immunoblot nicht durch Präinkubation des Patientenserums mit der dominanten Isoform Pru av 1.0101 inhibiert werden (Reuter et al., 2005). Dies lässt auf eine unterschiedliche IgE-Bindungskapazität der beiden Isoformen schließen.

Auch von dem Hauptallergen des Birkenpollen Bet v 1 existieren unterschiedliche Isoformen (Ferreira et al., 1996). Neun Bet v 1 Isoformen wurden auf Grund ihrer IgE-Bindungskapazität in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: hohe, mittlere und geringe bzw. keine IgE-Bindungskapazität. Überraschenderweise waren hypoallergene Bet v 1 Isoformen in der Lage, eine starke allergenspezifische T-Zellantwort zu induzieren. Im Gegensatz dazu induzierten die Isoformen mit einer hohen IgE-Bindungskapazität und einer starken allergenen Potenz (getestet im SPT) eine schwächere allergenspezifische T-Zellantwort. Dies zeigt, dass die Identifikation von hypoallergenen Isoformen für die Immuntherapie sinnvoll wäre.

Hypoallergene Isoformen von LTPs wurden bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht identifiziert. Jedoch gerade bei LTPs wäre eine spezifische Immuntherapie mit hypoallergenen Isoformen auf Grund der häufig schweren Symptomatik bei einer Sensibilisierung auf diese Allergene sinnvoll. Die beiden Lyc e 3 Isoformen, die in dieser Arbeit kloniert und exprimiert wurden, kämen als hypoallergene Isoformen nicht in Frage, da sie beide in der Lage sind, IgE zu binden und eine Freisetzung von Histamin zu induzieren. Eine mögliche Alternative zu der Klonierung und Expression von hypoallergenen Lyc e 3 Isoformen, wäre eine Immuntherapie mit dem reduzierten und alkylierten Material. In Kap 5.3.1.6 konnte bewiesen werden, dass dieses Material kein IgE mehr bindet. Der Einsatz von reduziertem und alkyliertem Lyc e 3 im Histamin Freisetzungstest könnte Aufschlüsse über die allergene Potenz der Präparation geben. Studien über die T-Zellreaktivität der reduzierten und alkylierten Form wurden bislang nicht durchgeführt.

Bonura et al. (2001) zerstörten unterschiedliche Disulphidbrücken des LTP aus dem Pollen des Mauer-Graskrautes (Par j 1) mittels Mutagenese. Bei zwei Mutanten (PjC, PjD) resultierte dies in einer Aufhebung der IgE-Bindungskapazität sowie der biologische Aktivität gemessen im SPT. Ihre T-Zell-Reaktivität blieb jedoch erhalten, was sie zu einem interessanten Instrument der Immuntherapie machen könnte.

## **6.4 Eignung der RNAi Methode zur stabilen Unterdrückung der Allergenexpression**

### **6.4.1 Auswahl der Tomate als Modell sowie der beiden Zielallergene**

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal gezeigt, dass durch die RNAi vermittelte Hemmung der Expression von ausgewählten Zielallergenen, die Allergenität der Früchte der Modellpflanze *in vitro* und *in vivo* eindrucksvoll verringert war.

Als Modellpflanze wurde die Tomate aus folgenden Gründen ausgewählt: die Kooperationspartner aus Erlangen hatten durch vorangegangene Studien umfangreiche Erfahrungen mit der Tomate als Modellpflanze. Für die Transformation der Pflanzen lagen etablierte Protokolle zu Beginn der Studie vor. Des Weiteren nimmt die Entwicklung der Tomate von der Kalluskultur zur Fruchtreife nur wenige Monate in Anspruch, die Verifikation des „gene silencing“ kann also mit reifen Früchten durchgeführt werden. Die Untersuchungen müssen nicht wie bei der Studie von Gillisen et al. (2005) mit Blättern der Pflanzen durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der Tomate als Modell war, dass aus einer anderen Studie Seren von Tomatenallergikern zur Verfügung standen, es mussten also keine neuen Allergiker zu Beginn der Studie mühsam rekrutiert werden. Des Weiteren waren bereits zwei Tomatenallergene (Lyc e 1 und Lyc e 2) in der Literatur beschrieben, von denen auch eines als Zielallergen ausgewählt wurde. Weiterhin war ein IgE-bindendes 9 kDa Protein der Tomate als potentiell LTP und zweites Zielallergen ebenfalls durch eigene Vorarbeiten bekannt.

Als Zielproteine für die RNAi-vermittelte Hemmung der Allergenexpression wurde das Tomatenprofilin (Lyc e 1) und das Lipid Transfer Protein der Tomate (Lyc e 3) ausgewählt. Lyc e 1 wurde in der Literatur als Minorallergen der Tomate beschrieben (Westphal et al., 2004), die klinische Relevanz von Profilinen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Wensing et al., 2002; Rodriguez-Perez et al., 2003). Die Sensibilisierung gegen das Profilin aus verschiedenen Nahrungsmitteln wurde bei einer

Subgruppe von Patienten mit Birkenpollinose und gleichzeitiger Nahrungsmittelallergie als klinisch irrelevant bezeichnet. Im Rahmen dieser Studie wurde nämlich ebenfalls eine IgE-Sensibilisierung auf Profilin von Kirsche (Pru av 4), Sellerie (Api g 4) und Birne (*Pyrus communis*) (Pyr c 4) in Birkenpollenprofilin (Bet v 2)-sensibilisierten Patienten ohne klinische Nahrungsmittelallergie im Immunoblot festgestellt (Scheurer et al., 2001b). Ballmer-Weber et al. (2002) stellten zusätzlich fest, dass ein Teil der Patienten mit Birkenpollinose aber ohne Kirschallergie (getestet in der offenen Provokation) im SPT und *in vitro* eine IgE-Sensibilisierung auf rPru av 4 zeigten. Bet v 2 (Birkenprofilin) spezifisches IgE dieser Patienten reagiert kreuz mit Epitopen des Pru av 4, ohne klinische Manifestation. Im Histamin Freisetzungstest mit Serum eines Kaki-Allergikers mit Profilinsensibilisierung war Bet v 2 nicht in der Lage, eine Histamin Freisetzung zu induzieren (Bolhaar et al., 2005a). Demgegenüber war Lyc e 1 im basophilen Histamin Freisetzungstest sehr wohl in der Lage, eine dosisabhängige Histamin Freisetzung zu induzieren (Westphal et al., 2004). Des Weiteren sind Profiline der Orange, Melone und Lychee als Hauptallergene bekannt (Vieths et al., 2002; Lopez-Torrejon, et al., 2005; Crespo et al., 2006). Crespo et al. (2006) fanden innerhalb der Orangenallergiker zahlreiche Patienten mit einer Monosensibilisierung auf das Profilin. Auch bei diesen Patienten war Orangenprofilin in der Lage, dosisabhängig Histamin aus basophilen Zellen freizusetzen. Obwohl eine Sensibilisierung auf Profilin bei einer Vielzahl von Patienten nicht gleichzeitig mit einer entsprechende Allergie verbunden ist, bestehen starke Hinweise darauf, dass in einer Subgruppe von Patienten Profilin für die Entstehung der Nahrungsmittelallergie und die klinischen Symptome verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde das Lyc e 1 als ein Zielallergen ausgewählt.

Lyc e 3 gehört als Lipid Transfer Protein zu einer Gruppe von Allergenen, die dafür bekannt sind, bei Sensibilisierung eine schwere Symptomatik hervorzurufen (Kap. 6.1.1). Aus diesem Grund erschien die Hemmung der Expression dieses Allergen als sinnvoll.

#### 6.4.2 Hemmung der Lyc e 1 Expression

Die Unterdrückung von Lyc e 1 wurde *in vitro* (Kap. 5.4.1.1) mit Hilfe eines Northern Blots (Abb. 5.36.A), Immunoblots (Abb. 5.36.B), ELISA-Inhibition (Abb. 5.37) und *in vivo* (Kap. 5.4.1.2) mittels Hauttests (Abb. 5.38) untersucht. Im Northern und Immunoblot konnte keine Lyc e 1 spezifische mRNA bzw. immunreaktives Lyc e 1 in den fünf untersuchten RNAi Linien nachgewiesen werden. Von diesen Linien wurde eine Linie (Linie 15) für die ELISA Inhibitionen ausgewählt. Im Vergleich zum Wild Typ war die IgE-Bindungskapazität der RNAi Linien um ein 10-faches geringer. Der Einfluss der verringerten IgE-Bindungskapazität auf die allergene Potenz wurde im Skin Prick Test mit drei Lyc e 1 sensibilisierten Patienten bestätigt. Hier induzierten die RNAi Linien bei einem Lyc e 1 monosensibilisierten Patienten eine Reduktion des Quaddeldurchmessers um 60-100% im Vergleich zu dem SPT mit dem Wild Typ. Bei den beiden anderen Patienten, die auch auf weitere Tomatenallergene sensibilisiert waren, war die Reduktion des Quaddeldurchmessers nicht so drastisch (15-25%). Die polysensibilisierten Patienten reagieren im Immunoblot auf einige Proteine im höhermolekularen Bereich (Le et al., 2006b). Die Hemmung der Expression eines Allergens hat hier

eine geringe Auswirkung auf die Gesamtreaktivität und somit möglicherweise auch auf die Allergenität der Tomatenfrucht für die Patienten.

