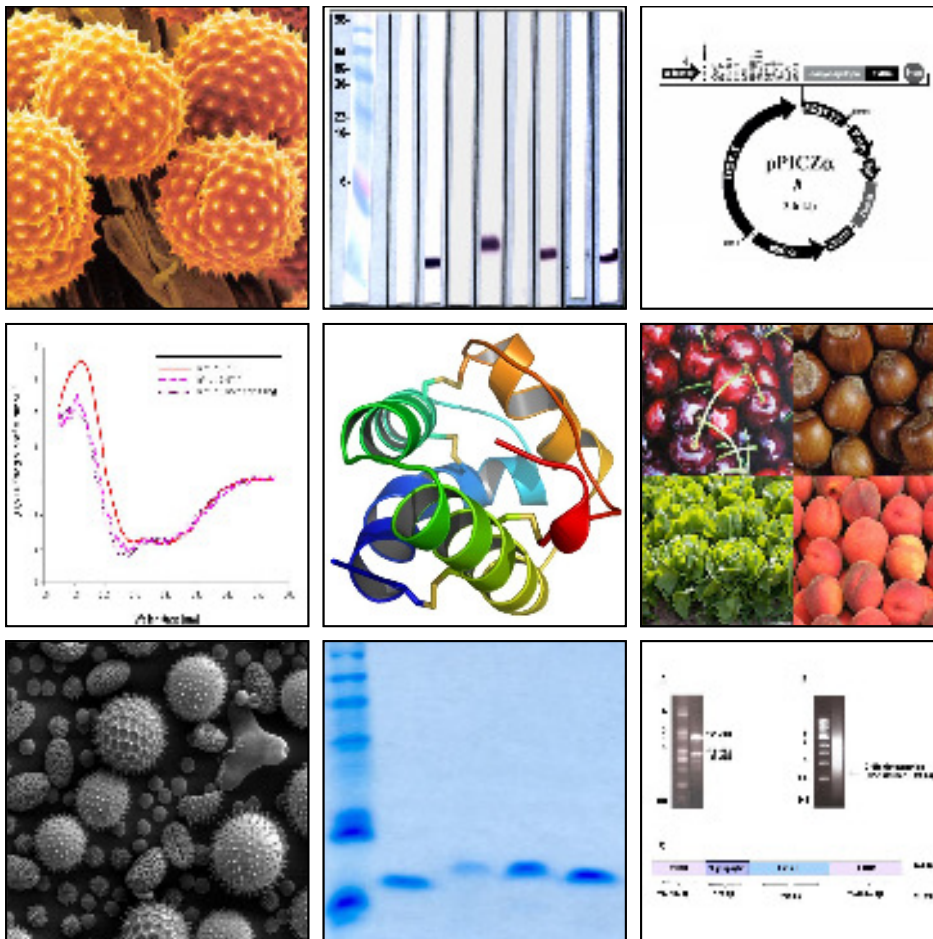


Nicht spezifische Lipidtransfer Proteine: Untersuchungen zur Prävalenz, klinischen Relevanz und IgE-Kreuzreaktivität bei potenziell schweren Formen der Lebensmittelallergie



Christina Hartz

**Nicht spezifische Lipidtransfer Proteine:
Untersuchungen zur Prävalenz, klinischen Relevanz
und IgE-Kreuzreaktivität bei potenziell schweren
Formen der Lebensmittelallergie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von

Christina Hartz

aus Offenbach am Main

Frankfurt 2007

D 30

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Vieths

Gutachter: Prof. Dr. Armin Mosandl

Datum der Disputation: 12.03.2008

Diese Arbeit wurde durch die Finanzierung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) SCHE 637/2 ermöglicht.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

*Ideale sind wie Sterne. Wir erreichen sie niemals, aber wie die Seefahrer
auf dem Meer richten wir unseren Kurs nach ihnen.*

Carl Schurz

*amerikanischer Politiker (Republikaner)
und Publizist deutscher Herkunft
2.3.1829 bis 14.5.1906*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 EINFÜHRUNG - ALLERGIE	1
1.2 HÄUFIGKEIT UND URSACHEN ALLERGISCHER ERKRANKUNGEN	1
1.3 KLASSIFIKATION ALLERGISCHER REAKTIONEN	3
1.3.1 PATHOMECHANISMUS DER SOFORTTYPREAKTION	4
1.4 EINFÜHRUNG – ALLERGENE	7
1.4.1 NOMENKLATUR VON ALLERGENEN	7
1.5 NAHRUNGSMITTELALLERGIE	8
1.5.1 EINFÜHRUNG	8
1.5.2 DIAGNOSE UND THERAPIE VON NAHRUNGSMITTELALLERGIEN	9
1.5.3 KLASSIFIZIERUNG VON NAHRUNGSMITTELALLERGENEN.....	11
1.5.4 KREUZALLERGIEN.....	13
1.5.4.1 Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie.....	13
1.5.4.2 Pollen-unabhängige Nahrungsmittelallergien.....	14
1.5.4.3 Birkenpollen-unabhängige Nahrungsmittelallergien	14
1.6 NICHT-SPEZIFISCHE LIPIDTRANSFER PROTEINE ALS PANALLERGENE.....	15
1.6.1 BIOPHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DER LIPIDTRANSFER PROTEINE	19
1.6.2 KREUZREAKTIONEN VON ANTIKÖRPERN INNERHALB DER NAHRUNGSMITTEL-LTP-GRUPPEN ..	20
1.6.3 KORRELATION ZWISCHEN EINER NAHRUNGSMITTEL- UND POLLEN-LTP-SENSIBILISIERUNG. 21	
2. ZIELSETZUNG UND ARBEITSKONZEPT	24
2.1 ZIELSETZUNG.....	24
2.2 ARBEITSKONZEPT.....	26
3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 MATERIALIEN	29
3.1.1 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN UND GERÄTE	29
3.1.2 ANTIKÖRPER UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNDETEKTION	30
3.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	31
3.1.4 NÄHRMEDIEN	32
3.1.5 OLIGONUKLEOTIDE	35
3.1.6 VEKTOREN	37
3.1.7 RNA/DNA- UND PROTEINMARKER	37
3.1.8 BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME.....	37
3.1.9 PATIENTENSEREN.....	38
3.1.10 PROTEINE	39
3.1.11 SOFTWARE.....	39
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	40
3.2.1 KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI/P. PASTORIS</i>	40
3.2.2 PROTEINEXPRESSION MITTELS EXPRESSIONSVEKTOR pPICZAA IN <i>P. PASTORIS</i>	40
3.2.3 REKOMBINATION UND INTEGRATION VON pPICZAA-LTP-CDNA IN <i>P. PASTORIS</i>	41
3.2.4 HERSTELLUNG VON ELEKTROKOMPETENTEN <i>P. PASTORIS</i>	43
3.2.5 TRANSFORMATION VON <i>P. PASTORIS</i>	43
3.2.6 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) EINZELNER KOLONIEN VON <i>P. PASTORIS</i>	43
3.2.7 INDUKTION DER PROTEINSYNTHESE IN <i>P. PASTORIS</i>	44
3.2.7.1 Induktion der Proteinsynthese eines Mut ^s -Phänotypen.....	44

3.2.7.2	Induktion der Proteinsynthese eines Mut ⁺ -Phänotypen	44
3.2.8	PROTEINEXPRESSION MITTELS EXPRESSIONSVEKTOR PET100/D-TOPO IN <i>E. COLI</i>	45
3.2.9	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	46
3.2.10	SELEKTION POSITIVER KLONE	46
3.2.11	EINFRIEREN DER POSITIVEN KLONE	47
3.2.12	INDUKTION DER PROTEINSYNTHESE IN <i>E. COLI</i>	47
3.2.13	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	48
3.2.14	RNA-ISOLIERUNG AUS KOPFSALAT MITTELS RNAEASY PLANT MINI KIT (QIAGEN)	48
3.2.15	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNA/DNA	48
3.2.16	PHENOL-CHLOROPHORM-EXTRAKTION	49
3.2.17	FÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN	49
3.2.18	RESTRIKTION VON PLASMID-DNA	50
3.2.19	AUFTRENNUNG DER DNA-FRAGMENTE IM AGAROSEGEL	51
3.2.20	DNA EXTRAKTION AUS AGAROSEGELEN	51
3.2.21	LIGATION VON DNA	52
3.2.22	REVERSE TRANSKRIPTION- POLYMERASEKETTENREAKTION (RT-PCR)	52
3.2.23	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	53
3.2.24	„SITE-DIRECTED“ MUTAGENESIS POLYMERASEKETTENREAKTION	54
3.2.25	CDNA SEQUENZIERUNG	54
3.2.26	HERSTELLUNG EINER SALAT CDNA-EXPRESSIONSBIBLIOTHEK	54
3.2.26.1	RNA-Isolierung aus Kopfsalat mittels CsCl-Gradienten	54
3.2.26.2	Isolation der mRNA aus Gesamt-RNA	55
3.2.26.3	Reverse Transkription mittels „OrientExpress cDNA Kit“	56
3.2.26.4	In vitro Verpackung in den Phagenvektor λSCREEN	56
3.2.26.5	Titerbestimmung der λSCREEN-Phagenbibliothek	57
3.2.26.6	Amplifizierung einer λSCREEN-Phagenbibliothek	57
3.2.27	SCREENING EINER CDNA-EXPRESSIONSBIBLIOTHEK	58
3.2.28	RESCREENING EINER CDNA-EXPRESSIONSBIBLIOTHEK	58
3.2.29	IN VIVO „EXCISION“	59
3.2.30	5' RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS (RACE)	59
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN	61
3.3.1	HERSTELLUNG VON ALLERGENEXTRAKTEN	61
3.3.1.1	Extraktion mittels Tieftemperaturmethode	61
3.3.1.2	Isolierung von natürlichen LTP aus pflanzlichem Gewebe	62
3.3.2	CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG VON LTPS	63
3.3.2.1	Ionenaustausch-Chromatographie	63
3.3.2.2	Gelfiltration	64
3.3.2.3	Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	65
3.3.3	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	66
3.3.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford	66
3.3.3.2	Proteinbestimmung mittels Bicinchinonsäure (BCA)	66
3.3.4	RÜCKFALTUNG VON PROTEINEN	67
3.3.5	REDUKTION UND ALKYLIERUNG VON NPRU P 3	67
3.3.6	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	67
3.3.7	IMMUNDETEKTION (WESTERNBLOT)	69
3.3.8	IMMUNOBLOTINHIBITION	71
3.3.9	PROTEINFÄRBUNG	71
3.3.9.1	Coomassie Brilliant Blau Färbung	71
3.3.9.2	Silberfärbung	71
3.3.9.3	Ponceau-S-Färbung	72
3.3.10	LIMULUS AMÖBOZYTEN-LYSAT-TEST	72
3.3.11	STRUKTURANALYSEN	73
3.3.11.1	Massenbestimmung mittels nano ESI-MS	73
3.3.11.2	N-terminale Sequenzierung	73
3.3.11.3	Strukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie	74

3.3.12	BESTIMMUNG DES SPEZIFISCHEN IGEs/IGGs	75
3.3.12.1	Herstellung von Allergenscheiben	75
3.3.12.2	Enzym Allergosorbens Test (EAST)	75
3.3.12.3	ImmunoCAP- Fluoroenzym-Immuno-Assay (FEIA)	76
3.3.12.4	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	77
3.3.13	INHIBITIONS-ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	78
3.3.14	IMMUNISIERUNG VON CBA/J MÄUSEN	80
3.3.15	IN VITRO HISTAMINFREISETZUNG AUS BASOPHILEN GRANULOZYTEN	80
3.3.16	RBL-2H3 (RAT BASOPHILIC LEUKEMIA CELL 2H3)-MEDIATORFREISETZUNGSTEST	81
3.3.17	LTP-INDUZIERTER T-ZELL-PROLIFERATION	82
3.3.17.1	T-Zell-Kreuzreaktivität von LTPs	82
3.3.17.2	Identifizierung der T-Zellepitope des Pru p 3	82

4. ERGEBNISSE83

4.1	BEDEUTUNG DES LTPs AUS SALAT BEI DER ALLERGISCHEN SOFORTTYPREAKTION	83
4.1.1	ANALYSE UNTERSCHIEDLICHER SALATVARIETÄTEN	83
4.1.1.1	Bestimmung des Proteinmusters unterschiedlicher Salatvarietäten.....	83
4.1.1.2	IgE-Reaktivität unterschiedlicher Salatvarietäten.....	84
4.1.2	VERGLEICH DES LTP-GEHALTS VON JÜNGEREN UND ÄLTEREN SALATBLÄTTERN	86
4.1.3	IDENTIFIZIERUNG DES LTPs LAC s 1 AUS SALAT	86
4.1.4	IGE-SENSIBILISIERUNGSMUSTER VON LAC s 1	87
4.1.5	HÄUFIGKEIT UND STÄRKE DER SENSIBILISIERUNG GEGEN SALATEXTRAKT.....	88
4.1.6	IDENTIFIZIERUNG IMMUNOLOGISCH RELEVANTER KOHLENHYDRATSTRUKTUREN	88
4.1.7	IDENTIFIZIERUNG VON LTP-ISOFORMEN AUS SALAT	90
4.1.7.1	Identifizierung von Lac s 1.1 und Lac s 1.2.....	90
4.1.7.2	Herstellung und Screening einer cDNA-Bibliothek aus Salat	91
4.2	KLONIERUNG, EXPRESSION, EXTRAKTION UND REINIGUNG DER LTPs	95
4.2.1	KLONIERUNG DER LTPs IN DEN HEFEEXPRESSIONSVEKTOR pPICZAA	95
4.2.2	EXPRESSION DER LTPs PRU p 3, PRU AV 3, COR A 8 UND LAC s 1 IN <i>P. PASTORIS</i>	97
4.2.3	CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG DER IN <i>P. PASTORIS</i> EXPRIMIERTEN LTPs	99
4.2.3.1	Chromatographische Reinigung von rPru av 3 (<i>P. pastoris</i>)	99
4.2.3.2	Chromatographische Reinigung von rCor a 8 (<i>P. pastoris</i>).....	102
4.2.3.3	Chromatographische Reinigung von rPru p 3	104
4.2.4	KLONIERUNG DER LAC s 1-ISOFORMEN UND PRU p 3 IN DEN PROKARYOTISCHEN EXPRESSIONSVEKTOR pET100/D-TOPO	105
4.2.5	EXPRESSION (<i>E. COLI</i>) UND REINIGUNG VON rPRU p 3 UND rLAC s 1.....	106
4.2.6	ISOLIERUNG VON nPRU p 3 UND nLAC s 1 AUS LEBENSMITTELEXTRAKTEN FÜR DIE IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	109
4.2.7	CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG VON nPRU p 3 UND nLAC s 1	109
4.2.7.1	Chromatographische Reinigung von nPru p 3	109
4.2.7.2	Chromatographische Reinigung von nLac s 1	112
4.3	REINHEIT UND AUSBEUTE DER LTPs.....	115
4.4	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER LTPs	116
4.4.1	NANO ESI-MS SPEKTROMETRIE	116
4.4.2	N-TERMINALE SEQUENZIERUNG	117
4.4.3	UNTERSUCHUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR	118
4.4.4	UNTERSUCHUNG DES ALLERGEGEHALTS VON HAUTTEST-LÖSUNGEN.....	119
4.4.5	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	120
4.4.5.1	Strukturanalysen mittels CD-Spektroskopie nach Hitzeeinwirkung.....	120
4.5	IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER LTPs	121
4.5.1	UNTERSUCHUNG DER IGE-REAKTIVITÄT DER LTPs.....	121
4.5.2	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN KONZENTRATION AN IGE IN PATIENTENSERA	122
4.5.2.1	Vergleich der Sensitivität der beiden Messmethoden EAST und ImmunoCAP-FEIA.....	122