Die systemische Reduktion von Lyc e 1 resultierte in einer Veränderung des Phänotyps im Vergleich zum Wild Typ. Es wurde ein zwergenhaftes Wachstum und eine verspätete Blüte beobachtet. Ein verringertes Wachstum wurde ebenfalls bei *A. thaliana* nach Hemmung der Profilinexpression festgestellt (Ramachandran et al., 2000). Dies zeigt ganz klar den Einfluss von Profilinen bei der Entwicklung der Pflanzen und der Blüte, wobei die Profilin reduzierte *A. thaliana* Pflanze eine frühere Blütezeit im Vergleich zum Wild Typ aufwies. Der Unterschied zwischen *L. esculentum* und *A. thaliana* in Bezug auf die Blütezeit könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Tomate eine Tag-neutrale (Blütenbildung unabhängig von der Belichtungszeit) und *A. thaliana* eine Langtagspflanze (lange Belichtung für die Blütenbildung notwendig) ist. Um dem zwergenhaften Wachstum der Lyc e 1 RNAi-Pflanzen entgegenzuwirken, wurden zwei unterschiedliche Strategien durchgeführt: zum einen sollte die Hemmung der Lyc e 1 Expression gezielt nur in den Tomatenfrüchten erfolgen, zum anderen sollte parallel zu der konstitutiven Hemmung der Lyc e 1 Expression durch ein bestimmtes Konstrukt gleichzeitig die Expression eines nicht allergenen Profilins zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion erfolgen. Die Tomatenpflanzen, bei denen die Hemmung der Lyc e 1 Expression ausschließlich in den Früchten erfolgte, zeigten keine phänotypischen Unterschiede verglichen mit dem Wild Typ. Jedoch war das Lyc e 1 „gene silencing“ ineffizient, da in den Früchten dieser Pflanzen mehr als 20% Lyc e 1 weiterhin exprimiert wurde verglichen mit der Expressionsrate des Wild Typs (Daten nicht gezeigt). Hefeprofilin wurde als Kandidat für die Expression eines hypoallergenen Profilins zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion der Profileine rekombinant hergestellt und charakterisiert. Zwei von 23 ausgewählten Seren zeigten eine sehr schwache IgE-Bindung an das rekombinante Hefeprofilin (Daten nicht gezeigt). Im basophilen Histamin Freisetzungstest induzierte es im Gegensatz zu Lyc e 1 keine Mediatorfreisetzung bei einem ausgewählten Serum. Auf Grund der unter 6.4.1 diskutierten Tatsache, dass manche Profileine zwar IgE binden, dies aber nicht unbedingt mit der Auslösung einer Symptomatik verbunden sein muss, wurde das Hefeprofilin für die Rekonstitution der physiologischen Funktion von Profilinen ausgewählt. IgE kann durch ein IgE-bindendes Epitop gebunden werden, Symptome werden jedoch durch eine Kreuzvernetzung von IgE ausgelöst (Kap. 1.1.1), also durch mindestens zwei IgE-bindende Epitope. Um wirklich sicherzugehen, dass Hefeprofilin keine Symptomatik auslöst, müssten die Patienten entweder oral oder im Hauttest mit Hefeprofilin provoziert werden. Nach der erfolgreichen Transformation der Pflanzen mit dem neuen Konstrukt, waren bei den Lyc e 1-RNAi, Hefeprofilin exprimierenden Pflanzen keine Unterschiede bei einem Vergleich mit dem Wild Typ festzustellen. Das heißt, Hefeprofilin hat die biologische Funktion von Lyc e 1 ersetzt. Im Rahmen von initialen Untersuchungen *in vitro* konnte eine geringere allergene Potenz der mit Hefeprofilin rekonstituierten Pflanzen festgestellt werden (Kap. 5.4.1.3). Ob diese Reduktion der allergenen Potenz ebenfalls durch *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden kann, ist bisher unklar. Ebenfalls ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt, ob die Hemmung der Lyc e 1 Expression mit gleichzeitiger Expression des Hefeprofilins stabil, also auf nachfolgende Generationen übertragbar, ist.

### 6.4.3 Hemmung der Lyc e 3 Expression

Die Suppression von Lyc e 3 erfolgte stabil und konnte bereits in einer Mutter- (T0) und Tochtergeneration (T1) untersucht werden (Le et al., 2006a; Lorenz et al., 2006). *In vitro* (Kap. 5.4.2.1) Northern Blots (Abb. 5.43.A), Immunoblots (Abb. 5.43.B), dosisabhängige ELISA Inhibitionen (nicht gezeigt), basophile Histamin Freisetzungstests (Abb. 5.45) und *in vivo* (Kap. 5.4.2.2) Hauttests (Abb. 5.46) wurden zur Verifizierung des „gene silencing“ herangezogen. Auch im Fall von Lyc e 3 konnte im Immunoblot mit allergenspezifischen Kaninchenseren kein Zielprotein in den RNAi Linien im Vergleich zum Wild Typ detektiert werden (Abb. 5.43). Bei ELISA Inhibitionen mit Lyc e 3 auf der Festphase und Extrakt von WT bzw. RNAi Früchten als Inhibitoren wurde mindestens eine 10-fache Reduktion der IgE-Bindungskapazität der RNAi Linien festgestellt (nicht gezeigt). Alle RNAi Linien waren nach Zugabe von entsprechend hohen Mengen an Inhibitor in der Lage, die IgE-Bindung an das Zielprotein auf der Festphase zu 100% zu inhibieren. Dies deutet auf eine nicht vollständige Elimination der Expression des Zielproteins hin. Unter den vorliegenden Bedingungen scheint die ELISA-Inhibition gegenüber dem Northern- und Immunoblot sensitiver zu sein. Inwieweit die Hemmung der Expression von Lyc e 3 einen Einfluss auf die biologische Aktivität bzw. allergene Potenz der RNAi Linien hat, wurde im basophilen Histamin Freisetzungstest (Abb. 5.45) und im Hauttest (Abb. 5.46) untersucht. Die *in vitro* und *in vivo* Tests zeigen eine starke Reduktion der allergenen Potenz. Unterschiede zwischen der T0 und T1 Generation konnten hier (Abb. 5.45), ebenso wie im Immunoblot (Abb. 5.44) nicht festgestellt werden, was auf eine stabile Hemmung hinweist. Die Hautreaktion im SPT war bei 4/5 Patienten signifikant reduziert bzw. aufgehoben. Bei 3 dieser 4 Patienten betrug der Quaddeldurchmesser weniger als 3 mm, was im Vergleich zur Negativkontrolle als negativ gewertet wird. Es wurde jedoch eine Restreaktivität der Lyc e 3 RNAi Pflanzen im basophilen Histamin Freisetzungstest und im Hauttest beobachtet. Dies führt zu der Annahme, dass die Expression von Lyc e 3 nicht vollständig gehemmt wurde. Durch einen kompetitiven ELISA mit dem Kaninchen-anti-Haselnuss-LTP Serum wurde versucht, die Reduktion des Lyc e 3 in den RNAi Linien im Vergleich zum WT zu verifizieren. Die Konzentration von Lyc e 3 im WT Extrakt betrug 0,4%, im Extrakt der Linie 8.26 0,02% bezogen auf das Frischgewicht (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Theorie einer starken, aber unvollständigen Reduktion mit einer Restreaktivität von ca. 5%.

Bei einem Patienten (CS-001) war der Unterschied *in vivo* nicht so auffällig, wie bei den anderen Patienten. Verglichen mit dem Wild Typ war der Quaddeldurchmesser nach Prick-zu-Prick mit den Lyc e 3 RNAi Pflanzen nur um 20% reduziert. Ursache hierfür könnte die IgE-Sensibilisierung dieses Patienten auf weitere Tomatenallergene sein, vor allem wenn deren Expression im Rahmen des „gene silencing“ eventuell hochreguliert wurde. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Western Blots mit Direktextrakt aus genau den Früchten hergestellt, die auch für den Prick-zu-Prick Test verwendet wurden. Nach der Immundetektion war zu erkennen, dass IgE aus Serum dieses Patienten nicht mit weiteren Tomatenproteinen reagierte (Lorenz et al., 2006). Die Expression zusätzlicher IgE-reaktiver Proteine in Folge der gentechnischen Veränderung wurde somit nicht festgestellt. Dies wird auch durch den parallelen Verlauf der Kurven zu einem gemeinsamen Maximum im dosisabhängigen Histamin Freisetzungstest unterstützt (Abb. 5.45). Auch Hermann et al. (2003) konnten nach dem „silencing“ des Sojaproteins Gly m Bd 30K keine Veränderung des Proteinpatterns mittels 2D GE

feststellen. Des Weiteren kann eine Überreaktion auf endogenes Histamin der Tomate bei diesem Patienten ausgeschlossen werden, da seine Reaktion auf Histamindihydrochlorid (Positivkontrolle) vergleichbar mit der Reaktion der anderen Patienten war. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Gehalt an endogenem Histamin bei den gentechnisch veränderten Tomaten und dem Wild Typ unterschiedlich war. Der Histamingehalt der gentechnisch veränderten Tomatenfrüchte (350-2100 µg/100 g Tomate) war ähnlichen dem des Wild Typs (700-1700 µg/100 g). Interessanterweise besitzt dieser Patient das meiste spezifische IgE gegen Tomate, gemessen im CAP. Verglichen mit den anderen 4 Patienten liegt die Konzentration an spezifischem IgE von Patient CS-001 ca. um das 3-30fache höher. Eventuell basiert der Unterschied zwischen dem *in vitro* und *in vivo* Test auf einer Diskrepanz der Konzentration des freien spezifischen IgEs im Serum und dem gebundenen auf Mastzellen. Freies IgE im Serum, welches beim Histamin Freisetzungstest relevant ist, besitzt eine kürzere Halbwertszeit als zellgebundenes IgE, welches bei dem SPT eine Rolle spielt (Kubo et al., 2003).

#### **6.4.4 Reduktion der allergenen Potenz pflanzlicher Nahrungsmittel durch die RNAi Methode - Potential und Einschränkungen**

Durch die RNAi-vermittelte Hemmung der Expression von Lyc e 1 bzw. Lyc e 3 konnte die allergene Potenz der Tomatenfrüchte signifikant verringert werden. Jedoch wurde weder die Expression von Lyc e 1 noch von Lyc e 3 zu 100% gehemmt. Die Proteinextrakte der RNAi Pflanzen waren sowohl im Histamin Freisetzungstest als auch im Hauttest in der Lage, eine Reaktion auszulösen. Dies geht einher mit den Ergebnissen von Gillisen et al. (2005), bei denen eine starke, aber auch nicht vollständige RNAi vermittelte Reduktion von Mal d 1 im Apfel erfolgte. Auch hier konnte im Immunoblot bei manchen Linien keine Bindung eines spezifischen Antikörpers mehr detektiert werden. Diese Linien zeigen jedoch ebenfalls eine Restreaktivität im Hauttest bei Apfelallergikern. Ob die Lyc e 1 und Lyc e 3 RNAi Pflanzen trotz einer starken Reduktion des Zielallergens noch in der Lage sind, allergische Symptome auszulösen, müsste in oralen Provokationstests ermittelt werden. Ein solches Experiment wurde bisher noch nicht mit gentechnisch veränderten Früchten durchgeführt. Des Weiteren sind für die Tomate bisher keine „threshold levels“ bekannt. Unter „threshold level“ versteht man die zugeführte Minimalmenge eines Nahrungsmittels, welche bei einem Patienten noch in der Lage ist, allergische Symptome hervorzurufen. Threshold level sind für jeden einzelnen Patienten spezifisch und bisher nur für Erdnuss, Kuhmilch, Soja und Hühnerei bekannt. Bindslev-Jensen et al. (2002) gehen davon aus, dass bei einem von einer Million Menschen noch 0.0007 mg Erdnussprotein, 0,005 mg Kuhmilchprotein, 0,0013 mg Sojaprotein oder 0,002 mg Hühnereiprotein eine Typ-I-Reaktion auslösen können. In einer Studie mit einem gereinigten modifizierten Apfelallergen (Mal d 1) konnte eine verringerte allergene Potenz im Hauttest durch einen DBPCFC mit zwei Patienten bestätigt werden (Bolhaar et al., 2005). Bei dieser Studie war im Hauttest die Reaktion auf das mutierte Mal d 1 im Durchschnitt um ein 10faches geringer als auf das unmutierte Protein. Im DBPCFC wurde ca. eine 10fach höhere Menge an mutiertem Protein toleriert. Übertragen auf die vorliegende Studie bedeutet dies, dass wahrscheinlich eine größere Menge an Tomatenfrüchten der RNAi Pflanzen im Vergleich zu dem Wild Typ verzehrt werden könnte.

Des Weiteren wäre interessant, ob die Expression von Lyc e 1 bzw. Lyc e 3 in speziellen Geweben der Tomatenfrucht komplett ausgeschaltet wurde und in anderen Geweben gar nicht, oder ob die Expression in allen Geweben der Tomatenfrucht gleich stark unterdrückt wird. Hierfür könnte die Immunogold Elektronenmikroskopie eingesetzt werden. Mit dieser Methode konnte bereits die Lokalisation der Pollenallergene Lol p 1 und Bet v 1 im Pollen erfolgen (Staff et al., 1990; Grote, 1991). Die Lokalisation der Zielallergene in Wildtyp und RNAi Pflanze könnte so miteinander verglichen werden.

Außerdem könnte mit isoformspezifischen Sonden im Northern Blot festgestellt werden, ob das posttranskriptionelle „gene silencing“ für alle LTP Isoformen erfolgte, nicht nur für Lyc e 3.1 und 3.2. Wurde nicht die Expression von allen Isoformen gehemmt, so wäre dies eine Möglichkeit, die verbleibende Restreaktivität zu erklären. Für die Detektion der beiden Lyc e 1 Isoformen im Northern Blot wurden spezifische Sonden hergestellt. Es konnte keine mRNA für eine der beiden Isoformen mehr in den Lyc e 1 RNAi Pflanzen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Kritikpunkt von Gegnern des „gene silencing“ ist die Hochregulation von kompensatorischen Proteinen, welche allergische Symptome auslösen könnten. Dies scheint nach initialen Untersuchungen eher unwahrscheinlich, da zum einen im Immunoblot keine zusätzlichen IgE-bindenden Proteine bei den RNAi Linien identifiziert werden konnten, zum anderen erzeugten die Extrakte der RNAi Linien und des WT im Histamin Freisetzungstest dieselbe maximale Histamin Freisetzung. Auch Herman et al. (2003) konnten keine Veränderungen des Proteinpatterns nach Hemmung der Expression des Sojaproteins Gly m Bd 30k feststellen.

#### **6.4.5 Kommerzielle Bedeutung der gentechnisch veränderten Tomatenfrüchte**

Die vorliegende Studie wurde als „proof of concept“ durchgeführt. Ein kommerzieller Vertrieb der Tomatenfrüchte war zu diesem Zeitpunkt nicht Gegenstand der Untersuchungen. Da die Tomate aus zahlreichen IgE-reaktiven Proteinen besteht und von diesen bereits drei Tomatenallergene identifiziert und charakterisiert sind, wäre die Herstellung einer Tomate mit einer stark reduzierten Allergenität mit der Hemmung der Expression von mindestens drei Zielproteinen verbunden. Basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen und dem Wissen über die Funktion der drei Tomatenallergene, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eine entsprechende Tomatenpflanze ein sehr eingeschränktes Wachstum hätte. Pflanzliche Lebensmittel, bei denen die Patienten hauptsächlich auf ein Allergen reagieren, welches im einfachsten Fall keine essentielle Funktion für die Pflanze besitzt, wären für die kommerzielle Verwendung besser geeignet. Prinzipiell kann die Methode des „gene silencing“ mittels RNAi bei jedem pflanzlichen Lebensmittel angewendet werden.

Der Erfolg einer kommerziellen Verwendung dieser Produkte wäre sehr stark von der Akzeptanz der Bevölkerung für gentechnisch veränderte Lebensmittel abhängig. Bei einer europaweiten Umfrage der Europäischen Kommission 1999/2000 beurteilten 43% der befragten Europäer (36% der Deutschen) die Anwendung der Gentechnik als nützlich ([www.transgen.de](http://www.transgen.de)). Bemängelt wurde jedoch, dass sich der Wissensstand der Verbraucher über die Gentechnik auf einem geringen Niveau befindet. Die Markteinführung eines mit Hilfe der RNAi-Technologie erzeugten pflanzlichen

Nahrungsmittels mit einer geringeren allergenen Potenz müsste also mit einer ausführlichen Aufklärung der Verbraucher verbunden sein.