4.5.2.2	Häufigkeit der Sensibilisierung gegen LTPs in der Lebensmittelallergikergruppe	122
4.5.2.3	Vergleich der IgE-Bindekapazität von LTPs in unterschiedlichen Patientengruppen	123
4.5.3	KREUZREAKTIVITÄTEN DER HUMANEN IGE-ANTIKÖRPER	127
4.5.4	KREUZREAKTIVITÄTEN DER MURINEN IGE- UND IGG-ANTIKÖRPER	131
4.5.5	VERGLEICH DER BIOLOGISCHEN POTENZ DER LTPs AUS LEBENSMITTELN IM HUMANEN SYSTEM	135
4.5.6	UNTERSUCHUNGEN DER PRU P 3 SPEZIFISCHEN T-ZELL PROLIFERATION	140
4.5.6.1	Herstellung der T-Zell-Linien und T-Zell-Klone	140
4.5.6.2	T-Zell Epitopmapping von Pru p 3	141
4.5.6.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur T-Zell-Kreuzreaktivität	142

5. DISKUSSION 145

5.1	ANALYSE DES PROTEINMUSTERS UND DER EXPRESSION VON IGE- REAKTIVEN ALLERGENEN AUS UNTERSCHIEDLICHEN SALATVARIETÄTEN	145
5.2	SENSIBILISIERUNGSMUSTER UND GEOGRAPHISCHE UNTERSCHIEDE DER SENSIBILISIERUNG GEGEN LTPs	146
5.3	HÄUFIGKEIT DER SENSIBILISIERUNG GEGEN LAC S 1	147
5.4	IDENTIFIZIERUNG VON SALAT-LTP-ISOFORMEN	147
5.4.1	AMINOSÄURESEQUENZIDENTITÄTEN DER LAC S 1-ISOFORMEN MIT ANDEREN LTPs	149
5.5	KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG DER LTPs	149
5.6	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER LTPs	158
5.6.1	UNTERSUCHUNG DER QUALITÄT VON HAUTTEST-LÖSUNGEN HINSICHTLICH DES ALLERGENGEHALTES	160
5.6.2	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN NACH HITZEINWIRKUNG	161
5.7	IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ALLERGENE	163
5.7.1	BESTIMMUNG DER IGE-REAKTIVITÄT UND DER SPEZIFISCHEN IGE-KONZENTRATION	163
5.7.2	BESTIMMUNG DER IGE-BINDEKAPAZITÄT VON PRU P 3 IM VERGLEICH ZU LAC S 1, PRU AV 3 UND COR A 8	164
5.7.3	UNTERSUCHUNG ZUR BIOLOGISCHEN POTENZ DER LTPs	165
5.7.4	KREUZREAKTIVITÄTEN LTP-SPEZIFISCHER IGE- UND IGG-ANTIKÖRPER	168
5.7.5	T-ZELL-KREUZREAKTIVITÄT	171
5.8	FAZIT UND AUSBLICK	174

6. ZUSAMMENFASSUNG 176

7. LITERATURVERZEICHNIS 179

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 191

9. ANHANG 196

9.1	PATIENTENDATEN UND SEROLOGISCHE ERGEBNISSE	196
9.1.1	SPANISCHE LEBENSMITTELALLERGIKER TEIL 1	196
9.1.2	SPANISCHE LEBENSMITTELALLERGIKER TEIL 2	197

10. PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN 198

10.1 PUBLIKATIONEN:	198
10.2 PRÄSENTATIONEN:	198

<u>11. DANKSAGUNG</u>	200
------------------------------------	------------

<u>12. LEBENSLAUF</u>	203
------------------------------------	------------

1. Einleitung

1.1 Einführung - Allergie

Der Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet hatte 1906 zum ersten Mal den Begriff „Allergie“ eingeführt, um den Unterschied zwischen Immunität und Überempfindlichkeit darzustellen. Allergische Reaktionen beruhen auf Fehlreaktionen des menschlichen Immunsystems, wobei Fremdstoffe (Antigene) in den Organismus eindringen und das Immunsystem spezifische Antikörper oder Lymphozyten produziert, die bei erneutem Kontakt mit dem Fremdstoff reagieren. Im Falle der Immunität führt dieser Vorgang zu einem Schutz, während bei einer Allergie die betroffenen Personen auf harmlose, nicht infektiöse Fremdstoffe, infolge der Reaktion mit gebildeten Antikörpern oder sensibilisierten Zellen mit Krankheitserscheinungen reagieren. Allergien treten erst nach wiederholtem Kontakt mit demselben Allergen auf. Bei einem primären Kontakt des Organismus mit dem Fremdstoff (Allergen) findet die so genannte Sensibilisierung statt, bei der es zur Bildung von spezifischen Antikörpern oder anderen Abwehrzellen des Körpers kommt, wodurch noch keine Symptome hervorgerufen werden. Erst beim erneuten Kontakt mit dem Allergen kommt es zu allergischen Reaktionen, die sich in unterschiedlichen Bereichen des Körpers, wie z. B. Herz-Kreislauf-System, Magen-Darm-Bereich, Haut, Mundschleimhaut und der Lunge, auswirken können [Ring 1988]. Die Symptome reichen über Juckreiz, Niesanfall, Atemnot, Übelkeit, Angioödem bis zum anaphylaktischen Schock, der zum Tode führen kann.

1.2 Häufigkeit und Ursachen allergischer Erkrankungen

Allergische Erkrankungen haben in den letzten Jahrzehnten in Deutschland und anderen Industrieländern drastisch zugenommen und gewinnen immer mehr an Bedeutung [Wuthrich 1989, Davies et al. 1998]. Allergisches Asthma, Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen) und Ekzeme zeigten in den letzten Jahrzehnten eine enorme Zunahme in der Prävalenz und zählen somit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen in den Industrienationen [DGAKI 2004]. Demnach leiden 13% deutscher Kinder an Rhinokonjunktivitis und 2-10% unter atopischem Ekzem. 10-20% der Erwachsenen Deutschen gaben an, unter einer Allergie zu leiden. Bei 2-4% wurde durch ärztliche Untersuchungen Bronchialasthma und bei 13-24% die

Diagnose Rhinokonjunktivitis gestellt [Wahn et al. 2000]. 16-36% zeigten eine Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene und 24,5% haben eine Bienen- oder Wespengiftallergie. Nahrungsmittelallergien bei Erwachsenen konnten nach dem Verzehr von Früchten (35%), Nüssen (23%), Gewürzen (18%), Fisch (10%), Getreidemehl (7%), Kuhmilch (7%) und Hühnerei (4%) beobachtet werden. Kinder hingegen zeigten hauptsächlich allergische Reaktionen gegen Kuhmilch (70%) und Hühnerei (40%) [DGAKI 2004]. Schätzungen ergaben, dass ungefähr die Hälfte der westlichen Bevölkerung eine Sensibilisierung zu einem oder mehreren Allergenen aufweist [Holgate 1999]. Insbesondere die Zunahme von Asthma bronchiale ist besorgniserregend. In Deutschland geht man davon aus, dass 5% der Erwachsenen und 10% der Kinder aus der Bevölkerung betroffen sind [Schmidt 2006]. Asthma ist die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter.

Als Ursachen für den Anstieg der Allergien in den Industrienationen werden unterschiedliche Faktoren diskutiert. Neben einer erhöhten Allergenexposition werden veränderte Lebens- bzw. Essgewohnheiten und die Zunahme von Luftschadstoffen als wesentliche Ursachen angenommen [von Mutius et al. 1994, Bodner et al. 1998, Kraemer et al. 1998, Ball et al. 2000]. Des Weiteren scheint die zunehmende Hygiene und die damit verbundene Abnahme von Infektionen im Kindesalter mit der Zunahme an atopischen Erkrankungen zu korrelieren [Holt 1996, Matricardi et al. 1997, Matricardi et al. 2000]. Es wird vermutet, dass sich das Immunsystem, wenn es nicht mit pathogenen Erregern konfrontiert wird, gegen ungefährliche Fremdstoffe sensibilisiert. Bezeichnet wird diese Vermutung als „Hygiene-Hypothese“. Genetische Prädispositionen können die Entwicklung einer Allergie begünstigen [Marsh et al. 1981, Larsen et al. 1986, Coleman et al. 1997]. Studien haben gezeigt, dass Kinder von Allergikern ein statistisch erhöhtes Risiko zeigten eine Allergie zu entwickeln.

1.3 Klassifikation allergischer Reaktionen

Nach der Klassifizierung von Coombs und Gell 1963 wurde der Pathomechanismus von Allergien in vier unterschiedliche Typen (I-IV) eingeteilt [Coombs R.R.A. et al. 1963]. Bei Typ I handelt es sich um die IgE-vermittelte Soforttypreaktion, bei der nach einer Sensibilisierung innerhalb weniger Minuten zellständige IgE-Antikörper die Freisetzung diverser Mediatoren vermitteln. Typische Erkrankungen sind Urtikaria (Nesselsucht), allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen) und allergisches Asthma. Bei der zytotoxischen Typ II-Reaktion werden innerhalb von Stunden Immunkomplexe aus zellständigem Antigen mit körpereigenen IgG-Antikörpern gebildet. Hierbei wird das Antigen von körpereigenen Zellen an der Oberfläche präsentiert und von IgG-Antikörpern gebunden. Es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Bildung von aktivierten zytotoxischen Killerzellen, wodurch eine Zerstörung der körpereigenen Zellen durch Lyse oder Phagozytose eingeleitet wird. Auslöser dieser Allergieform sind in den meisten Fällen Medikamente. Bei der Typ III-Immunkomplexreaktion werden die Symptome ebenfalls erst nach Stunden bemerkbar und stellen eine weitere häufige Form der Medikamentenallergie dar. Im Gegensatz zur Typ II-Reaktion binden Antikörper an die im Blut gelösten Antigene, wie z. B. Medikamente, wodurch Immunkomplexe entstehen, die sich an Gefäßwänden festsetzen und eine Entzündungsreaktion auslösen können. Durch Aktivierung des Komplementsystems und von Phagozyten wird das betroffene Gewebe geschädigt. Allergische Gefäßentzündungen wären ein Beispiel der Typ III-Reaktion. Bei einer Typ IV-Allergie handelt es sich um eine allergische Spätreaktion, die sich erst nach einem bis mehreren Tagen bemerkbar macht. Es ist die einzige Allergieform, bei der T-Lymphozyten direkt durch Antigene aktiviert werden und somit als zellvermittelte Spättypreaktion bezeichnet wird. Sensibilisierte T-Lymphozyten setzen Lymphokine frei, wodurch sich weitere Lymphozyten vermehrt ansammeln und eine Entzündungsreaktion entsteht. Die Typ IV-Allergie wird meist durch niedermolekulare Substanzen, wie z. B. Metalle oder Chemikalien, ausgelöst. Klinisch äußert sich die Typ IV-Allergie als Kontaktekzem. Nahrungsmittelallergien, die in dieser Arbeit im Vordergrund stehen, werden durch eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp hervorgerufen. Aus diesem Grund wird dieser Allergietyp im Folgenden näher beschrieben.

1.3.1 Pathomechanismus der Soforttypreaktion

Die Soforttypreaktion stellt die häufigste Allergieform dar und lässt sich in zwei Phasen einteilen. Zum einen in die Sensibilisierungsphase, in der das Allergen-spezifische IgE gebildet wird und zum anderen in die nachfolgende Manifestationsphase, in der ein wiederholter Allergenkontakt klinische Symptome auslöst.

In der ersten Phase der Sensibilisierung gehen die Allergene an den Schleimhäuten in Lösung und können durch Proteasen fragmentiert werden. Eine weitere Prozessierung der Allergene findet nach der Internalisation durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) in so genannten Lysosomen statt, wodurch Allergenpeptide zusammen mit dem MHCII-Rezeptor an der Oberfläche präsentiert werden [Vercelli 1995]. Dieser Peptid/MHCII-Komplex wird von naiven CD4⁺ T-Helferzellen über den T-Zellrezeptor (TCR) als antigenspezifisches Signal erkannt. Undifferenzierte CD4⁺-Zellen werden als naive T_{H0}-Zellen bezeichnet. Damit es zur Ausbildung einer Allergie kommt, müssen diese naiven T_{H0}-Zellen zu T_{H2}-Zellen ausdifferenzieren. Ausschlaggebend scheint das vorherrschende Zytokinmilieu zu sein, das auf die naiven T_{H0}-Zellen während der Interaktion mit den APC einwirkt (Abb.1.1). Hauptsächlich werden Interleukin-(IL)-2, IL-12 und Interferon- γ (bei einer T_{H1}-Reaktion) bzw. IL-4, IL-5 und IL-13 (bei einer T_{H2}-Reaktion) ausgeschüttet. Eine weitere Gruppe von CD4⁺ T-Helferzellen sind die so genannten regulatorischen T-Zellen 1 (T_{r1}-Zellen), die ebenfalls die Richtung der Immunreaktion beeinflussen können. T_{r1}-Zellen können durch inhibitorische Zytokine (IL-10 und TGF β) die Aktivität anderer CD4⁺ T-Zellen hemmen und unterdrücken somit die antigeninduzierte Aktivierung. Eine weitere Untergruppe von T-Zellen, so genannte T_{H3}-Zellen, mit immunsuppressiven Passiveffekten sezerniert TGF β als vorherrschendes Zytokin. Das Zytokinsekretionsmuster der T_{r1}- und T_{H3}-Zellen unterdrückt eine T-Zell-Antwort und gewährleistet eine Toleranz gegenüber Fremdantigenen [Janeway, Jr. et al. 2002]. IL-4 ist dafür bekannt bei der Ausdifferenzierung von T_{H0}-Zellen zu T_{H2}-Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen [Bacharier et al. 2000]. Von welchem Zelltyp das erste entscheidende IL-4 produziert wird, ist noch unklar. Die APC selbst, regulatorische T-Zellen oder auch Makrophagen sind mögliche Kandidaten dafür [Daser et al. 1998].

Die T_{H2}-Immunantwort ist geprägt durch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, wodurch es zur Proliferation von IgE-sezernierenden B-Zellen kommt [Punnonen et al. 1997, Kay 2001]. Das von T_{H2}-Zellen produzierte IL-4 induziert

durch die Bindung an den spezifischen IL-4-Rezeptor der B-Zelle einen Klassenwechsel von IgM zu IgE [Poo et al. 1988]. IL-13 ist ebenfalls in der Lage diesen Klassenwechsel auszulösen [Punnonen et al. 1993]. Die stimulierten B-Zellen differenzieren sich zu Plasmazellen aus und produzieren in großen Mengen Allergen-spezifisches IgE, welches über den konstanten Fc-Teil an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor, der sich unter anderem auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten befindet, bindet. In der zweiten Phase der Typ I-Allergie, der Manifestationsphase, kann bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Allergen eine Bindung an das Rezeptorgebundene IgE stattfinden. Eine Quervernetzung der membrangebundenen IgE-Moleküle aktiviert eine Signalkaskade, die zur Freisetzung von gespeicherten Mediatoren, wie z. B. Histamin, führt. Zur Quervernetzung benötigt ein Allergen mindestens zwei Antigen-Determinanten, so genannte Epitope, für IgE-Antikörper. Freigesetzte Mediatoren können anschließend die allergische Reaktion induzieren, die sich durch unterschiedliche klinische Symptome (z. B. Juckreiz, Niesanfall, Atemnot, Urtikaria, Durchfall, Übelkeit, Angioödem und anaphylaktischer Schock) bemerkbar macht.

Bei Nicht-Allergikern werden bei einem Antigen-Kontakt hauptsächlich T_H1-Zellen gebildet. In diesem Fall differenzieren die naiven T_H0-Zellen zu T_H1-Zellen, die bestimmte Zytokine wie IL-12, IL-2 und Interferon-γ produzieren und damit die Differenzierung von T_H0-Zellen zu T_H2-Zellen hemmen. Das produzierte Zytokinmilieu spielt bei der Produktion von IgG2-Antikörpern eine wichtige Rolle [Roitt et al. 2000] und induziert die humorale und zellvermittelte Immunität gegen intrazelluläre Pathogene. Eine T_H2-Immunantwort vermittelt in der Regel eine Immunität gegen extrazelluläre Pathogene, wie z. B. gegen Helminthen.

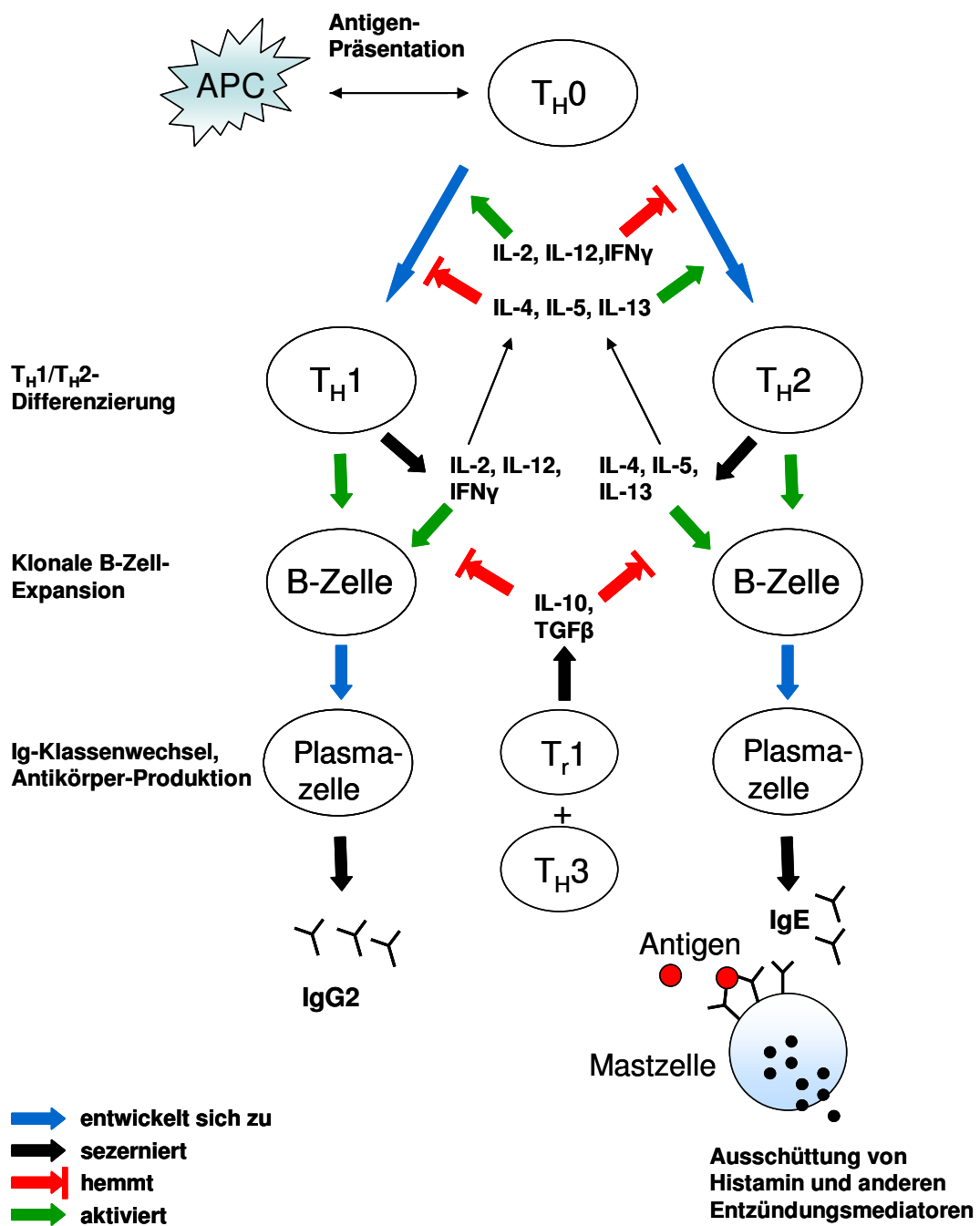


Abb. 1.1: TH1 und TH2 Immunreaktionen, Zytokinmilieu und der Einfluss der Zellen aufeinander (nach Janeway und Travers, Kapitel 12, 2002).

Antigen-präsentierende Zelle (APC), Interleukin (IL), „Transforming growth factor“ (TGF) und Interferon (IFN).

1.4 Einführung – Allergene

Ein Allergen ist ein Antigen, das über das Immunsystem eine Überempfindlichkeitsreaktion auslösen kann. Allergenquellen sind in vielen Bereichen unserer Umwelt vertreten und reichen über Pollen, Insekten, Schimmelpilze und Säugetiere bis hin zu einer großen Anzahl von Nahrungsmitteln [Mygind et al. 2000]. Die Bezeichnung eines Moleküls als Allergen setzt mehrere molekulare Eigenschaften voraus. Dazu gehört die Fähigkeit die Induktion der Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern einzuleiten, sowie an diese zu binden um nachfolgend eine klinische Symptomatik auslösen zu können.

Allergene werden aufgrund der Prävalenz der IgE-Sensibilisierung der Patienten entweder als Hauptallergene („major allergen“) oder Nebenallergene („minor allergen“) eingeteilt. Zeigt ein Allergen eine IgE-Prävalenz von $\geq 50\%$ bei einer Anzahl von mindestens fünf sensibilisierten Patienten in der entsprechenden Patientengruppe wird es als Hauptallergen bezeichnet, während Allergene die eine Prävalenz zwischen 5-50% zeigen als Nebenallergene gelten [Larsen et al. 1996].

Bei der Allergenbindung an spezifische IgE-Antikörper werden so genannte B-Zellepitope erkannt, während die Interaktion von Allergenen mit T-Helferzellen in Form des Peptid/MHCII-Komplexes auf der Basis der T-Zellepitope stattfindet. Unter den B-Zellepitopen werden lineare und konformationelle Epitope unterschieden [Bredehorst et al. 2001]. Lineare Epitope bestehen aus einer kontinuierlichen Aminosäuresequenzabfolge, während konformationelle Epitope aus unterschiedlichen Abschnitten der Aminosäuresequenz durch Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des Proteins entstehen. Im Gegensatz zu den rezeptorständigen IgE-Antikörpern erkennen T-Zellen ausschließlich lineare Epitope.

1.4.1 Nomenklatur von Allergenen

Nach der Festlegung des IUIS/WHO (International Union of Immunological Societies/World Health Organisation) Allergen-Nomenklatur-Subkomitees werden Allergennamen von der taxonomischen Bezeichnung des Ursprungsorganismus abgeleitet. Der Name beginnt mit den ersten drei Buchstaben der Gattung gefolgt von einem Buchstaben der Art und einer arabischen Ziffer, die sich numerisch nach der Reihenfolge der Allergenidentifizierung richtet. Am Beispiel des Hauptallergens der Süßkirsche, die der Gattung *Prunus* und der Art *avium* angehört, besitzt das als

erstes aus diesem Organismus isolierte Allergen den Namen Pru av 1. Zur Kennzeichnung von natürlichem oder rekombinantem Allergen wird dem Namen ein n für natürlich oder r für rekombinant hergestelltes Protein vorangestellt (z. B. nPru av 1 oder rPru av 1).

Als Isoallergene werden Allergene bezeichnet, die sich durch geringe Differenzen in der Primärsequenz des Allergens, wie Polymorphismus und/oder posttranslationale Modifikationen einzelner Positionen, unterscheiden. Isoallergene sind demnach definierte Allergene ähnlicher Molekülgröße, identischer biologischer Funktion und mindestens 67% Sequenzidentität. Unterschiede der einzelnen Sequenzen bis zu 3% werden als Varianten klassifiziert [King et al. 1995]. Abweichungen von dieser Regelung sind möglich. Verschiedene Isoallergene und Varianten werden jeweils durch zwei weitere arabische Ziffern gekennzeichnet. Am Beispiel des Glaskrautpollen- (*Parietaria judaica*)-LTPs sind zwei Isoallergene bekannt: Par j 1.01 und Par j 1.02. Für Par j 1.01 konnten zwei Varianten detektiert werden: Par j 1.0101 und Par j 1.0102.

1.5 Nahrungsmittelallergie

1.5.1 Einführung

Bei einer Nahrungsmittelunverträglichkeit wird zwischen einer immunologisch bedingten Nahrungsmittelallergie (NMA) und einer Nahrungsmittelintoleranz (NMI) ohne immunologische Beteiligung unterschieden. Eine NMA läuft vorwiegend nach dem Mechanismus der IgE-vermittelten Soforttypreaktion, in den meisten Fällen durch (Glyko)-Proteine ausgelöst, ab. Nahrungsmittelintoleranzen, die ohne Beteiligung des Immunsystems ablaufen, werden häufig durch das Fehlen eines Enzyms, wie bei der Laktoseintoleranz durch das Fehlen der Laktase, ausgelöst [Ring et al. 2001]. Zusatzstoffe können bei der NMI ebenfalls als Auslöser eine Rolle spielen.

In Zentral-Europa sind Allergien gegen Hühnerei, Kuhmilch, Getreide, Fisch, Früchte und Nüsse weit verbreitet [DGAKI 2004]. Kinder sensibilisieren sich schon im Säuglingsalter zu einem hohen Prozentsatz vorwiegend auf Kuhmilch und Hühnerei, weniger hingegen auf Soja, Weizen und Erdnuss [DGAKI 2004]. Ein Großteil der Kinder verliert im heranwachsenden Alter diese Allergien wieder. Erwachsene zeigen

häufig eine Allergie gegen Früchte, Gemüse, Nüsse, Erdnuss und Fisch, die sie ein Leben lang begleitet [Bruijnzeel-Koomen et al. 1995, Jäger et al. 2002]. Allergien können einem typischen zeitlichen Ablauf unterliegen, der unter dem Namen Allergiekarriere („allergy march“) bekannt ist. Darunter versteht man die Entwicklung allergischer Erkrankungen beginnend im Säuglingsalter bis hin zum Schulalter.

1.5.2 Diagnose und Therapie von Nahrungsmittelallergien

Die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) sowie der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) beschreibt die Vorgehensweise der Diagnostik von Nahrungsmittelallergien [Kleine-Tebbe et al. 2001, Niggemann et al. 2006]. Zu Beginn der Diagnostik einer Lebensmittelallergie steht die Anamnese, d.h. die Beschreibung der Symptome, sowie das zeitliche und örtliche Auftreten. Ebenfalls von Bedeutung ist eine Familienanamnese von bereits diagnostizierten Allergien. Der nächste Schritt in der Allergiediagnostik ist die Durchführung eines Hauttests. In der Regel wird ein so genannter Skin Prick Test (SPT) durchgeführt [Ring 1988]. Neben der Anamnese und dem Hauttest besitzen die *in vitro* Untersuchungen ebenfalls eine große Bedeutung [Kleine-Tebbe et al. 2001, Niggemann et al. 2006]. Im Vordergrund steht die Bestimmung der spezifischen IgE-Konzentration, die gegen Allergenextrakte oder isolierte Allergene gerichtet ist. Problematisch kann es werden, wenn aufgrund von qualitativen Mängeln des Allergenextrakts falsch negative Ergebnisse vorliegen. Weiterhin kann eine irrelevante Sensibilisierung ohne klinische Symptomatik, d.h. ohne Anamnese des Patienten, detektiert werden. Der Histamin-Freisetzungstest stellt einen aussagekräftigen *in vitro* Test dar, bei dem die Ausschüttung der Histaminmengen nach der Stimulation von basophilen Granulozyten durch Allergenextrakt oder gereinigtem Allergen, bestimmt wird. Dieser Test gehört aufgrund seines hohen Aufwandes nicht zu den allgemeinen klinischen Standardtests. Nachdem durch die vorherigen Testverfahren ein bestimmtes Allergen als potenzieller Allergieauslöser detektiert wurde, kann ein Provokationstest als vierte Möglichkeit das Ergebnis bestätigen. Der so genannte doppelt-blinde Placebo-kontrollierte Nahrungsmittel-Provokationstest (DBPCFC) gilt als einziger eindeutiger Nachweis einer Nahrungsmittelallergie [Bruijnzeel-Koomen et al. 1995, Niggemann et al. 2006].