## 7. Zusammenfassung

Dem Nahrungsmittelallergiker bietet sich zum jetzigen Zeitpunkt lediglich eine Möglichkeit für ein symptomfreies Leben, er muss die allergieauslösenden Nahrungsmittel aus seinem Speiseplan eliminieren. Neben der Entwicklung von immuntherapeutischen Maßnahmen wird unabhängig davon auf pflanzentechnologischer Seite die Reduktion der allergenen Potenz pflanzlicher Lebensmittel diskutiert, um die Lebensqualität von Nahrungsmittelallergikern zu verbessern.

Die Kooperation zwischen dem Institut für Biochemie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg und dem Paul-Ehrlich-Institut leistet einen Beitrag zu dieser Diskussion. Mit der Tomate als Modellpflanze wurde die allergene Potenz pflanzlicher Nahrungsmittel mit Hilfe der RNAi-Technologie reduziert. Diese Dissertation befasst sich mit der Identifikation und Charakterisierung der Zielproteine für das RNAi vermittelte „gene silencing“. Im Fokus der Untersuchungen steht das Lipid Transfer Protein der Tomate. Bei der Charakterisierung des Tomaten LTP wurden die IgE-bindenden Epitope sowie die Stabilität bei Pepsinverdau und bei der Verarbeitung zu tomatenhaltigen Produkten untersucht. Das Tomaten LTP besteht aus einer Multigenfamilie. Durch seine zweidimensionale Auftrennung konnten Informationen über das Vorkommen und Expressionsniveau möglicher Isoformen gewonnen werden. Die rekombinante Herstellung von zwei ausgewählten Isoformen ermöglichte einen Vergleich der IgE-Bindungs Kapazität und der biologischen Potenz. Die in Erlangen erzeugten gentechnisch veränderten Pflanzen wurden dem Paul-Ehrlich-Institut für eine Allergenitätsbewertung zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung von Erkenntnissen über die Effizienz der Methode und die Stabilität des „gene silencing“ über mehrere Generationen hinweg standen hier im Mittelpunkt.

Die Untersuchungen zur Prävalenz der IgE-Bindung an die drei bekannten Tomatenallergene Profilin (Lyc e 1), Invertase (Lyc e 2) und das LTP der Tomate, erfolgten bei einer Patientengruppe bestehend aus 70 Seren von Tomatenallergikern aus Deutschland (n=36) und Spanien (n=34). Als häufigstes Symptom nach dem Verzehr von Tomate wurde das OAS angegeben. Die Häufigkeit der IgE-Bindung an Lyc e 1 lag bei ca. 36%, für Lyc e 2 bei ca. 56% und für das LTP der Tomate bei ca. 24%. Bei der Unterscheidung der deutschen und spanischen Patientengruppe ergaben sich höhere Prävalenzen der IgE-Bindung an alle drei Allergene bei der spanischen Patientengruppe. Das Tomaten LTP wurde als Minorallergen Lyc e 3 in die IUIS Allergendatenbank aufgenommen.

Die Aufreinigung von nLyc e 3 erfolgte durch eine zweistufige Chromatographie aus Tomatenschalenextrakt, die Identifizierung als LTP mittels N-terminaler Sequenzierung sowie die Verifikation der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie. Biochemische Untersuchungen zeigten eine hohe Stabilität von Lyc e 3 in Tomatenschalenextrakt nach Pepsinverdau. Auch im Schalenextrakt von gekochten und in getrockneten Tomaten wurde immunreaktives Lyc e 3 identifiziert. Die Konformation des Lyc e 3 ist an der IgE- und IgG-Bindung maßgeblich beteiligt. Natürliche Lyc e 3 Isoformen konnten nicht über die zweidimensionale Gelelektrophorese identifiziert werden. Eine Sequenzierung des Proteins mittels nano-HPLC-nano ESI-MS/MS bestätigte die Präsenz ausschließlich einer dominanten Isoform im Tomatenschalenextrakt.

Bei der Klonierung und Expression zweier ausgewählter Lyc e 3 Isoformen (Lyc e 3.1 und Lyc e 3.2) wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Durch Überexpression eines Thioredoxininfusionsproteins

im Vektor pET-32a in *E.coli* Origami und die Abspaltung des Thioredoxinanhangs durch Thrombin konnte ausreichend Protein für die nachfolgenden Untersuchungen produziert werden. Jedoch zeigten die rekombinanten Proteine, vermutlich durch eine an dem Zielprotein verbleibende Anhangssequenz, bei der Messung der CD-Spektren einen Unterschied zu der natürlichen Präparation. Die Herstellung von rekombinanten Isoformen ohne Anhangssequenz mit einer Sekundärstruktur analog der natürlichen Präparation blieb erfolglos. Ein Vergleich der IgE-Bindungskapazität der rekombinanten Proteine, gemessen in der dosisabhängigen ELISA-Inhibition, konnte auf Grund ihrer identischen Sekundärstruktur durchgeführt werden. Da rLyc e 3.2 eine höhere IgE-Bindungskapazität zu besitzen scheint, wurde mit dieser Isoform eine dosisabhängige ELISA-Inhibition mit nLyc e 3 trotz unterschiedlicher Sekundärstruktur durchgeführt. Die IgE-Bindungskapazitäten sind für die herangezogenen Seren sehr individuell. Zur Bestimmung der allergenen Potenz der rekombinanten und natürlichen Präparationen diente der basophile Histamin Freisetzungstest. Die natürliche Präparation besitzt tendenziell die stärkste allergene Potenz. Die allergene Potenz der rekombinanten Isoformen ist jedoch wie die IgE-Bindungskapazität für jeden Patienten sehr spezifisch.

Im Rahmen der Analyse der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden WT und RNAi-Pflanzen mittels Immunoblot, dosisabhängiger ELISA-Inhibition und im basophilen Histamin Freisetzungstest untersucht. Im Immunoblot konnte keine Bindung von allergenspezifischen Antikörpern bei den RNAi-Pflanzen im Vergleich zum WT festgestellt werden. Bei der dosisabhängigen ELISA-Inhibition mit Lyc e 1 oder Lyc e 3 auf der Festphase war die IgE-Bindungskapazität der RNAi Pflanzen um ein zehnfaches (Lyc e 1-RNAi) bzw. ein zehn- bis hundertfaches (Lyc e 3-RNAi) reduziert. Eine Bestätigung der Ergebnisse mit den Lyc e 3-RNAi Pflanzen lieferten ein basophiler Histamin Freisetzungstest und ein *in vivo* Hauttest. Durch die zusätzliche Analyse von Tochtergenerationen wurde deutlich, dass die Reduktion der Allergenexpression stabil war.

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die RNAi-Technologie eine geeignete Methode ist, um die Expression von Allergenen gezielt und stabil zu unterdrücken. Sie könnte eine Möglichkeit darstellen, die allergene Potenz von Nahrungsmitteln zu verringern und die Lebensqualität von Nahrungsmittelallergikern zu verbessern.

---

## 8. Literaturverzeichnis

- AALBERSE RC, KOSHTE V, CLEMENS JG (1981): Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol*, 68(5):356-64
- AHRAZEM O, IBANEZ MD, LOPEZ-TORREJON G, SANCHEZ-MONGE R, SASTRE J, LOMBARDELO M, ET AL. (2005): Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *Int Arch Allergy Immunol*, 137(3):201-10.
- ALLAN G (1990): Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Sequencing of Proteins and Peptides. Elsevier, Amsterdam, S.58
- ASERO R (1998): Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients. *Clin Exp Allergy*, 28(11):1368-73
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIER MF, CIURANA CL, ET AL. (2000): Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol*, 122(1):20-32
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIER MF, CIURANA CL, ET AL. (2001): Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol*, 124(1-3):67-9
- ASHER MI, MONTEFORT S, BJORKSTEN B, LAI CK, STRACHAN DP, WEILAND SK, ET AL. (2006): Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *26;368(9537):733-43*
- ASTURIAS JA, GOMEZ-BAYON N, ESEVERRI JL, MARTINEZ A (2003): Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes. *Clin Exp Allergy*, 33(4):518-24
- BALLMER-WEBER BK, WUTHRICH B, WANGORSCH A, FOTISCH K, ALTMANN F, VIETHS S (2001): Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2):301-7
- BALLMER-WEBER BK (2002): Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy*, 57(10):873-5
- BALLMER-WEBER BK, SCHEURER S, FRITSCHKE P, ENRIQUE E, CISTERO-BAHIMA A, HAASE T, ET AL. (2002): Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 110(1):167-73
- BALLMER-WEBER BK, WANGORSCH A, BOHLE B, KAUL S, KUNDIG T, FÖTISCH K, ET AL. (2005): 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*, 35(7):970-8
- BEAULCOMBE DC (1999): Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol*, 2:109-13
- BEEZHOLD DH, SUSSMANN GL, LISS GM, CHANG NS (1996): Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clin Exp Allergy*, 26(4):416-22
- BERRENS L (1996): Neoallergens in heated pecan nut: products of Maillard-type degradation? *Allergy*, 51:277-8
- BESLER M, STEINHART H, PASCHKE A (2001): Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 756:207-28
- BEYER K, MORROW E, LI XM, BARDINA L, BANNON GA, BURKS W, ET AL., (2001): Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*, 107:1077-81
- BHALLA PL, SWOBODA I, SINGH MB (1999): Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 28;96(20):11676-80