Dieser *in vivo* Test ist zwar aufschlussreich, aber auch sehr aufwendig und bei starken Symptomen gefährlich für den Patienten. Aus diesen Gründen wird der Test in der klinischen Routine relativ selten angewendet.

Die wichtigste Maßnahme bei Nahrungsmittelallergien ist immer noch die Vermeidung des Kontaktes mit der allergieauslösenden Substanz. Bei einer Hyposensibilisierung, auch spezifische Immuntherapie (SIT) genannt, wird dem Patienten die allergieauslösende Substanz in geringen Konzentrationen subkutan über mehrere Jahre appliziert. Eine Verschiebung der T_H2 -Immunantwort in Richtung einer nicht allergieauslösenden T_H1 -Antwort wird als Wirkprinzip vermutet [Wahn 2000]. Die genauen Mechanismen sind bis heute noch ungeklärt. Ein etabliertes Verfahren der SIT zur Behandlung von Nahrungsmittelallergien liegt bis heute nicht vor. Nahrungsmittelallergien scheinen trotz dieses Ansatzes schwer therapierbar zu sein und ein Risiko-Nutzen-Verhältnis muss aufgrund der gefährlichen Nebenwirkungen einer spezifischen Immuntherapie im Vorfeld gut abgeschätzt werden. Erfolgreiche Studien zur Behandlung einer Erdnussallergie zeigten anschließend einen Abfall der Reaktivität im Hauttest (SPT) sowie eine verbesserte Toleranz bei dem Verzehr von Erdnüssen. Diese Wirkung wurde jedoch nur ab einer bestimmten Allergendosis, die dem Patient verabreicht wurde, erreicht. Patienten, bei denen die Dosis aufgrund systemischer Reaktionen nicht gesteigert werden konnte, zeigten keine ausreichende Wirkung der Therapie [Oppenheimer et al. 1992, Nelson et al. 1997]. SIT wurde hingegen in der Vergangenheit häufig erfolgreich bei Pollenallergien angewendet und zeigte nach der Beendigung der Therapie eine langfristige Wirkung [Durham et al. 1999]. Ein weiterer Ansatz zur Behandlung von Allergien ist die sublinguale Immuntherapie (SLIT), bei der das Allergen in geringen Konzentrationen oral verabreicht wird und auf die Mundschleimhaut einwirkt. Eine erfolgreiche Wirkung der SLIT bei Nahrungsmittelallergien konnte in der Studie von Enrique et al. bei Haselnussallergikern mit anaphylaktischen Reaktionen gezeigt werden [Enrique et al. 2005].

Diagnose- und Therapieansätze mit isolierten Allergenen werden immer häufiger diskutiert [Scheurer et al. 2001a, Schocker et al. 2004, Moingeon 2006, Asero et al. 2007]. Aufgrund qualitativer Mängel von verwendeten Allergenextrakten, in denen das allergieauslösende Protein nur in geringen Mengen enthalten ist, könnte eine

falsche negative Diagnose gestellt oder die Wirkung bei den beschriebenen Therapieansätzen reduziert werden. Demnach kann die Sensitivität in der Diagnostik durch Verwendung isolierter Allergene gesteigert werden [Lidholm et al. 2006]. Die Identifizierung und Isolierung der Allergene spielt dafür eine wichtige Rolle.

1.5.3 Klassifizierung von Nahrungsmittelallergenen

Nahrungsmittelallergene werden aufgrund ihrer Eigenschaften (Sequenzidentitäten, Struktur und biologische Funktion) in drei Gruppen zusammengefasst: (1) Prolamin-Superfamilie, (2) Cupin-Superfamilie und (3) Bet v 1 Familie. Die Prolamin-Superfamilie wird in drei weitere Hauptgruppen unterteilt: (1) 2S Albumine, (2) nicht-spezifische Lipidtransfer Proteine und (3) Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitoren [Breiteneder et al. 2005a].

Auffällig ist, dass ein großer Anteil von Nahrungsmittelallergenen zu der Gruppe der „*pathogenesis-related*“ (PR) Proteine gehört, die sich in 14 Familien untergliedert [Breiteneder et al. 2000]. Einige wichtige Vertreter dieser Allergengruppe sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. PR Proteine spielen bei pathogenem Befall (z. B. durch Pilze, Bakterien oder Viren) oder aber auch bei kritischen Umweltbedingungen (Hitze, Trockenheit, Kälte, Salzkonzentration, Umweltverschmutzung) eine große Rolle und werden aufgrund der genannten biotischen und abiotischen Faktoren induziert [Stintzi et al. 1993, Yagami et al. 1998, Blein et al. 2002]. Nicht-spezifische Lipidtransfer Proteine (nsLTP, im folgenden als LTP abgekürzt) gehören der PR-14 Proteinklasse an und kommen in vielen Früchten, Nüssen, Samen und Gemüsesorten vor und sind hauptsächlich im mediterranen Raum als Allergene beschrieben worden [Pastorello et al. 2004b, Breiteneder et al. 2005a].

Bei Nahrungsmittelallergenen handelt es sich vorwiegend um wasserlösliche Proteine, die ein Molekulargewicht von ungefähr 5-70 kDa aufweisen [Breiteneder et al. 2000]. Unter den Nahrungsmittelallergenen wird aufgrund des Sensibilisierungsweges zwischen zwei Typen unterschieden. Zum einen kann die IgE-Sensibilisierung über den gastrointestinalen Weg kausal induziert werden. Diese Allergene zählen zu den „klassischen Nahrungsmittelallergenen“ (Klasse 1 Allergene). Andererseits können Nahrungsmittelallergene eine strukturelle Verwandtschaft durch eine hohe Sequenzidentität zu Pollenallergenen aufweisen und lösen aufgrund einer immunologischen Kreuzreaktion bei persistierend vorhandener Pollenallergie

zusätzlich eine Nahrungsmittelallergie aus. Bezeichnet wird dieses Allergiesyndrom als „pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie“ (Klasse 2 Allergene). Bei einer „klassischen Nahrungsmittelallergie“ besitzen die auslösenden Allergene eine hohe Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen, wodurch eine allergische Reaktion auch bei dem Verzehr von prozessierten Nahrungsmitteln (Säfte, Konfitüre, Ketchup, etc.) ausgelöst werden kann [Asero et al. 2000, Duffort et al. 2002, Scheurer et al. 2004]. Im Gegensatz dazu zeigten Stabilitätsuntersuchungen von Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergenen der Bet v 1-Familie eine geringe Stabilität gegenüber thermischer und proteolytischer Behandlung [Vieths et al. 1999, Scheurer et al. 2004]. Bei diesen Allergenen treten allergische Reaktionen häufig nur nach dem Verzehr von frischen Nahrungsmitteln auf. Bei einer Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie leiden die Patienten hauptsächlich an dem milden oralem Allergiesyndrom [Amlot et al. 1987], während bei einer „klassischen Nahrungsmittelallergie“ auch von schweren Symptomen (z. B. Urtikaria, Angioödem, anaphylaktischer Schock) berichtet wurde [Fernandez-Rivas et al. 1997, van Ree 2002, Fernandez-Rivas et al. 2006].

Tab. 1.1: Einige Vertreter der „pathogenesis-related“ (PR) Proteine aus Nahrungsmitteln [Breiteneder et al. 2000].

PR-Gruppe	Klassifizierung	Vorkommen in LM (Beispiele)
PR 2	β -1,3-Glukanase	Früchte, Gemüse
PR 3	Chitinase (basischer Typ I)	Avocado, Banane, Kastanie
PR 4	Chitinase	Holunderbeere, Kohlrübe
PR 5	Thaumatococcus ähnliche Proteine	Kirsche (Pru av 2), Apfel (Mal d 2)
PR 9	Peroxidase	Weizen, Roggen
PR 10	Bet v 1 homologe Proteine	Apfel (Mal d 1), Kirsche (Pru av 1), Karotte (Dau c 1), Birne (Pyr c 1), Sellerie (Api g 1), Haselnuss (Cor a 1), Aprikose (Pru ar 1), Erdnuss (Ara h 8), Soja (Gly m 4)
PR 14	Lipidtransfer Proteine	Apfel (Mal d 3), Pfirsich (Pru p 3), Kirsche (Pru av 3), Aprikose (Pru ar 3), Pflaume (Pru d 3), Haselnuss (Cor a 8), Salat (Lac s 1), Traube (Vit v 1), Walnuss (Jug r 3), Orange (Cit s 3)

1.5.4 Kreuzallergien

Unter dem Begriff Kreuzallergie werden allergische Reaktionen bezeichnet, die bei einer vorhandenen Allergie durch ein homologes Protein mit ähnlichen molekularen Eigenschaften ohne vorherige Sensibilisierung gegen dieses Allergen ausgelöst werden. Diese Kreuzreaktionen wurden nicht nur bei taxonomisch verwandten Proteinen, sondern auch bei Allergenen aus unterschiedlichen Spezies beobachtet.

1.5.4.1 Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie

Eine Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie basiert auf der primären Sensibilisierung gegen Birkenpollenallergene und einer zeitlich nachfolgenden Manifestation einer Nahrungsmittelallergie aufgrund von Antikörperkreuzreaktionen durch ähnliche molekulare Eigenschaften der Nahrungsmittelallergene. In Nord- und Mitteleuropa ist die Birkenpollenallergie weit verbreitet und zeigt eine starke Assoziation mit Nahrungsmittelallergien, ausgelöst durch Früchte aus der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) (z. B. Apfel, Birne, Pfirsich und Aprikose), sowie der Doldengewächse (*Apiaceae*) (z. B. Sellerie und Karotte) und der Birkengewächse (*Betulaceae*) (z. B. Haselnuss) [Vieths 1999, Hoffmann-Sommergruber et al. 1999a, Hoffmann-Sommergruber et al. 1999b, Scheurer et al. 2000, Luttkopf et al. 2002]. Diese Allergien werden als Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien bezeichnet und lösen vorwiegend milde Symptome aus. Hauptsächlich leiden die Allergiker unter lokalen Schwellungen des Mund- und Rachenraums, weshalb die allergische Reaktion auch als Orales Allergiesyndrom (OAS) bezeichnet wird [Amlot et al. 1987, Ortolani et al. 1988]. Die Symptome treten meistens direkt beim Verzehr von frischer Nahrung auf [Vieths et al. 1998]. Birkenpollen-assoziierte Allergene der Haselnuss zeigten nach einer thermischen oder proteolytischen Behandlung eine geringe Stabilität [Vieths et al. 1999].

Bet v 1 ist das Hauptallergen aus Birkenpollen und ist für die Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie verantwortlich. Das Allergen besitzt eine Größe von 16-18 kDa und ist mit den PR-Proteinen der Gruppe 10 verwandt, die dementsprechend auch als Bet v 1-homologe Proteine bezeichnet werden (Tab. 1.1) und eine Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie aufgrund einer IgE-Kreuzreaktivität auslösen können [Breiteneder et al. 2000, Vieths et al. 2002]. Ähnliche Epitopeigenschaften mit Bet v 1 wurden unter anderem bei den Hauptallergenen aus der

Süßkirsche (*Prunus avium*) Pru av 1 [Scheurer et al. 1997, Scheurer et al. 1999], dem Apfel (*Malus domestica*) Mal d 1 [Vieths et al. 1994], der Haselnuss (*Corylus avellana*) Cor a 1.04 [Luttkopf et al. 2002], der Sojabohne (*Glycine max*) [Kleine-Tebbe et al. 2002] und der Birne (*Pyrus communis*) Pyr c 1 [Karamloo et al. 2001] identifiziert.

1.5.4.2 Pollen-unabhängige Nahrungsmittelallergien

Eine Pollen-unabhängige Kreuzallergie stellt die Latex-assoziierte Nahrungsmittelallergie dar [Yagami et al. 1998, Nettis et al. 2002]. Kreuzreaktionen zu Kiwi und Banane konnten nach einer primären Sensibilisierung gegen Latexproteine beobachtet werden [Blanco 2003].

1.5.4.3 Birkenpollen-unabhängige Nahrungsmittelallergien

Im Gegensatz zu der in Nord- und Mitteleuropa beobachteten Birkenpollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie gegen Proteine der Rosengewächse (*Rosaceae*) können Sensibilisierungen gegen Proteine, die der Familie der nicht-spezifischen Lipidtransfer Proteine angehören und ebenfalls in Früchten der Rosengewächse vorkommen, unabhängig von einer solchen Pollensensibilisierung in Südeuropa beobachtet werden [Sanchez-Monge et al. 1999, Pastorello et al. 1999a, Pastorello et al. 2000a]. Das Phänomen einer Nahrungsmittelallergie gegen diese Familie ohne begleitende Pollenallergie wurde 1997 erstmals von Fernandez-Rivas et al. beschrieben [Fernandez-Rivas et al. 1997]. LTPs wurden im mediterranen Raum als Hauptallergene in Steinobst identifiziert [Pastorello et al. 1994, Pastorello et al. 1999a, Pastorello et al. 2000a, Pastorello et al. 2001, Scheurer et al. 2001a].

Neben Birkenpollen-unabhängigen Nahrungsmittelallergien gegen die Früchte der Rosengewächse (*Rosaceae*) sind des weiteren allergische Reaktionen gegen Mais (Gattung: *Zea*, Familie: *Poaceae*), Spargel (Gattung: *Asparagus*, Familie: *Asparagaceae*), Salat (Gattung: *Lactuca sativa*, Familie: *Compositae*), Weintrauben (Gattung: *Vitis*, Familie: *Vitaceae*) Haselnuss (Gattung: *Haselnüsse*, Familie: *Betulaceae*) und Tomate (Gattung: *Solanum*, Familie: *Solanaceae*) in Südeuropa beschrieben worden [Pastorello et al. 2000b, Diaz-Perales et al. 2002b, Miguel-Moncin et al. 2003, Pastorello et al. 2003a, Schocker et al. 2004, Le et al. 2006].

Allergien gegen Salat treten zwar selten auf, sie zeigen jedoch eine auffällige Häufung von schweren Formen der Lebensmittelallergie im mediterranen Raum. Aus Deutschland sind bis jetzt nur Einzelfälle von Patienten mit einer Salatallergie bekannt.

1.6 Nicht-spezifische Lipidtransfer Proteine als Panallergene

Nicht-spezifische Lipidtransfer Proteine aus Pflanzen gehören der Prolamin Superfamilie an [Shewry et al. 2002]. Aufgrund ihrer molekularen Masse werden LTPs in zwei Unterfamilien eingeteilt, LTP1 (~9 kDa) oder LTP2 (~7 kDa) [Kader 1996]. LTPs der Klasse 1 werden hauptsächlich in oberirdischen Pflanzenorganen gefunden, während Vertreter der Klasse 2 vorwiegend in Wurzeln exprimiert werden [Guiderdoni et al. 2002]. LTPs wurden aufgrund ihrer Funktion der „pathogenesis-related“ Proteingruppe 14 zugeteilt (Tab. 1.1) [Breiteneder et al. 2000]. Sie gehören einer Multigenfamilie an, wodurch eine Vielzahl von Isoformen eines Allergens auftreten kann, die eine unterschiedliche klinische Relevanz besitzen können [Gao et al. 2004]. Im Gegensatz zu einer Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie, tritt eine Sensibilisierung gegen LTPs unabhängig von einer Birkenpollenallergie auf und erzeugt häufig schwere allergische Reaktionen [van Ree 2002, Salcedo et al. 2004]. Es wird vermutet, dass LTPs eine primäre Sensibilisierung über den oralen Weg, nach dem Verzehr der Nahrungsmittel, auslösen können [Pastorello et al. 2004b]. Es handelt sich um Proteine, die ubiquitär in Pflanzen vorkommen und als Hauptallergene in Steinobst (Familie: *Rosaceae*, Unterfamilie: *Prunoideae*) im mediterranen Raum beschrieben wurden [Pastorello et al. 1994, Pastorello et al. 1999a, Pastorello et al. 2000a, Pastorello et al. 2001, Scheurer et al. 2001a].

LTPs in Pflanzen aus der Familie der Rosengewächse:

Aus der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) wurden das Pfirsich-(*Prunus persica*)-LTP Pru p 3 [Pastorello et al. 1999a], das Aprikosen-(*Prunus armeniaca*)-LTP Pru ar 3 [Pastorello et al. 2000a], das Kirsch-(*Prunus avium*)-LTP Pru av 3 [Scheurer et al. 2001a] und das Pflaumen-(*Prunus domestica*)-LTP Pru d 3 [Pastorello et al. 2001] als Hauptallergen aus Steinobst im mediterranen Raum identifiziert. Zwei weitere LTPs aus der Familie der Rosengewächse konnten aus dem Apfel und der Erdbeere isoliert werden. Das Apfel-(*Malus domestica*)-LTP Mal d 3

wurde als Nebenallergen beschrieben [Pastorello et al. 1999b]. Die Häufigkeit der Sensibilisierung gegen das schwach IgE-reaktive Erdbeer- (*Fragaria ananassa*)-LTP Fra a 3 ist nicht bekannt [Zuidmeer et al. 2006]. Hingegen war die sehr hohe IgE-Prävalenz gegen das Pfirsich-LTP Pru p 3, das bei einer Patientengruppe von 15 Probanden eine Prävalenz von 100% zeigte, auffällig [Pastorello et al. 1999a]. Eine Sensibilisierung gegen dieses Allergen konnte auch in anderen Studien mit einer Häufigkeit von über 90% gezeigt werden [Sanchez-Monge et al. 1999, Garcia-Selles et al. 2002]. Im mediterranen Raum leiden Erwachsene hauptsächlich unter einer Pfirsichallergie [Pastorello et al. 1998]. Die untersuchten Patienten hatten keine zusätzliche Birkenpollenallergie. Sie zeigten häufig eine Sensibilisierung gegen Pru p 3 und keine gegen Bet v 1-homologe Allergene, wodurch eine Birkenpollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie ausgeschlossen werden konnte [Pastorello et al. 1994, Pastorello et al. 1998, Sanchez-Monge et al. 1999, Pastorello et al. 1999a, Scheurer et al. 2001a]. Ein Großteil der Patienten mit einer Pfirsichallergie leidet unter schweren systemischen Reaktionen. Beispielsweise wurde bei 28 Patienten in einer Gruppe von 59 Pfirsichallergikern von systemischen Reaktionen, wie Urtikaria (50%), dem anaphylaktischen Schock (40%) und allergischem Asthma (3%) berichtet [Fernandez-Rivas et al. 2003]. Diese Beobachtungen könnten den Eindruck vermitteln, dass Pru p 3 ein hohes klinisches Potential besitzt und eventuell als primär sensibilisierendes Agens fungieren könnte. Aufgrund dieser Annahme wird Pru p 3 als das wichtigste Allergen aus der Familie der LTPs diskutiert.

LTPs in Pflanzen aus nicht verwandten Spezies zu der Familie der Rosengewächse:

Weitere LTPs aus nicht verwandten Spezies konnten aus Spargel (*Asparagus officinalis*, Aspa o 1) [Diaz-Perales et al. 2002b], Salat (*Lactuca sativa*, Lac s 1) [Miguel-Moncin et al. 2003], Traube (*Vitis vinifera*, Vit v 3) [Pastorello et al. 2003a], Haselnuss (*Corylus avellana*, Cor a 8) [Schocker et al. 2004], Walnuss (*Juglans regia*, Jug r 3) [Pastorello et al. 2004a], Weißkohl (*Brassica oleracea*, Bra o 3) [Palacin et al. 2006] und Zitrone (*Citrus limon*, Cit l 3) [Ahrazem et al. 2005] als Hauptallergene beschrieben werden. Zwei weitere LTPs konnten als relevante Allergene aus der Gerste (*Hordeum vulgare*, Hor v LTP) und Orange (Cit s 3) (*Citrus sinensis*) isoliert werden [Garcia-Casado et al. 2001, Ahrazem et al. 2005].

LTPs aus Pollen:

In Pollen konnten bisher das Beifuß- (*Artemisia vulgaris*)-LTP Art v 3 [Lombardero et al. 2004], beide Glaskraut- (*Parietaria judaica*)-LTPs Par j 1 und 2 [Duro et al. 1996, Duro et al. 1997] und das Oliven- (*Olea europaea*)-LTP Ole e 7 [Barral et al. 2004] als Hauptallergene identifiziert werden. Das Traubenkraut- (*Ambrosia artemisiifolia*)-LTP Amb a 6 und das Platanen- (*Platanus acerifolia*)-LTP Pla a 3 wurden als Nebenallergene beschrieben [Hiller et al. 1998, Lauer et al. 2007].

In der offiziellen Allergendatenbank (<http://www.allergen.org>) des Allergen Nomenklatur Sub-Komitees der International Union of Immunological Societies (IUIS), in der die bekannten Allergene eingetragen werden, sind häufig nur N-terminale Sequenzen zu finden. Lediglich von wenigen LTPs (Pru p 3, Pru av 3, Cor a 8, Mal d 3, Amb a 6, Par j 1 und Par j 2) sind derzeit vollständige cDNA- bzw. Aminosäuresequenzen verfügbar.

Klinische Symptomatik:

Patienten mit einer LTP-Sensibilisierung zeigen häufig systemische Reaktionen, wie z. B. den anaphylaktischen Schock, Urtikaria oder Angioödem [Asero 1999]. Bei einer Anzahl von 26 spanischen Patienten mit einer Haselnussallergie berichteten 38% (10/26) unter anaphylaktischen Schockreaktionen, 23% (6/26) unter Angioödem und 8% (2/26) unter Urtikaria, nach dem Verzehr von Haselnuss zu leiden [Schocker et al. 2004]. Apfelallergiker aus Nord- und Mitteleuropa zeigten zu über 90% milde allergische Symptome gegen die Frucht, während über 35% südeuropäische Patienten schwere systemische Reaktionen zeigten [Fernandez-Rivas et al. 2006]. Milde Symptome wurden durch eine Sensibilisierung gegen das Birkenpollen homologe Apfelallergen Mal d 1 ausgelöst. Schwere Symptome wurden durch das Lipidtransfer Protein Mal d 3 aus dem Apfel verursacht. Eine weitere Studie zeigte eine IgE-Prävalenz gegen das Mais-LTP (*Zea m 14*) von 86% der untersuchten 22 Patienten mit einer Maisallergie, die nach dem Verzehr von Mais unter schweren systemischen Reaktionen litten [Pastorello et al. 2000b].

Geographische Unterschiede der Sensibilisierung gegen LTPs:

Eine IgE-abhängige Sensibilisierung gegen LTPs tritt wesentlich häufiger im mediterranen Raum im Vergleich zu Nord- und Mitteleuropa auf. In Deutschland

konnten im Gegensatz zu den südeuropäischen Ländern lediglich in einer Patientengruppe von Kirschallergikern Einzelfälle beobachtet werden, die eine Sensibilisierung gegen das Kirsch-LTP aufwiesen [Scheurer et al. 2001a, Reuter et al. 2006]. Scheurer et al. beobachteten lediglich bei drei von 101 untersuchten deutschen Kirschallergikern eine IgE-Sensibilisierung gegen das Kirsch-LTP, während die gesamte Gruppe von sieben spanischen Kirschallergikern eine Sensibilisierung gegen das LTP zeigten [Scheurer et al. 2001a]. Weiterhin liegt eine Fallstudie vor, die von einem deutschen Traubenallergiker mit spezifischem IgE gegen das Trauben-LTP Vit v 1, berichtet [Schad et al. 2005].

Die Gründe für die geographisch unterschiedlichen LTP-Sensibilisierungsmuster sind bis heute noch unklar. Es wird vermutet, dass eine primäre Sensibilisierung gegen das Pfirsich-LTP in südlichen Ländern durch einen höheren Konsum der Frucht über einen längeren Zeitraum im Jahr oder zu einem früheren Lebensalter verursacht werden könnte und eine Kreuzreaktion mit homologen LTPs aus anderen Lebensmitteln stattfindet [Breiteneder et al. 2005b]. Asero et al. untersuchten die Essgewohnheiten von Südeuropäern (Spanien/Italien) im Vergleich zu Nord- und Mitteleuropäern (Österreich/Niederland). Letztendlich reichen die gefundenen Unterschiede in den Essgewohnheiten nicht als Grund aus, um das unterschiedliche Sensibilisierungsmuster zu erklären [Asero et al. 2004]. Die in der jeweiligen Region vorwiegend vorkommende LTPs aus Pollen, die eine primäre Sensibilisierung über den inhalativen Weg induzieren und somit eine nachfolgende Kreuzreaktion mit Nahrungsmittel-LTPs auslösen, könnten ebenfalls eine Erklärung liefern [Scheurer et al. 2001a, Lombardero et al. 2004, Schocker et al. 2004]. Unterschiede in der genetischen Prädisposition zwischen Süd- und Nordeuropäern wären ebenfalls denkbar [Ballmer-Weber 2002].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde kontrovers diskutiert, ob LTPs eine „klassische Nahrungsmittelallergie“ kausal durch die Aufnahme des Allergens auslösen oder ob eine primäre Sensibilisierung über homologe Pollen-LTPs, die im mediterranen Raum vorkommen, stattfindet [Pastorello et al. 2002, Enrique et al. 2002, Lombardero et al. 2004].

1.6.1 Biophysikalische Eigenschaften der Lipidtransfer Proteine

LTPs sind für den Membrantransport von unspezifischen Phospho- und Glykolipiden verantwortlich und damit bei der Membranbiosynthese von großer Bedeutung [Garcia-Olmedo et al. 1995, Kader 1996]. Zusätzlich besitzen LTPs eine bakterizide Wirkung gegen Phytophagogene und wurden aufgrund ihrer Funktion der „pathogenesis-related“ Proteingruppe 14 zugeteilt [Garcia-Olmedo et al. 1995, Kader 1996, Breiteneder et al. 2000]. Es handelt sich um basische nicht-glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 9-10 kDa und einem isoelektrischen Punkt von ca. 9-10. Sie zeigen eine hochkonservierte Tertiärstruktur bei der vier alpha-helikale Bereiche durch vier Disulfidbrücken stabilisiert werden (Abb. 1.2) [Kader 1996].

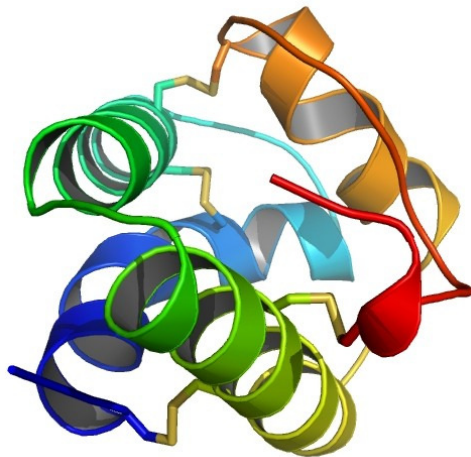


Abb. 1.2: Tertiärstruktur des Pfirsich-LTPs Pru p 3.

Die vier Disulfidbrückenbindungen sind gelb dargestellt.

Im Gegensatz zu Bet v 1-homologen Allergenen zeigen LTPs aus Gerste, Mais, Apfel und Kirsche eine hohe Stabilität gegenüber thermischer und proteolytischer Prozessierung [Brenna et al. 2000, Lindorff-Larsen et al. 2001, Pastorello et al. 2003b, Scheurer et al. 2004, Sancho et al. 2005, Perrocheau et al. 2006]. Diese Eigenschaften begünstigen die Aufnahme von intakten Allergenen im gastrointestinalen Trakt und liefern eine Erklärung für die zum Teil starken und lebensgefährlichen allergischen Reaktionen. Die Untersuchungen von Scheurer et al. verdeutlichen, dass selbst in prozessierten Lebensmitteln wie Fruchtsäften, Konfitüren oder eingemachtem Obst ein hohes allergenes Potenzial zu finden ist [Scheurer et al. 2004]. Lindorff-Larsen et al. berichteten von einer hohen Stabilität des Gersten-LTPs im Bierschaum, d. h. selbst der Brauprozess hat keine

Auswirkungen auf die Stabilität des LTPs, so dass Bier eine allergenen Quelle geworden ist [Lindorff-Larsen et al. 2001]. Das Mais-LTP besitzt nach einer Erhitzung des Lebensmittels auf 100°C für 160 Minuten weiterhin die Fähigkeit IgE zu binden, wodurch allergische Reaktionen von Patienten mit einer IgE-Sensibilisierung gegen das Mais-LTP bei Aufnahme von prozessierten Nahrungsmitteln, wie z. B. Mais-Takos, erklärbar werden [Pastorello et al. 2003b].