- BINDSLEV-JENSEN C, VIBITS A, STAHL SKOV P, WEEKE B (1991): Oral allergy syndrome: the effect of astemizole. *Allergy*, 46(8):610-3
- BINDSLEV-JENSEN C, BRIGGS D, OSTERBALLE M (2002): Can we determine a threshold level for allergenic foods by statistical analysis of published data in the literature? *Allergy*, 57:741-6
- BINDSLEV-JENSEN C, BALLMER-WEBER BK, BENGTSSON U, BLANCO C, EBNER C, HOURIHANE J, ET AL. (2004): Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods-position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*, 59(7):690-7 Review
- BJÖRKSTEN F, HALMEPURO L, HANNUKSELA M, LAHTI A (1980): Extraction and Properties of Apple Allergens. *Allergy*, 35:671-7
- BLANCO C (2003): Latex-fruit syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3(1):47-53
- BLEUMINK E. (1970): Food allergy. The chemical nature of the substances eliciting symptoms. *World Rev Nutr Diet*, 12:505-70 Review
- BLEUMINK E, BERRENS L, YOUNG E (1966): Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. I. Isolation and identification of the allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 30(2):132-45
- BOLHAAR ST, TIEMESSEN MM, ZUIDMEER L, VAN LEEUWEN A, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, BRUIJNZEEL-KOOMEN CA ET AL. (2004): Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clin Exp Allergy*, 34(5):761-9
- BOLHAAR ST, VAN REE R, MA Y, BRUIJNZEEL-KOOMEN CA, VIETHS S, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K et al. (2005a): Severe allergy to sharon fruit caused by birch pollen. *Int Arch Allergy Immunol*, 136(1):45-52
- BOLHAAR ST, ZUIDMEER L, MA Y, FERREIRA F, BRUIJNZEEL-KOOMEN CA, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, et al. (2005b): 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*, 35(12):1638-44
- BONURA A, AMOROSO S, LOCOROTONDO G, DI FELICE G, TINGHINO R, GERACI D ET AL. (2001): Hypoallergenic variants of the Parietaria judaica major allergen Par j 1: a member of the non-specific lipid transfer protein plant family. *Int Arch Allergy Immunol*, 126(1):32-40
- BRADFORD M (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54
- BREITENEDER H, SOWKA S, WAGNER S, KREBITZ M, HAFNER C, KINACIYAN T, ET AL. (1999): Cloning of the patatin-like latex allergen Hev b 7, its expression in the yeast *Pichia pastoris* and its immunological characterization. *Int Arch Allergy Immunol*, 118(2-4):309-10
- BREITENEDER H, RADAUER C (2004): A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5):821-30 Review
- BRENNA O, POMPEI C, ORTOLANI C, PRAVETTONI V, FARIOLI L, PASTORELLO EA (2000): Technological process to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem*, 48:493-7
- BURKS W, BALLMER-WEBER BK (2006): Food Allergy. *Mol Nutr Food Res*, 50(7):595-603 Review
- CHEN S, HOFIUS D, SONNEWALD U, BORNKE F (2003): Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant J*, 36(5):731-40
- CHEN Z, POSCH A, CREMER R, RAULF-HEIMSOTH M, BAUR X (1998): Identification of hevein (Hev b 6.02) in *Hevea latex* as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 102(3):476-81

- CRESPO JF, RETZEK M, FOETISCH K, SIERRA-MAESTRO E, CID-SANCHEZ AB, PASCUAL CY, ET AL. (2006): Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (*Citrus sinensis*) fruits. *Mol Nutr Food Res*, 50(3):282-90
- DAMEN V, ADLEY C, BRINKMAN F, HAMMELEV D, JOHANSSON M, VAN STRYDONK M, ET AL. (2000): European Initiative for Biotechnology Education. Einheit 9: Transgene Pflanzen
- DAVIS PJ, WILLIAMS SC (1998): Protein modification by thermal processing. *Allergy*, 53:102-5
- DIAZ-PERALES A, LOMBARDELO M, SANCHEZ-MONGE R, GARCIA-SELLES FJ, PERNAS M, FERNANDEZ-RIVAS M, ET AL. (2000): Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy*, 30(10):1403-10
- DIAZ-PERALES A, COLLADA C, BLANCO C, SANCHEZ-MONGE R, CARRILLO T, ARAGONCILLO C, ET AL. (1999): Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol*, 1999 Sep;104(3 Pt 1):681-7
- DODO H, KONAN K, VIQUEZ O (2005): A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005 Jan;5(1):67-73 Review
- DREBORG S (1989): Skin test for diagnosis of IgE-mediated allergy. *Allergy*, 44(suppl10):31-7
- DREBORG S (1997): The optimum concentration for skin prick testing. *Allergy*, 52(11):1142-3
- DUFFORT OA, POLO F, LOMBARDELO M, DIAZ-PERALES A, SANCHEZ-MONGE R, GARCIA-CASADO G, ET AL. (2002): Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem*, 18;50(26):7738-41
- ELBASHIR SM, LENDECKEL W, TUSCHL T (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes dev*, 15:188-200
- ENRIQUE E, PINEDA F, MALEK T, BARTRA J, BASAGANA M, TELLA R, ET AL., (2005): Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol*, 116:1073-9.
- FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M (1999): Peels of *Rosaceae* fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy*, 29(9):1239-47
- FERNANDEZ-RIVAS M, GONZALEZ-MANCEBO E, RODRIGUEZ-PEREZ R, BENITO C, SANCHEZ-MONGE R, SALCEDO G, ET AL. (2003): Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol*, 112(4):789-95
- FERREIRA F, HIRTENLEHNER K, JILEK A, GODNIK-CVAR J, BREITENEDER H, GRIMM R, ET AL. (1996): Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J Exp Med*, 1;183(2):599-609
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-11
- FOETISCH K, SON DY, ALTMANN F, AULEPP H, CONTI A, HAUSTEIN D, ET AL., (2001): Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients. *Eur Food Res Technol*, 213:259-66
- FOETISCH K, WESTPHAL S, LAUER I, RETZEK M, ALTMANN F, KOLARICH D, ET AL. (2003): Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*, 111(4):889-96
- GARCIA-CASADO G, CRESPO JF, RODRIGUEZ J, SALCEDO G (2001): Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4):647-9

- GARCIA-CASADO G, PACIOS LF, DIAZ-PERALES A, SANCHEZ-MONGE R, LOMBARDEO M, GARCIA-SELLES FJ, ET AL. (2003): Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol*, 112(3):599-605
- GARCIA-OLMEDO F, MOLINA A, SEGURA A, MORENO M (1995): The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol*, 3(2):72-4
- GILISSEN LJ, BOLHAAR ST, MATOS CI, ROUWENDAL GJ, BOONE MJ, KRENS FA, ET AL. (2005): Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol*, 115(2):364-9.
- GORG A, WEISS W, DUNN MJ (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12):3665-85 Review
- GROTE M (1991): Immunogold electron microscopy of soluble proteins: localization of Bet v I major allergen in ultra-thin sections of birch pollen after anhydrous fixation techniques. *J Histochem Cytochem*, 39(10):1395-401
- HANSEN KS, BALLMER-WEBER BK, LUTTKOPF D, SKOV PS, WUTHRICH B, BINDSLEV-JENSEN C ET AL. (2003): Roasted hazelnuts—allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy*, 58:132–8
- HANSEN KS, KHINICHI MS, SKOV PS, BINDSLEV-JENSEN C, POULSEN LK, MALLING HJ (2004): Food allergy to apple and specific immunotherapy with birch pollen. *Mol Nutr Food Res*, 48(6):441-8
- HEINRICH J, RICHTER K, FRYE C, MEYER I, WOLKE G, WJST M, ET AL. (2002): European Community Respiratory Health Survey in Adults (ECRHS). *Pneumologie*, 56(5):297-303
- HELSPER JP, GILISSEN LJ, VAN REE R, AMERICA AH, CORDEWENER JH, BOSCH D (2002): Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a method to study the actual expression of allergen isoforms identified by PCR cloning. *J Allergy Clin Immunol*, 110(1):131-8
- HENZGEN M, VIETHS S, REESE I, ERDMANN S, FUCHS T, JÄGER L ET AL. (2005): Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen. *Allergo J*, 14:48-59
- HERMAN EM, HELM RM, JUNG R, KINNEY AJ (2003): Gene modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol*, 132:36-43
- HERRMANN D, HENZGEN M, FRANK E, RUDESCHKO O, JAGER L (1995): Effect of hyposensitization for tree pollinosis on associated apple allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 5:259-67
- HEUKESHOVEN J, DERNICK R (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9:28-32
- HOEFGEN R, WILLMITZER L (1990): Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum* L). *Plant Sci*, 66:221-30
- JÄGER, WÜTHRICH (2002): Nahrungsmittelallergien und –intoleranzen, 2. überarbeitete Auflage, Urban Fischer Verlag
- JANEWAY C (2002): Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin*, 5. Auflage
- JANKIEWICZ A, AULEPP H, BALTES W, BOGL KW, DEHNE LI, ZUBERBIER T, ET AL. (1996): Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen-sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol*, 111(3):268-78
- JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL WB ET AL., (1997): Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *J Sci Food Agric*, 75:359–70
- JOHANSSON SG, BIEBER T, DAHL R, FRIEDMANN PS, LANIER BQ, LOCKEY RF, ET AL. (2004): Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5):832-6