Die beobachtete hohe Stabilität der Moleküle lässt sich auf ihre kompakte Tertiärstruktur, die durch vier Disulfidbrücken stabilisiert ist, zurückführen (Abb. 4.2). Ein Austausch von sechs der acht Cysteinreste, die für die Bildung der vier Disulfidbrücken verantwortlich sind, durch andere Aminosäuren führte bei dem Pollen-LTP Par j 1 aus Glaskraut (*Parietaria judaica*) zu einem Verlust der IgE-Reaktivität [Bonura et al. 2001]. Demnach scheint die IgE-Reaktivität von einer intakten Proteinkonformation abhängig zu sein. Pastorello et al. zeigten hingegen eine starke IgE-Reaktivität des Mais-LTPs nach dem Verlust der Sekundärstruktur infolge thermischer Behandlung und postulierten das Vorkommen von linearen Epitopen [Pastorello et al. 2003b]. Garcia-Casado et al. postulierten nach Testung von synthetischen Peptiden auf IgE-Reaktivität drei lineare Epitope für das Pfirsich-LTP Pru p 3 [Garcia-Casado et al. 2003]. Der Nachweis von linearen Epitopen bei Pru av 3 konnte in der eigenen Gruppe nicht reproduziert werden (Daten nicht veröffentlicht). Vermutlich handelt es sich bei den von Garcia-Casado et al. beschriebenen Ergebnissen um eine unspezifische Bindung, was durch entsprechende Negativkontrollen bei der Untersuchung von Pru av 3 belegt wurde.

1.6.2 Kreuzreaktionen von Antikörpern innerhalb der Nahrungsmittel-LTP-Gruppen

Kreuzreakтивitäten geben Auskunft über das Vorkommen gleicher und verwandter Epitope zweier Moleküle. Es wird vermutet, dass ein primär sensibilisierendes Agens die Gesamtheit der IgE-reaktiven Epitope kreuzreaktiver Allergene aufweist. Aufgrund der hohen Prävalenz der Sensibilisierung gegen das Pfirsich-LTP Pru p 3 ist die Kreuzreaktivität von diesem Allergen mit verwandten Molekülen von großem Interesse.

Eine Kreuzreaktion innerhalb der *Prunoideae*-Subfamilie wurde zwischen dem Pfirsich- (*Prunus persica*)-LTP Pru p 3 und dem Pflaumen- (*Prunus domestica*)-LTP Pru d 3, dem Aprikosen- (*Prunus armeniaca*)-LTP Pru ar 3 und dem Kirsch- (*Prunus*

avium)-LTP Pru av 3 beschrieben [Pastorello et al. 1994, Asero 1999]. Innerhalb der *Prunoideae*-Subfamilie lassen sich Aminosäuresequenz-Identitäten der LTPs bis zu 87% finden (z. B. 87%: Pru p 3 versus Pru av 3), während bei weniger verwandten Spezies eine geringere Aminosäuresequenz-Identität beobachtet wurde (z. B. 59%: Pru p 3 versus Cor a 8) [Scheurer et al. 2001a, Schocker et al. 2004]. Trotz einer geringen Übereinstimmung der Primärstruktur von gering verwandten Spezies ließen sich ebenso Kreuzreaktionen zwischen rekombinatem Karotten-LTP und LTPs aus Brokkoli-, Apfel- und Pfirsichextrakten beobachten [Asero et al. 2000]. Weitere IgE-Kreuzreaktionen konnten zwischen dem gereinigten Pru p 3 und dem LTP aus Walnuss- und Erdnussextrakt gezeigt werden [Asero et al. 2002]. Pastorello et al. zeigten Kreuzreaktionen zwischen dem Pru p 3 mit LTPs aus Walnuss, Mais, Reis und Traube [Pastorello et al. 2000b, Pastorello et al. 2003a, Pastorello et al. 2004a]. Bei diesen Untersuchungen wurden die Kreuzreaktivitäten mittels Immunoblot-Inhibition ermittelt. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors konnte die Inhibition lediglich visuell erfasst werden. Bei allen Untersuchungen wurde entweder ein Extrakt mit gereinigtem Protein inhibiert oder umgekehrt. Eine quantitative Aussage über die Stärke der Inhibition in Prozent und der Affinität der Allergene IgE-Antikörper zu binden konnte dadurch nicht getroffen werden. Erst später wurden Kreuzreaktionen zwischen rekombinanten Pru p 3 mit dem natürlichen Orangen- (*Citrus sinensis*)-LTP Cit s 3 und mit dem natürlichen Zitronen- (*Citrus limon*)-LTP Cit l 3 quantitativ mittels „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bestimmt [Ahrazem et al. 2005]. Ebenso konnten Palacin et al. eine Kreuzreaktion zwischen Pru p 3 und Weißkohlextrakt mittels CAP-Inhibition quantitativ ermitteln [Palacin et al. 2006]. In beiden Studien zeigte Pru p 3 die stärkste Bindekapazität und erreichte maximale Inhibitionen von >70%, während Cit s 3 und Cit l 3 in einer homologen Inhibition lediglich 21% der Pru p 3-Bindung inhibieren konnten.

1.6.3 Korrelation zwischen einer Nahrungsmittel- und Pollen-LTP-Sensibilisierung

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht abschließend geklärt, ob LTPs kausal eine Nahrungsmittelallergie nach Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt auslösen können oder ob es sich um eine Kreuzreaktion infolge einer primärer Sensibilisierung

gegen Pollen-LTPs, beispielsweise solche, die vorwiegend im mediterranen Raum vorkommen, handelt.

Kreuzreaktionen der Nahrungsmittel-LTPs zu homologen Strukturen in Pollen wurden von Pastorello et al. 2002 zwischen dem Pru p 3 und dem Beifuß-(*Artemisia vulgaris*)-LTP Art v 3 beobachtet. In einem Immunoblot-Inhibitionsexperiment wurde die vollständige Inhibition der IgE-Bindung an Art v 3 durch Zugabe einer geringeren Menge von Pru p 3 im Vergleich zum homologen Allergen Art v 3 erreicht. Patienten aus dieser Studie mit einer Sensibilisierung gegen Art v 3 und Pru p 3 zeigten keine klinische Symptomatik gegen Beifußpollen, wodurch eine primäre Sensibilisierung durch Pru p 3 stattgefunden haben könnte [Pastorello et al. 2002]. In einer ELISA-Inhibition zeigten Lombardero et al. eine Inhibition von über 60% der IgE-Bindung Pru p 3 durch eine Präinkubation des Serums mit dem Beifuß-LTP Art v 3 bei der Hälfte der Patienten (3/6), während Pru p 3 umgekehrt lediglich eine Inhibition von <15% erreichte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pastorello et al. 2002 könnten diese Ergebnisse eine primäre Sensibilisierung durch Art v 3 vermuten lassen [Lombardero et al. 2004]. Keine Kreuzreaktivitäten wurden hingegen in dieser Studie zwischen Pru p 3 und dem Glaskraut-(*Parietaria judaica*)-LTP Par j 1 in ELISA-Inhibitionsexperimenten gefunden. Enrique et al. berichteten von Kreuzreaktivitäten zwischen Platanenpollen- und Nahrungsmittlextrakten. Eine Präinkubation des Serums mit dem Platanenpollenextrakt erreichte eine stärkere IgE-Inhibition im Vergleich zu den analogen Inhibitionen der Lebensmittlextrakte, wodurch eine primäre Sensibilisierung durch Platanenpollen denkbar wäre [Enrique et al. 2002]. Lauer et al. identifizierten lediglich eine partielle Korrelation zwischen einer Platanenpollen- und Pfirsich-LTP-Sensibilisierung [Lauer et al. 2007]. Die untersuchte spanische Patientengruppe beinhaltete Patienten, die entweder nur gegen Pru p 3 (16,6%) oder nur gegen Pla a 3 (16,6%) sensibilisiert waren. Eine generelle Aussage über das primär sensibilisierende Agens konnte demnach nicht getroffen werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass partielle Kreuzreaktivitäten zwischen Lebensmittel- und Pollen-LTPs gefunden wurden. Eine Aussage über eine einheitliche Tendenz zur stärkeren IgE-Bindungskapazität ist anhand der derzeitigen verfügbaren Ergebnisse weder für die Lebensmittel- noch für die Pollen-LTP-Gruppe möglich. Es gibt keine eindeutigen Daten zu einer möglichen Korrelation zwischen

der Sensibilisierung gegen Pollen- und Nahrungsmittel-LTPs, so dass die Frage zur Fähigkeit der einzelnen LTPs kausal eine Allergie auszulösen weiterhin offen bleibt. Die Untersuchungen dieser Arbeit fokussieren sich auf die Lebensmittelallergene und sollen anhand der Untersuchungen der IgE-bindenden Eigenschaften Hinweise auf die Fähigkeit dieser Allergene eine Allergie kausal auszulösen bringen. Aufgrund der besonders interessanten klinischen Daten stand die Salatallergie im Vordergrund.

2. Zielsetzung und Arbeitskonzept

2.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist aufgrund des interessanten klinischen Bildes der Salatallergie die Identifizierung von Lipidtransfer-Protein-Isoformen aus Salat (1), sowie die Untersuchung der molekularen Eigenschaften (2), der klinischen Relevanz (3), der Kreuzreaktivität, Immunogenität und biologischen Potenz (4) von LTPs aus Lebensmitteln.

(1) Identifizierung weiterer LTPs

LTPs sind im mediterranen Raum als Hauptallergene beschrieben worden, die schwere Symptome auslösen und somit eine große Gefährdung für Allergiker darstellen. Aus diesem Grund ist die Charakterisierung weiterer LTPs von großer Bedeutung. Ziel der Arbeit soll die Identifizierung von weiteren LTP-Isoformen aus Salat sein.

(2) Molekulare Charakterisierung

Zu Beginn der Arbeit wurde vermutet, dass eine hohe Stabilität der LTPs die Aufnahme von intakten Allergenen über den gastrointestinalen Trakt begünstigt und einen möglichen Grund für die schwere Symptomatik liefern könnte. Zur Untersuchung der molekularen Eigenschaften der LTPs soll, neben der Massen- und Sekundärstrukturanalyse der gereinigten Proteine, die Stabilität unter Hitzeeinwirkung untersucht werden.

(3) Klinische Relevanz

Zur Untersuchung der klinischen Relevanz der LTPs soll die Häufigkeit und Stärke der IgE-abhängigen Sensibilisierungen bestimmt und in Korrelation mit den beschriebenen Symptomatiken gesetzt werden. Die klinische Relevanz von weiteren LTPs ist für den Bereich der *in vitro* Diagnostik von großer Bedeutung, weshalb die Charakterisierung weiterer LTPs ebenso ein Ziel dieser Arbeit ist.

LTPs gehören einer Multigenfamilie an, wodurch eine große Anzahl von Isoformen vorkommen können, die jedoch nicht alle zwangsläufig eine Rolle bei der Allergieentwicklung spielen [Gao et al. 2004]. Ein Vergleich von mindestens zwei LTP-Isoformen aus Salat, die aus Vorarbeiten zur Verfügung stehen, soll Aufschluss

über mögliche Unterschiede in der klinischen Relevanz und biologischen Potenz geben.

(4) Kreuzreaktivität, Immunogenität und biologische Potenz

Es wird vermutet, dass LTPs eine IgE-Sensibilisierung über den oralen Weg induzieren können [Pastorello et al. 2004b]. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob jedes Nahrungsmittel-LTP die Fähigkeit besitzt eine IgE-Sensibilisierung auszulösen oder ob ein LTP als primär sensibilisierendes Agens wirkt und nachfolgend immunologische Kreuzreaktionen zu anderen LTPs auftreten. Aufgrund der hohen Prävalenz von Patienten mit einer Pfirsichallergie im mediterranen Raum mit einer Sensibilisierung gegen das Pfirsich-LTP (Pru p 3), sowie einer schweren Symptomatik, wird vermutet, dass dieses Allergen eine wichtige Rolle spielt und eventuell als primär sensibilisierendes Agens fungieren könnte. Zur Identifizierung eines primär sensibilisierenden Agens soll das Ausmaß der Antikörper-Kreuzreaktivität, das Aufschluss über die Affinität und Vorkommen gemeinsamer Epitope liefern soll, untersucht werden. Weiterhin sollen die IgE-Prävalenz der einzelnen Allergene, ihre Immunogenität (T-Zell-Kreuzreaktivität und *in vivo* Antikörperinduktion) und die biologische Potenz untersucht werden.

Um diesen Fragestellungen nachzugehen sollen die LTPs aus Kirsche, Pfirsich, Haselnuss und Salat gereinigt und in den Untersuchungen eingesetzt werden.

Die höchste IgE-Prävalenz, die stärkste IgE-Bindekapazität, das Vorkommen der gesamten IgE-Epitope der LTPs, die stärkste T-Zell Proliferation und die stärkste biologische Potenz eines untersuchten LTPs, weisen auf ein primär sensibilisierendes Agens hin.

Für die Untersuchungen ist eine repräsentative Patientengruppe aus dem mediterranen Raum mit Allergien gegen Pfirsich, Salat, Haselnuss und Kirsche zu rekrutieren.

2.2 Arbeitskonzept

Identifizierung von Allergenen aus Salat

Um das Spektrum der zu untersuchenden LTPs zu erweitern soll eine cDNA-Expressionsbibliothek aus Salat hergestellt und serologisch gescreent werden. Mittels so genannter „5' Rapid Amplification of cDNA Ends“ (5'RACE) (PCR-Methode) ist es möglich von identifizierten cDNA-Partialfragmenten, das noch unbekanntes 5'-Ende zu komplettieren. Neben der Identifizierung von LTPs aus Salat sollen zusätzlich weitere Salatallergene durch diese Methode gefunden werden. In diesem Kontext sollten das Sensibilisierungsmuster, die Häufigkeit der Sensibilisierung und das Vorkommen von IgE-reaktiven Glykoproteinen unter den identifizierten Allergenen untersucht werden. Zusätzlich soll die subjektive Aussage spanischer Patienten mit Salatallergie, stärker gegen jüngere Salatblätter allergisch zu reagieren, durch einen Vergleich der IgE-Reaktivität einiger Patientenserum auf Salatextrakt von inneren und äußeren Salatblättern überprüft werden.