- KADER JC (2002): Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins. *Plant Sci*, 2:66-70
- KATO T, KATAYAMA E, MATSUBARA S, OMI Y, MATSUDA T (2000): Release of allergic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. *J Agric Food Chem*, 48: 3124-3129.
- KHYSE-ANDERSEN J (1984): Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without a buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrylamid gels to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10:203-9
- KIM KT, HUSSAIN H (1999): Prevalence of food allergy in 137 latex-allergic patients. *Allergy Asthma Proc*, 20(2):95-7
- KITTA K, OHNISHI-KAMEYAMA M, MORIYAMA T, OGAWA T, KAWAMOTO S (2006): Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem*, 15;351(2):290-7
- KINACIYAN T, JAHN-SCHMID B, RADAKOVICS A, ZWOLFER B, SCHREIBER C, FRANCIS JN ET AL. (2007): Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune responses to the Bet v 1 homolog Mal d 1. *J Allergy Clin Immunol*, [Epub ahead of print]
- KLEINE-BUDDE I, DE HEER PG, AN DER ZEE JS, AALBERSE RC (2001): The stripped basophil histamin release bioassay as a tool for the detection of allergen-specific IgE in serum. *Int Arch Allergy Immunol*, 126:277-85
- KLEINE-TEBBE J, FUCHS T, LEPP U, NIGGEMANN B, SALOGA J, VIELUF I ET AL. (2001): In-vitro-Diagnostik von Nahrungsmittel-Allergien. *Allergo J*, 10:333-9
- KONDO Y, URISU A, TOKUDA R (2001): Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol*, 126(4):294-9
- KUBO S, NAKAYAMA T, MATSUOKA K, YONEKAWA H, KARASUYAMA H (2003): Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J Immunol*, 170:775-80
- LAEMMLI UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-5
- LAKE FR, WARD LD, SIMPSON RJ, THOMPSON PJ, STEWART GA (1991): Allergenicity and physicochemical characterization of house dust mite derived amylase. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94(1-4):357-8
- LEHMANN K, HOFFMANN S, NEUDECKER P, SUHR M, BECKER WM, ROSCH P (2003): High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr Purif*, 31(2):250-9
- LEHMANN K, SCHWEIMER K, REESE G, RANDOW S, SUHR M, BECKER W-M ET AL., (2006): Structure and stability of 2S-albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochem J*, 395:463-72
- LEUNG DY, SAMPSON HA, YUNGINGER JW, BURKS AW, SCHNEIDER LC, WORTEL CH, ET AL. (2003): Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med*, 13;348(11):986-93
- LI XM, ZHANG TF, HUANG CK, SRIVASTAVA K, TEPER AA, ZHANG L, ET AL. (2001): Food Allergy Herbal Formula-1 (FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4):639-46
- LI XM, SRIVASTAVA K, GRISHIN A, HUANG CK, SCHOFIELD B, BURKS W, ET AL. (2003): Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 112(1):159-67
- LIACOURAS CA, WENNER WJ, BROWN K, RUCHELLI E (1998): Primary eosinophilic esophagitis in children: successful treatment with oral corticosteroids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 26(4):380-5

- LING H-Q, KISELEIT D, GANAL MW (1998): Effect of ticarcillin/potassium clavunilate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Rep*, 17:843-7
- LLEONART R, CISTERO A, CARREIRA J, BATISTA A, MOSCOSO DEL PRADO J (1992): Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Ann Allergy*, 69(2):128-30
- LE LQ, LORENZ Y, SCHEURER S, FÖTISCH K, ENRIQUE E, BARTRA J ET AL., (2006a): Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnology Journal*, 4:231-42
- LE LQ, MAHLER V, LORENZ Y, SCHEURER S, BIEMELT S, VIETHS S, ET AL. (2006b): Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *J Allergy Clin Immunol*, 118(5):1176-83
- LEUNG DYM, SAMPSON HA, YUNGINGER JW, BURKS AW, SCHNEIDER L, WORTEL CH ET AL., (2003): Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med*, 348:986-93
- LOMBARDERO M, GARCIA-SELLES FJ, POLO F, JIMENO L, CHAMORRO MJ, GARCIA-CASADO G (2004): Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy*, 34(9):1415-21
- LOPEZ-TORREJON G, CRESPO JF, SANCHEZ-MONGE R, SANCHEZ-JIMENEZ M, ALVAREZ J, RODRIGUEZ J, ET AL. (2005): Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Exp Allergy*, 35(8):1065-72
- LORENZ Y, ENRIQUE E, LEQUYNH L, FOTISCH K, RETZEK M, BIEMELT S, ET AL. (2006): Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *J Allergy Clin Immunol*, 118(3):711-8
- LUTTKOPF D, BALLMER-WEBER BK, WUTHRICH B, VIETHS S (2000): Celery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol*, 106(2):390-9
- LUTTKOPF D, MULLER U, SKOV PS, BALLMER-WEBER BK, WUTHRICH B, SKAMSTRUP HANSEN K, ET AL. (2002): Comparison of four variants of a major allergen in hazelnut (*Corylus avellana*) Cor a 1.04 with the major hazel pollen allergen Cor a 1.01. *Mol Immunol*, 38(7):515-25
- MALEKI SJ, CHUNG SY, CHAMPAGNE ET, RAUFMAN JP (2000): The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 106(4):763-8
- MARI A, IACOVACCI P, AFFERNI C, BARLETTA B, TINGHINO R, DI FELICE G, ET AL. (1999): Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 103(6):1005-11
- MATSUMURA M, MATTHEWS BW (1989): Control of enzyme activity by an engineered disulphide bond. *Science*, 243:792-4
- MCCORMICK S, TWELL D, VANCANNEYT G, YAMAGUCHI J (1991): Molecular analysis of gene regulation and function during male gametophyte development. *Symp Soc Exp Biol*, 45:229-44
- MIKKOLA JH, ALENIUS H, KALKKINEN N, TURJANMAA K, PALOSUO T, REUNALA T (1998): Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol*, 102(6 Pt 1):1005-12
- MOLINA A, GARCIA-OLMEDO F (1997): Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J*, 12(3):669-75
- MONDOULET L, PATY E, DRUMARE MF, AH-LEUNG S, SCHEINMANN P, WILLEMOT RM ET AL. (2005): Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *J Agric Food Chem* 53(11):4547-53



- MYGIND N, DAHL R, PEDERSEN S, THESTRUP-PEDERSEN K (2000): Allergologie Textbuch und Farbatlas, Bechermünz-Verlag, Augsburg
- NAKAMURA R, MATSUDA T (1996): Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 60(8):1215-21. Review
- NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R (1990): Introduction of chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell*, 2:279-89
- NIGGEMANN B, ERDMANN S, FUCHS T, HENZGEN M, JÄGER L, KLEINE-TEBBE J ET AL. (2006): Standardisierung von oralen Provokationstests bei Nahrungsmittelallergien. *Allergo J*, 15:262-70
- ORTOLANI C, ISPANO M, PASTORELLO EA, ANSALONI R, MAGRI GC (1989): Comparison of results of skin prick test (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 83:683-90
- OSTERBALLE M, HANSEN TK, MORTZ CG, BINDSLEV-JENSEN C (2005): The clinical relevance of sensitization to pollen-related fruits and vegetables in unselected pollen-sensitized adults. *Allergy*, 60(2):218-25
- PALACIN A, CUMPLIDO J, FIGUEROA J, AHRAZEM O, SANCHEZ-MONGE R, CARRILLO T, ET AL. (2006): Cabbage lipid transfer protein Bra o 3 is a major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens. *J Allergy Clin Immunol*, 117(6):1423-9
- PARK CJ, SHIN R, PARK JM, LEE GJ, YOU JS, PAK KH (2002): Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol*, 1;48(3):243-54
- PASTORELLO EA, ROBINO AM (2004): Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol Nutr Food Res*, 48(5):356-62. Review
- PASTORELLO EA, POMPEI C, PRAVETTONI V, FARIOLI L, CALAMARI AM, SCIBILIA J, ET AL. (2003): Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol*, 112(4):775-83
- PASTORELLO EA, VIETHS S, PRAVETTONI V, FARIOLI L, TRAMBAIOLI C, FORTUNATO D, ET AL. (2002): Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol*, 109(3):563-70
- PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ORTOLANI C, ISPANO M, MONZA M, ET AL. (1999): The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 1):520-6
- PASTORELLO EA, PRAVETTONI V, ISPANO M, FARIOLI L, ANSALONI R, ROTONDO F ET AL. (1996): Identification of the allergenic components of kiwi fruit and evaluation of their cross-reactivity with timothy and birch pollens. *J Allergy Clin Immunol*, 98:601-610
- PASTORELLO EA, ORTOLANI C, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ISPANO M, BORGA A, ET AL. (1994): Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J Allergy Clin Immunol*, 94(4):699-707
- PERKINS DN, PAPPIN DJ, CREASY DM, COTTRELL JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551-67
- PETERSEN A, VIETHS S, AULEPP H, SCHLAAK M, BECKER WM (1996): Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 98(4):805-15
- PIRQUET C VON (1906): Allergie. *Münch Med Wochenschr*, 53: 1457-8

- PORATH J, CARLSSON J, OLSSON I, BELFRAGE G (1975): Metal chelat affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258:598-9
- PRIEM B, GITTI R, BUSH CA, GROSS KC (1993): Structure of ten free N-glycans in ripening tomato fruit. Arabinose is a constituent of a plant N-glycan. *Plant Physiol*, 102(2):445-58
- PRINZ WA, ASLUND F, HOLMGREN A, BECKWITH J (1997): The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J Biol Chem*, 272(25):15661-7
- PRUSSIN C, METCALFE DD (2006): IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *JACI*, 117:450-6
- RAMACHANDRAN S, CHRISTENSEN HE, ISHIMARU Y, DONG CH, CHAO-MING W, CLEARY AL, ET AL. (2000): Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 124(4):1637-47
- REINDL J, RIHS HP, SCHEURER S, WANGORSCH A, HAUSTEIN D, VIETHS S (2002): IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *Int Arch Allergy Immunol*, 128(2):105-14.
- REUTER A, FORTUNATO D, GAROFFO LP, NAPOLITANO L, SCHEURER S, GIUFFRIDA MG, ET AL. (2005): Novel isoforms of Pru av 1 with diverging immunoglobulin E binding properties identified by a synergistic combination of molecular biology and proteomics. *Proteomics*, 5(1):282-9
- REUTER A, LIDHOLM J, ANDERSSON K, OSTLING J, LUNDBERG M, SCHEURER S, ET AL. (2006): A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy*, 36(6):815-23.
- RIHS HP, CHEN Z, RUEFF F, PETERSEN A, ROZYNEK P, HEIMANN H ET AL. (1999): IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J Allergy Clin Immunol*, 104:1293-1301.
- RING J, FUCHS T, SCHULTZE-WERNINGHAUS G (2004): Weißbuch Allergie in Deutschland (2. aktualisierte Auflage), Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co KG München
- RODRIGO I, VERA P, FRANK R, CONEJERO V (1991): Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Mol Biol*, 16(5):931-4
- RODRIGUEZ-PEREZ R, CRESPO JF, RODRIGUEZ J, SALCEDO G (2003): Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 111(3):634-9
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York
- SAMPSON HA (1999): Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 103(5 Pt 1):717-28. Review
- SAMPSON HA (2004): Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5):805-19 Review
- SANCHEZ-MONGE R, LOMBARDELO M, GARCIA-SELLES FJ, BARBER D, SALCEDO G (1999): Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 1):514-9
- SANCHO AI, RIGBY NM, ZUIDMEER L, ASERO R, MISTRELLO G, AMATO S, ET AL. (2005): The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy*, 60(10):1262-8
- SAN MIGUEL-MONCIN M, KRAIL M, SCHEURER S, ENRIQUE E, ALONSO R, CONTI A, ET AL. (2003): Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy*, 58(6):511-7.

- SARAVANAN RS, ROSE JK (2004): A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9):2522-32
- SCHÄGGER H, VON JAGOW G (1987): Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton. *Anal Biochem*, 166:368-79
- SCHEURER S, LAUER I, FOETISCH K, SAN MIGUEL MONCIN M, RETZEK M, HARTZ C, ET AL. (2004): Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol*, 114(4):900-7
- SCHEURER S, PASTORELLO EA, WANGORSCH A, KASTNER M, HAUSTEIN D, VIETHS S (2001a): 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*, 107(4):724-31
- SCHEURER S, WANGORSCH A, NERKAMP J, SKOV PS, BALLMER-WEBER B, WÜTHRICH B ET AL. (2001b): Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins of pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4), and celery (Api g 4) with birch pollenprofilin (Bet v 2). *J Chromatogr. B.*, 756:315-25
- SCHEURER S, METZNER K, HAUSTEIN D, VIETHS S (1997): Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol*, 34(8-9):619-29
- SCHLUTER K, JOCKUSCH BM, ROTHKEGEL M (1997): Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 27;1359(2):97-109 Review
- SCHMIDT-WEBER CB, BLASER K (2006): Immunological mechanisms of specific allergen immunotherapy. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 5(1):15-21. Review
- SCHOCKER F, LUTTKOPF D, SCHEURER S, PETERSEN A, CISTERO-BAHIMA A, ENRIQUE E, ET AL. (2004): Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 113(1):141-7
- SHIN DS, COMPADRE CM, MALEKI SJ, KOPPER RA, SAMPSON H, HUANG SK, ET AL. (1998): Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem*, 29;273(22):13753-9
- SICHERER SH, SAMPSON HA (2006): Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2 Suppl Mini-Primer):S470-5 Review.
- SLATER A, MAUNDERS MJ, EDWARDS K, SCHUCH W, GRIERSON D (1985): Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening related proteins. *Plant Mol Biol*, 5:137-47
- SON DY, SCHEURER S, HOFFMANN A, HAUSTEIN D, VIETHS S (1999): 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*, 38(4):201-15
- SREE VIDYA CS, MANOHARAN M, SITA L (1999): Cloning and characterization of salicylic acid-induced, intracellular pathogenesis-related gene from tomato. *J Biosci*, 24(3):287-93
- STAINES N, BROSTOFF J, JAMES K (1999): Immunologisches Grundwissen (3.Auflage), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin
- STAFF IA, TAYLOR PE, SMITH P, SINGH MB, KNOX RB (1990): Cellular localization of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. *Histochem J*, 22(5):276-90
- SUSKIW J (2002): Researchers develop first hypoallergenic soybeans. *Agricultural Research*, 50(109): 16-7
- TADA Y, NAKASE M, ADACHI T, NAKAMURA R, SHIMADA H, TAKAHASHI M, ET AL. (1996): Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett*, 12;391(3):341-5