Im ersten Schritt sollen unterschiedliche Salatvarietäten auf mögliche Unterschiede im Proteinmuster und Expression von IgE-reaktiven Allergenen untersucht werden. Das Proteinmuster wird dazu mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Mittels Immundetektion soll das Muster der IgE-Reaktivität gegen die beiden Varietäten Kopfsalat und Mini-Romanasalat analysiert werden. Diese beiden Salatsorten wurden aufgrund der Aussagen von spanischen Patienten über stärkere allergische Reaktionen nach dem Verzehr von Mini-Romanasalat ausgesucht. Sofern keine deutlichen Unterschiede beobachtet werden, soll eine der Varietäten für weitere Analysen verwendet werden.

Reinigung der LTPs

Für die Expression der LTPs (*Pru p 3* (Pfirsich), *Pru av 3* (Kirsche), *Cor a 8* (Haselnuss), *Lac s 1.1* und *Lac s 1.2* (Salat)) soll das eukaryotische Hefeexpressionssystem *P. pastoris* verwendet werden. Dieses System verfügt über die Möglichkeit der Proteinsekretion und der posttranslationalen Modifikation der Proteine, wie die N- und O-Glykosylierung, sowie die Fähigkeit Disulfidbrückenbindungen besser ausbilden zu können [Eckart et al. 1996]. Es war bekannt, dass dieses Expressionssystem im Vergleich zu prokaryotischen Systemen größere LTP-Proteinmengen produziert und keine Multimerisierung der Proteine beobachtet wurde

[Diaz-Perales et al. 2002a]. Die in den Kulturüberstand sezernierten Proteine sollen nach Abspaltung des Sekretionssignalpeptids chromatographisch gereinigt werden. Führt diese Expressionsstrategie nicht zum gewünschten Resultat, soll das betroffene LTP in einem prokaryotischen *E. coli*-Expressionssystem oder aus dem entsprechenden Lebensmittel isoliert werden. Es wurde eine erfolgreiche Durchführung der Expression des Kirsch- und Haselnuss-LTPs mittels prokaryotischem *E. coli*-Expressionssystem, sowie der Isolierung des natürlichen Pfirsich-LTPs aus Pfirsichschalen beschrieben [Pastorello et al. 1999a, Scheurer et al. 2001a, Schocker et al. 2004].

Biochemische Charakterisierung der LTPs

Für qualitative und quantitative Vergleichsanalysen der LTPs ist die intakte Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus-Spektroskopie zu überprüfen. Die Massenbestimmung soll mittels nano ESI-Massenspektrometrie, neben der Identitätsanalyse der LTPs, unerwünschte posttranslationale Proteinmodifikationen, sowie die Abspaltung des Sekretionssignals der rekombinant hergestellten Allergene überprüfen. Zusätzlich sollen N-terminale Sequenzierungen der LTPs die Daten der Massenbestimmung bezüglich der Abspaltung des Sekretionssignals bestätigen.

Serologische und immunologische Untersuchungen

Um das spezifische IgE der rekrutierten spanischen Lebensmittelallergiker zu bestimmen, soll der so genannte Enzym Allergosorbent Test mit dem ImmunoCAP-Fluoreszenz-Enzyme-Immuno-Assay hinsichtlich der Sensitivität beider Testverfahren verglichen werden. Hierfür soll die spezifische IgE-Konzentration von mindestens zwei Allergikergruppen durch beide Testverfahren ermittelt und anschließend verglichen werden. Das Testverfahren, welches sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnet, soll zur weiteren IgE-Bestimmung der restlichen Lebensmittelallergikergruppen angewendet werden.

Im Mediatorfreisetzungstest mit basophilen Granulozyten sollen die isolierten Allergene durch die Quervernetzung der rezeptorgebundenen Antikörper und die nachfolgende freigesetzte Mediatormenge auf ihre biologische Potenz untersucht werden. Kreuzreaktivitäten von humanen IgE-Antikörpern mit LTPs aus Pfirsich, Kirsche, Haselnuss und Salat sollen zum einen durch „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“-Inhibitionen erfolgen. Andererseits sollen Mäuse mit

verschiedenen LTPs aus taxonomisch gering verwandten Lebensmitteln (Pfirsich und Haselnuss) und Pollen (Platane, Beifuss und Traubenkraut) sensibilisiert werden, um die Kreuzreaktivität kontrolliert im Modellsystem zu untersuchen. Aus Vorversuchen war bekannt, dass CBA/J Mäuse nach einer Immunisierung mit dem Haselnuss-LTP Cor a 8 eine große Menge an IgE produzierten und deshalb auch für diese Studie verwendet werden sollen [Albrecht et al. 2007]. Die Kreuzreaktivitäten auf IgE- und IgG-Ebene sollen mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest und „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“-Experimenten bestimmt werden. Zusätzlich sollen zur Bestimmung der Immunogenität die Kreuzreaktivitäten auf T-Zell-Ebene untersucht werden. Hierzu kann die Proliferation von Pru p 3 spezifischen T-Zell-Linien und Klonen durch Stimulation mit dem Kirsch-, Haselnuss- und Salat-LTP untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Chemikalien und Geräte

Liste der häufig genutzten Materialien und Geräte:

Chemikalien:	soweit nicht anders angegeben von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe)
Autoklaven:	Hochdruckdampfsterilisator (Münchener Medizin Mechanik GmbH, München), Bioclav (Schütt, Göttingen)
Magnetrührer:	RCT basic (IKA, Staufen)
pH-Meter:	SevenEasy (Mettler Toledo, Giessen)
Thermomixer:	Modell 5436 und 5437 (Eppendorf, Hamburg)
Vortexer:	MS 1 Minishaker (IKA, Staufen)
Waagen:	BL 1500 (Satorius, Göttingen), Feinwaage: MC1 (Satorius, Göttingen)
Wasserbad:	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen:	Mini Zentrifuge C-1200 (National Labnet, Woodbridge, New Jersey, USA), Sorvall Evolution RC (Kendro Laboratory Products, Hanau), Megafuge 1.0 R (Heraeus, Langenselbold), L8-70M, Rotor SW41 (Beckmann, Krefeld)
Photometer:	UV-1202 (Shimadzu, Duisburg) GeneQuant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech, Freiburg)
Speed Vac:	SPD 111V (Savant, Ramsey, MN, USA)
Transformator:	Biometra (Göttingen)
Acrylamid-Gel- elektrophoresekammer:	Mini Protean II™ (Bio-Rad, München)
Agarose-Gel- elektrophoresekammer:	Horizon 58, Horizon 11-14 (Life Technologies, Eggenstein)
Westernblottapparatur:	Mini Protean II™ (Bio-Rad, München)
Wippschüttler:	Rocking Plattform (Biometra, Göttingen)
Überkopfschüttler:	Q 03 (Heidolph, Darmstadt)

Sterilbank:	Lamin Air HB2448 (Heraeus, Langenselbold)
Bakterienschüttler:	Innova 4335 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
Hefeschüttler:	GFL (Burgwedel)
Brutschrank:	Typ B5050E (Heraeus, Langenselbold)
Kreisschüttler:	Roller Mixer SRT 2 (Stuart Scientific Co. Ltd., UK)
Transiluminator:	High Performance UV Transilluminator (UVP, Cambridge, UK)
Geldokumentdrucker:	P93DW (Mitsubishi Electric, Ratingen)
PCR-Thermocycler:	PCR System 2700 (Applied Biosystem, Weiterstadt)
Lyophilisator:	Alpha 1-4 (Christ, Osterode)
Elektroporator:	Gene Pulser + Pulse Controller (BioRad, München)
ELISA-Reader:	Spectra Max 340 PC (Molecular Devices, München)
CD-Spektrometer:	J-810S (JASCO, Groß-Umstadt)
CAP-Maschine:	ImmunoCAP100 (Phadia, Freiburg) ImmunoCAP250 (Phadia, Freiburg)
ELISA-Waschanlage:	ELX 405 (Bio Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall)
FPLC:	Äkta FPLC (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden)

3.1.2 Antikörper und Reagenzien für die Immundetektion

Primärantikörper:

Kaninchen anti-Pru p 3 Serum von Dr. D. Barber (ALK-Abello, Madrid, Spanien)
zur Verfügung gestellt

Sekundärantikörper:

Ziege anti-human IgE,
biotinyliert Klon 040564/161004
KPL, Gaithersburg, MD, USA

Maus anti-human IgE,
Meerretich Peroxidase
(HRP) gekoppelt Klon 9160-05
Southern Biotech, Birmingham, AL, USA

Ziege anti-Kaninchen IgG,
biotinyliert Klon E 0432
Dako, Hamburg

Ziege anti-Maus IgG, Sigma, Deisenhofen,
Alkalische Phosphatase (AP)
gekoppelt

Reagenzien für die Immundetektion:

Streptavidin, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
Alkalische Phosphatase (AP)
gekoppelt

„AP Conjugate Substrate Kit“ BioRad, München

3.1.3 Puffer und Lösungen

PBS: 1,5 mM KH_2PO_4
8 mM Na_2HPO_4
137 mM NaCl
3 mM KCl
pH 7,2

TBS: 50 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
pH 7,4

SM-Puffer: 100 mM NaCl
10 mM MgSO_4
50 mM Tris-HCl pH 7,5
0,01% Gelatine
autoklaviert

Top-Agarose: 1% Tryptone
0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl
0,6% Agarose
autoklaviert

DEPC-Wasser: 0,1 % Diethylpyrocarbonat in Aqua bidest gelöst
autoklaviert

Spezielle Puffer sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

3.1.4 Nährmedien

Medien für die Bakterienkultur:

LB-Medium: 1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl
pH 7,0
autoklaviert

Low Salt LB-Medium: 1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl
pH 7,0
autoklaviert

LB-Amp-Medium: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

Low Salt LB-Zeocin-Medium: LB-Medium ohne NaCl mit 25 µg/ml Zeocin

LB-Agar-Platten: 1,5% Agar in LB-Medium
pH 7,0
autoklaviert

Low Salt-Agar-Platten: 1,5% Agar in Low Salt LB-Medium
pH 7,0
autoklaviert

LB-Amp-Platten: LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Amp-X-Gal-Platten: LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und
80 µg/ml X-Galaktosid

Low Salt LB-Zeocin-Platten: Low Salt LB-Platten mit 25 µg/ml Zeocin

SOC-Medium: 2% Trypton
0,5% Hefeextrakt
8,5 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
20 mM Glukose
pH 7,0
sterilfiltriert

H-Agar-Platte: 1% Trypton
0,8% NaCl
1,5% Agar
autoklaviert

Medien für die Hefekultur:

YPD-Medium: 1% Hefeextrakt
2% Pepton
2% Dextrose
autoklaviert

YPDS-Medium: YPD-Medium mit 1 M Sorbitol
autoklaviert

YPDS-Zeocin-Medium: YPDS-Medium mit 100 µg/ml Zeocin

BMGY-Medium: 1% Hefeextrakt
2% Pepton
in 700 ml Aqua bidest lösen und autoklavieren
0,00004% Biotin
100 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 6,0
(132 ml 1 M K_2HPO_4 , 868 ml 1 M KH_2PO_4)
1,34% Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat
1% Glycerin
sterilfiltriert der autoklavierten Lösung zugeben
add 1.000 ml

BMMY: 1% Hefeextrakt
2% Pepton
in 700 ml Aqua bidest lösen und autoklavieren
0,00004% Biotin
100 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 6,0
(132 ml 1 M K_2HPO_4 , 868 ml 1 M KH_2PO_4)
1,34% Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat
1% Methanol
sterilfiltriert der autoklavierten Lösung zugeben
add 1.000 ml

YPDS-Agar-Platten: 1,5% Agar in YPDS-Medium
pH 7,0; autoklaviert

YPDS-Zeocin-Agar-Platten: 1,5% Agar in YPDS-Zeocin-Medium
pH 7,0; autoklaviert

3.1.5 Oligonukleotide

Tab. 3.1: Auflistung der benötigten Oligonukleotide (High purity salt free (HPSF) gereinigt, MWG, Ebersberg).

Sense (s) und anti-sense (as) Primer sind in den jeweiligen Abkürzungen angegeben. Farbige, fettgedruckte Bereiche kennzeichnen die Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen (**XbaI** ⇒ **TCT AGA** und **Xho I** ⇒ **CTC GAG**). Stopcodons sind **schwarz fettgedruckt**, der **CACC-Überhang** zur gerichteten Klonierung in den pET100/D-TOPO violett, fettgedruckt dargestellt.