- TEILTELBAUM JF, FOX VL, TWAROG FJ, NURKO S, ANTONIOLOI D, GLEICH G, ET AL., (2002): Eosinophilic esophagitis in children: immunopathological analysis and response to fluticasone propionate. *Gastroenterology*, 122:1216-25
- VADAS P, PERELMAN B (2003): Activated charcoal forms non-IgE binding complexes with peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 112(1):175-9
- VALENTA R, DUCHENE M, EBNER C, VALENT P, SILLABER C, DEVILLER P, ET AL. (1992): Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med*, 175(2):377-85
- VAN REE R (2002): Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*, 129(3):189-97 Review
- VAN REE R, FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M, VAN WIJNGAARDEN M, AALBERSE RC (1995): Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol*, 95(3):726-34
- VANEK-KREBITZ M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, LAIMER DA CAMARA MACHADO M, SUSANI M, EBNER C, KRAFT D, ET AL. (1995): Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen *Biochem Biophys Res Commun*, 214(2):538-51
- VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN S, AULEPP H (1992): Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch Lebensm Rdsch*, 88:239-43, 273-9
- VIETHS S, SCHEURER S, BALLMER-WEBER B (2002): Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*, 964:47-68 Review
- WAGNER S, BREITENEDER H (2002): The latex-fruit syndrome. *Biochem Soc Trans*, 30(Pt 6):935-40 Review.
- WEANGSRIPANAVAL T, NOMURA N, MORIYAMA T, OHTA N, OGAWA T (2003) : Identification of suberization-associated anionic peroxidase as a possible allergenic protein from tomato. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(6):1299-304.
- WESTPHAL S, KEMPF W, FOETISCH K, RETZEK M, VIETHS S, SCHEURER S (2004): Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Allergy*, 59(5):526-32
- WESTPHAL S, KOLARICH D, FOETISCH K, LAUER I, ALTMANN F, CONTI A, ET AL. (2003): Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (beta-fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *Eur J Biochem*, 270(6):1327-37
- WENSING M, AKKERDAAS JH, VAN LEEUWEN WA, STAPEL SO, BRUIJNZEEL-KOOMEN CA, AALBERSE RC et al. (2002): IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol*, 110(3):435-42
- WILLERROIDER M, FUCHS H, BALLMER-WEBER BK, FOCKE M, SUSANI M, THALHAMER J, ET AL. (2003): Cloning and molecular and immunological characterisation of two new food allergens, Cap a 2 and Lyc e 1, profilins from bell pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Int Arch Allergy Immunol*, 131(4):245-55
- ZELNY R, ALTMANN F, PRAZNIK W (1999): Structural characterization of the N-linked oligosaccharides from tomato fruit. *Phytochemistry*, 51(2):199-210
- ZOR T, SELIGER Z (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236:302-8
- ZUIDMEER L, VAN LEEUWEN WA, BUDDE IK, CORNELISSEN J, BULDER I, RAFALSKA I, ET AL. (2005): Lipid transfer proteins from fruit: cloning, expression and quantification. *Int Arch Allergy Immunol*, 137(4):273-81

ZUIDMEER L, SALENTIJN E, RIVAS MF, MANCEBO EG, ASERO R, MATOS CI, ET AL. (2006): The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy*, 36(5):666-75

---

## 9. Lebenslauf

Geburtsdatum /-ort 01.04.1978 in Hürth, NRW  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### Berufserfahrung

April 2003-Oktober 2006 *Paul-Ehrlich-Institut, Langen  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
in der Abteilung Allergologie*

November 2002-April 2003 *Praxis für Ernährungsberatung Christof Meinhold,  
Köln  
Praktikantin*

### Ausbildung

Oktober 1997-Februar 2003 *Studium der Oecotrophologie an der  
Universität Bonn  
Abschluss: Dipl. oec. troph.*

1994-1997 *Gymnasium der Stadt Kerpen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife*

1988-1994 *Mädchen-Realschule „Mater-Salvatoris“  
Abschluss: Fachoberschulreife*

### Auszeichnungen/Preise

2007 *Max-Rubner-Preis der Deutschen Gesellschaft für  
Ernährung e. V.*

2005 *Weltallergiekongress und Kongress des EAACI  
Junior Poster Preis in der Kategorie „Food Allergy“*

## 10. Publikationen und Präsentationen der Ergebnisse

L. LeQuynh, V. Mahler, Y. Lorenz, S. Scheurer, S. Biemelt, S. Vieths, U. Sonnewald (2006): Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1 silenced transgenic tomato plants. *J Allergy Clin Immunol*, 118(5):1176-83

Y. Lorenz, E. Enrique, L. LeQuynh, K. Fötisch, M. Retzek, S. Biemelt, U. Sonnewald, S. Vieths and S. Scheurer (2006): Skin prick test reveals stable and heritable reduction of allergenic potency of gene silenced tomato fruits. *J Allergy Clin Immunol*, 118:711-718

L. LeQuynh\* and Y. Lorenz\*, S. Scheurer, K. Fötisch, E. Enrique, J. Bartra, S. Biemelt, S. Vieths, U. Sonnewald (2006): Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnology Journal*, 4:231-242

\*The authors are equal contributors

### Präsentationen

- Mainzer Allergie-Workshop der DGAI (Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie), 12.-13.04.2004 (Vortrag)

Y. Lorenz, S. Westphal, K. Fötisch, J. Crespo, S. Vieths, S. Scheurer

„Charakterisierung von IgE-reaktiven Proteinen bei der Soforttypreaktion gegen Tomate (*Lycopersicon esculentum*)“

- 9<sup>th</sup> International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy, Budapest, Hungary, 18.-21.04.2004 (orale Poster-Präsentation)

Y. Lorenz, K. Fötisch, F. Schocker, W.-M. Becker, R. Frank, M. San Miguel-Moncín, A. Cisteró-Bahíma, S. Vieths, S. Scheurer

“Cross-reactivity between LTPs is based on several conserved sequence epitopes”

L. Le Quynh, S. Biemelt, A. v. Schaewen, S. Vieths, S. Scheurer, Y. Lorenz, U. Sonnewald

“Genetic Engineering of plants to reduce food allergens: Potentials and Limitations”

- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung 17.-18.03.2005, Kiel (Vortrag)

Y. Lorenz, K. Fötisch, J. Crespo, A. Conti, E. Enrique, J. Bartra, S. Vieths, S. Scheurer

„Identifikation und klinische Relevanz der Allergene in der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) bei der IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion“

- World Allergy Congress and Congress of the EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology), München (Poster Präsentation) 26.06.-01.07.2005

Lorenz Y., Fötisch K., LeQuynh L., Sonnewald U., Lauer I., Enrique E., Malek T., Bartra J., Crespo J.F., Rodriguez J., Conti A., Vieths S. and Scheurer S.

“Frequency of specific IgE sensitisation to tomato allergens in German and Spanish patients and identification of a new tomato allergen”

Scheurer S., Le Quynh L., Lorenz Y., Retzek M., Foetisch K., Schaewen A., Kaulfuerst H., Enrique E., Bartra J., Crespo J., Biemelt S., Vieths S. and Sonnewald U. (Vortrag)

“Gene silencing is an efficient tool to reduce the allergenic potential of tomato fruits”

- 62<sup>th</sup> Annual Meeting of the AAAAI (American Academy of Allergy Asthma & Immunology) (Poster Präsentation) Miami Beach, USA, 03.-07.03.2006

Lorenz Y., Le Quynh L., Retzek M., Foetisch K., Mahler V., Enrique E., Bartra J., Crespo J., Biemelt S., Vieths S., Scheurer S. and Sonnewald U.

“Gene silencing is an efficient tool to reduce the allergenic potential of tomato fruits”



## 11. Danksagung

Die Arbeit wurde von April 2003 bis Oktober 2006 in der Abteilung Allergologie des Paul-Ehrlich-Instituts unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Vieths und Dr. Stephan Scheurer angefertigt. Ihnen danke ich sehr für die Möglichkeit, in diesem interessanten Projekt zu arbeiten. Für Ihre Hilfe, die Möglichkeit jederzeit meine Ergebnisse zu diskutieren und für die vielen motivierenden Worte möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Bei Prof. Dr. Uwe Sonnewald, Lien LeQuynh und Sophia Biemelt bedanke ich mich für das gute Gelingen der Kooperation und vor allem für die interessanten Tage während meines Aufenthaltes in Gatersleben. Lien, I really enjoyed the days in the lab with you.

Mein besonderer Dank geht an Christina Hartz und Mechthild Retzek für die Einführung in die Laborarbeit und ganz besonders für Eure niemals endende Diskussionsbereitschaft über alle wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Fragestellungen.

Bei Andrea Wangorsch möchte ich mich für die Einweihung in die Geheimnisse der Klonierung und Proteinexpression ganz herzlich bedanken. Vielen Dank, dass Du bei all meinen „dringenden“ Problemen sofort Zeit für mich hattest. Des Weiteren danke ich Dr. Andreas Reuter für die Einführung und die Hilfe bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese und die Analyse des nLyc e 3. Vielen Dank, dass Du auch in Italien immer ein offenes Ohr für meine Fragen hattest.

Yvonne Kühne, Tina Abel und Dr. Iris Lauer: Danke für Eure Hilfe bei der Aufreinigung der Proteine über die FPLC. Außerdem bedanke ich mich bei Kay Fötisch für seine Einführung, Hilfe und Geduld während der basophilen Histamin Freisetzungstests. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Gerald Reese für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Vorschläge zur zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Allergologie danke ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, ich habe gerne mit Euch gearbeitet.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und Nicolai für die großartige Unterstützung nicht nur während der letzten drei Jahre bedanken.