NAME	SEQUENZ 5' → 3'
Degenerierter Primer zur Identifizierung der LTP-Isoformen aus Salat:	
LTP 8 (s)	AAG TGY GGY GTY ARC ATC CC
GSP-Primer für die 5'RACE Touchdown PCR:	
GSP1 Salat LTP (as)	CAR TCR GTG SWR GGR CTG TC
GSP2 Salat LTP (as)	GTG SWR GRC TGA TCT TGT AAG G
Salat hm rev1 (as)	ACG ATG TTT TTT TGT GTA TTT CGG GGG ACT
Salat hm rev2 (as)	CGT CCC AGT CTC TTC CCC AGT CGT GAC TCC
Primer zur Identifizierung der LTP-Isoformen aus Salat sowie zur Qualitätskontrolle der Salat cDNA-Bibliothek:	
K1 in SP (s)	GTA AAC TTG AAA AAT GGC AAG GAT GGC A
K2 cterm (as)	TCA CTG CAC CTT GGA GCA ATC AGT G
K6 ab SP (s)	TGT GAC ATG TGG TCA GGT GGT GGG CGC
K1 cterm (as)	TCA CTG GAT CCT ATT GCA GTC GGT G
Primer zur Überprüfung des Mut-Phänotypes der <i>P. pastoris</i>-Klone:	
5'AOX1 (s)	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
3'AOX1 (as)	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC
pPICZαA/Pru av 3 ohne Stopcodon:	
Pru av 3 Xho (s)	CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT CTA ACA TGT GGC CAA GTG TCC AG
Pru av 3 Xba (as)	GCT CTA GAA ACT TCA CGG TGG CGC AGT TGG TG
pPICZαA/Cor a 8 ohne Stopcodon:	
Cor a 8 Xho (s)	CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TCC CTG ACA TGC CCA CAG ATA AAA
Cor a 8 Xba (as)	GCT CTA GAA ACT TCA CGT TGT TGC AGT TGG TGG

pPICZαA/Pru av 3 mit Stopcodon (site-directed-mutagenesis):	
Pru av 3 stop for (s)	AAC TGC GCC ACC GTG AAG TGA CTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA
Pru av 3 stop rev (as)	TGA GAT GAG TTT TTG TTC TAG TCA CTT CAC GGT GGC GCA GTT
pPICZαA/Cor a 8 mit Stopcodon (site-directed-mutagenesis):	
Cor a 8 stop forw (s)	ACC AAC TGC AAC AAC GTG AAG TGA CTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA
Cor a 8 stop rev (as)	TGA GAT GAG TTT TTG TTC TAG TCA CTT CAC GGT GTT GCA GTT GGT
Amplifikation von Pru p 3-cDNA aus Pfirsich:	
Pru p 3 sense (s)	ATA ACA TGT GGC CAA GTG TCC AGC AGC
Pru p 3 antisense (as)	TCA CTT CAC GGT GGC GCA GTT GGT GGA
pPICZαA/Pru p 3 mit Stopcodon:	
Pru p 3 sense Xho (s)	CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATA ACA TGT GGC CAA GTG TCC AG
Pru p 3 as Xba (as)	GCT CTA GAA TCA CTT CAC GGT GGC GCA GTT GGT GGA
pPICZαA/Lac s 1.1 mit Stopcodon:	
Lac s 1.1 stop Xho (s)	CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATT ACC TGT GGT CAG GTG GTA AG
Lac s 1.1 stop Xba (as)	GCT CTA GAA TCA CTG CAC CTT GGA GCAATC AGT GCT
pPICZαA/Lac s 1.2 mit Stopcodon:	
Lac s 1.2 stop Xho (s)	CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TGT GAC ATG TGG TCA GGT GGT GG
Lac s 1.2 stop Xba (as)	GCT CTA GAA TCA CTG GAT CCT ATT GCA GTC GGT GGA
pET-100/D-TOPO/Pru p 3	
Pru p 3-sense-2 (s)	CAC CAT GAT CAC TTG TGG TCA GGT AAG C
Pru p 3-antisense-2 (as)	TCA CTC GAG CTT AAC GGT AGC ACA G

pET-100/D-TOPO/Lac s 1.1	
pET100Lac s 1.1sen (s)	CAC CAT TAC CTG TGG TCA GGT GGT AAG T
pET100Lac s 1.1as (as)	TCA CTG CAC CTT GGA GCA ATC AGT GCT
pET-100/D-TOPO/Lac s 1.2	
pET100Lac s 1.2sen (s)	CAC CTG TGA CAT GTG GTC AGG TGG TGG G
pET100Lac s 1.2as (as)	TCA CTG GAT CCT ATT GCA GTC GGT GGA

3.1.6 Vektoren

Tab. 3.2 : Liste der eingesetzten Klonierung- und Expressions-Vektoren.

VEKTOR	GRÖÖE	FIRMA
pET-100/D-TOPO	5,8 Kb	Invitrogen
pPICZαA	3,6 Kb	Invitrogen
pGEM-T Easy	3,0 Kb	Invitrogen
pET-16b	5,7 Kb	Invitrogen
pSCREEN-1b(+)	4,1 Kb	Novagen
pCR 4-TOPO	3,9 Kb	Invitrogen

3.1.7 RNA/DNA- und Proteinmarker

RNA-Marker:

0,1-1Kb RNA Markers Promega	Promega, Medison, WI, USA
0,1-1Kb Perfect RNA Markers	Novagen, Darmstadt

DNA-Marker:

1 Kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
100 Bp Ladder	New England Biolabs

Protein-Marker:

SeeBlau Plus 2	Invitrogen, Karlsruhe
Mark 12	Invitrogen

3.1.8 Bakterien- und Hefestämme

Escherichia coli DH5α:	Gibco BRL, Karlsruhe
Escherichia coli BL21 (DE)3:	Gibco BRL

Escherichia coli Origami (DE)3:	Gibco BRL
Escherichia coli Origami (DE)3 pLys:	Gibco BRL
Escherichia coli ER1647:	Novagen, Darmstadt
Escherichia coli BM25.8:	Novagen
Pichia pastoris, Wildtyp x-33, Mut+:	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.9 Patientenseren

Die Patientenseren wurden aufgrund der anamnestischen Daten, einem positiven Hauttest bzw. einer positiven serologischen CAP-Fluoreszenz-Enzyme-Immuno-Assay-(FEIA)-Messung (3.3.12.3) auf den jeweiligen Lebensmittelextrakt ausgewählt. Es wurden spezifisch Patienten mit einer Pfirsich-, Kirsch-, Haselnuss- oder Salatallergie rekrutiert. Die Seren von spanischen Patienten wurden von Frau Dr. med. M. San Miguel Moncin und Frau Dr. med. A. Cistero-Bahima aus Barcelona, Spanien (Allergy Department of the Institut Universitari Dexeus) erhalten. Eine Liste der insgesamt 51 Seren, inklusive Anamnese und serologischen Daten der Patienten, befindet sich im Anhang (Tab. 9.1.1). Es erfolgte eine Einteilung in Salat-, Pfirsich, Kirsch und Haselnussallergiker. Weitere bekannte Lebensmittelallergien wurden ebenfalls aufgelistet (Tab. 9.1.2). 40 der 51 Lebensmittelallergiker berichteten von einer zusätzlichen Platanenpollenallergie. Die Anamnese wurde nach Patientenberichten festgehalten und in der Tabelle unter Symptome aufgelistet. Das Alter wurde in Jahren zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme angegeben.

Weitere Seren von deutschen Salatallergikern wurden von der Uniklinik Würzburg von Frau Dr. med. S. Schäd und der Uniklinik Hannover von Herrn Prof. Dr. T. Werfel erhalten. Drei deutsche Seren von Salatallergikern (UR, AG von der Uniklinik Würzburg und DG von der Uniklinik Hannover) wurden durch Immunoblot (3.3.7) und CAP-FEIA-Bestimmungen (3.3.12.3) mit Salatextrakt analysiert und sind nicht tabellarisch aufgeführt. Der Patient UR zeigte im Hauttest positive Reaktionen gegen Kopfsalat, Endiviensalat, Romana Salatherzen, Chicoree und Lollo rosso. Er berichtete von Urtikaria, Angioödem, Engegefühl im Hals und Schweißausbruch nach dem Verzehr von Endiviensalat, während diese Symptome nach dem Verzehr von Kopfsalat und Chicoree ausblieben. Allergische Reaktionen nach dem Verzehr von Romana Salatherzen oder Lollo rosso sind unbekannt. Zusätzliche Sensibilisierungen gegen Fisch, Sojamehl, Tomate, Orange, Haselnuss, Erdnuss,

Walnuss, Mandel, Senfkörner, Paprikagewürz und Currymischung konnten ebenfalls durch einen positiven Hauttest detektiert werden. Der Patient AG bekam nach Kontakt mit Salat, wie Kopfsalat, Endivien, Feldsalat, Chinakohl, Lollo rosso und Eisbergsalat, Urtikaria an den Händen. Nach dem Verzehr dieser Salate litt der Patient unter dem oralen Allergie Syndrom (OAS). Ein positiver Hauttest konnte bei Kopfsalat, Endiviensalat, Romana Salatherzen, Chicoree und Lollo rosso detektiert werden. Der Patient DG erlitt anaphylaktische Reaktionen nach dem Verzehr von Kopfsalat und zeigte positive Reaktionen im Hauttest. Kontrollseren von Nichtallergikern standen aus der Serumbank des Paul-Ehrlich-Instituts (Langen) zur Verfügung.

Für T-Zell Proliferationsstudien (4.5.6) wurden mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus dem Vollblut von Patienten mit einer Pflanzallergie und Sensibilisierung gegen Pru p 3 isoliert. Das Patientenblut wurde von Herrn Dr. A. Mari (Experimental Allergy Unit IDI-IRCCS, Rom, Italien) erhalten.

3.1.10 Proteine

Natürliches Pla a 3 aus Platanenpollen wurde mittels Kationen-Austausch-Chromatographie und Reverse-Phase-Chromatographie gereinigt (Frau Dr. I. Lauer, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) [Lauer et al. 2007].

Die beiden Pollen LTPs, nArt v 3 und nAmb a 6, wurden aus Beifuß- bzw. Traubenkrautpollen gereinigt (Prof. Dr. F. Ferreira, Paris-Lodron Universität Salzburg, Österreich).

3.1.11 Software

Tab. 3.3: Verwendete EDV-Programme.

VERWENDETE PROGRAMME	ANWENDUNG
GraphPad Prism, Version 4.03	Statistische Auswertungen (Abb. 4.32)
SigmaPlot 10.0	Graphische Darstellungen (Abb.: 4.28, 4.27, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36 und 4.37)
UNICORN 4.10	FPLC-Software (Chromatogramme)
Microsoft MS Office	Text, Tabellen und Abbildungen
DataAnalysis for LC/MSD-Trap, Agilent	Auswertung der Massenspektren

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*/*P. pastoris*

Aliquots eingefrorener Bakterien-Glycerinstocks oder frischer Bakterienkolonien wurden in ca. 5 ml LB-Medium oder LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Bakterienschüttler herangezogen. Hefen wurden in YPDS-Medium oder YPDS-Medium mit der entsprechenden Antibiotikumresistenz überführt und bei 30°C über Nacht und 200 rpm in einem Schüttler, der ausschließlich für die Kultivierung von Hefen verwendet wurde, kultiviert.

3.2.2 Proteinexpression mittels Expressionsvektor pPICZ α A in *P. pastoris*

Der verwendete Hefestamm *Pichia pastoris* besitzt als eukaryotisches Zellsystem die Fähigkeit Proteine posttranslational zu modifizieren (N- und O-Glykosilierungen) und intramolekulare Disulfidbrücken auszubilden. *Pichia pastoris* ist eine methylotrophe Hefe und besitzt somit die Eigenschaft Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Durch das Enzym Alkoholoxidase wird hierbei Methanol zu Formaldehyd oxidiert. Diese Reaktion läuft in Peroxisomen der Zelle ab. Durch das Kompartiment ist die Zelle vor dem toxisch anfallenden Nebenprodukt (Hydrogenperoxid) der Oxidationsreaktion durch die räumliche Trennung geschützt.

Pichia pastoris besitzt zwei Gene die für die Alkoholoxidase kodieren, das AOX1- und AOX2-Gen. Das AOX1-Gen ist im Gegensatz zum AOX2-Gen für die Mehrheit der Alkoholoxidase-Aktivität der Zelle zuständig. Die Expression des AOX1-Gens unterliegt einer starken Regulation und Induktion durch Methanol, während es durch Glukose reprimiert wird. Verantwortlich für die Regulation ist der vorgeschaltete PAOX1 Promotor, der bei dem verwendeten eukaryotischen Expressionsvektor pPICZ α A (Abb. 3.1) die Transkription des inserierten Gens reguliert. Zusätzlich besitzt der Vektor einen N-terminalen α -Faktor, aufgrund dessen das reife Protein in den Kulturüberstand transferiert. Dieser Faktor befindet sich direkt vor der Multiple Cloning Site und somit am N-terminalen Ende des Proteins. Er wird anschließend von hefespezifischen Endonukleasen an der Kex2 Erkennungsstelle abgespalten, so dass lediglich vier zusätzliche Aminosäuren (EAEA) am N-Terminus des Zielproteins verbleiben. Ebenso ermöglicht der Vektor die Produktion eines Fusionsproteins mit

einem C-terminalen c-myc und Histidin-Tag, der durch das Fehlen einer Vektor-kodierten Endonukleaseschnittstelle nicht abgespalten werden kann. Zur Selektion von positiven Klonen beinhaltet der Vektor ein Zeocin-Resistenz-Gen.

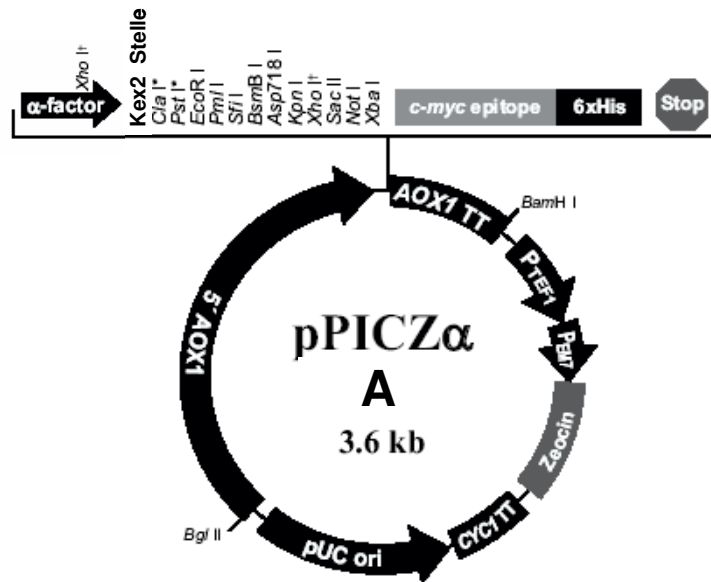


Abb. 3.1: Vektorkarte des eukaryotischen Proteinexpressionsvektors pPICZ α A.

3.2.3 Rekombination und Integration von pPICZ α A-LTP-cDNA in *P. pastoris*

Der verwendeten Expressionsvektor pPICZ α A besitzt eine 5'AOX1- und eine 3'AOX1-Promotorsequenz. Nach enzymatischer Linearisierung der pPICZ α A/LTP-Konstrukte durch das Restriktionsenzym Sac I (3.2.18) erfolgte die Transformation in *P. pastoris* (3.2.5). Der linearisierte Vektor kann durch zwei verschiedene Ereignisse in das *P. pastoris*-Genom integriert werden. Zum einen kann ein einmaliges „Crossover“ in dem 5'AOX1-Promotorbereich stattfinden, wodurch es zu einer Insertion des Vektors in das Hefegenom kommen würde (Abb. 3.2 A). Hierbei bleibt das AOX1-Gen in dem Hefegenom enthalten. Aufgrund dessen würden die Transformanten zu den so genannten Mut⁺-Phänotypen zählen. Bei einem Gene-Replacement findet zwischen dem Vektor und dem Genom ein „Crossover“ am 5'AOX1-Promotorbereich und dem 3'AOX1-Promotorbereich statt (Abb. 3.2 B). Als Folge dessen wird die AOX1-kodierende Region deletiert. Hieraus resultiert, dass das Hefegenom nur noch das AOX2-Gen für den Methanolabbau zur Verfügung hat. Diese Transformanten können nur langsam in methanolhaltigem Medium wachsen und gehören zu den Mut^s-Phänotypen.

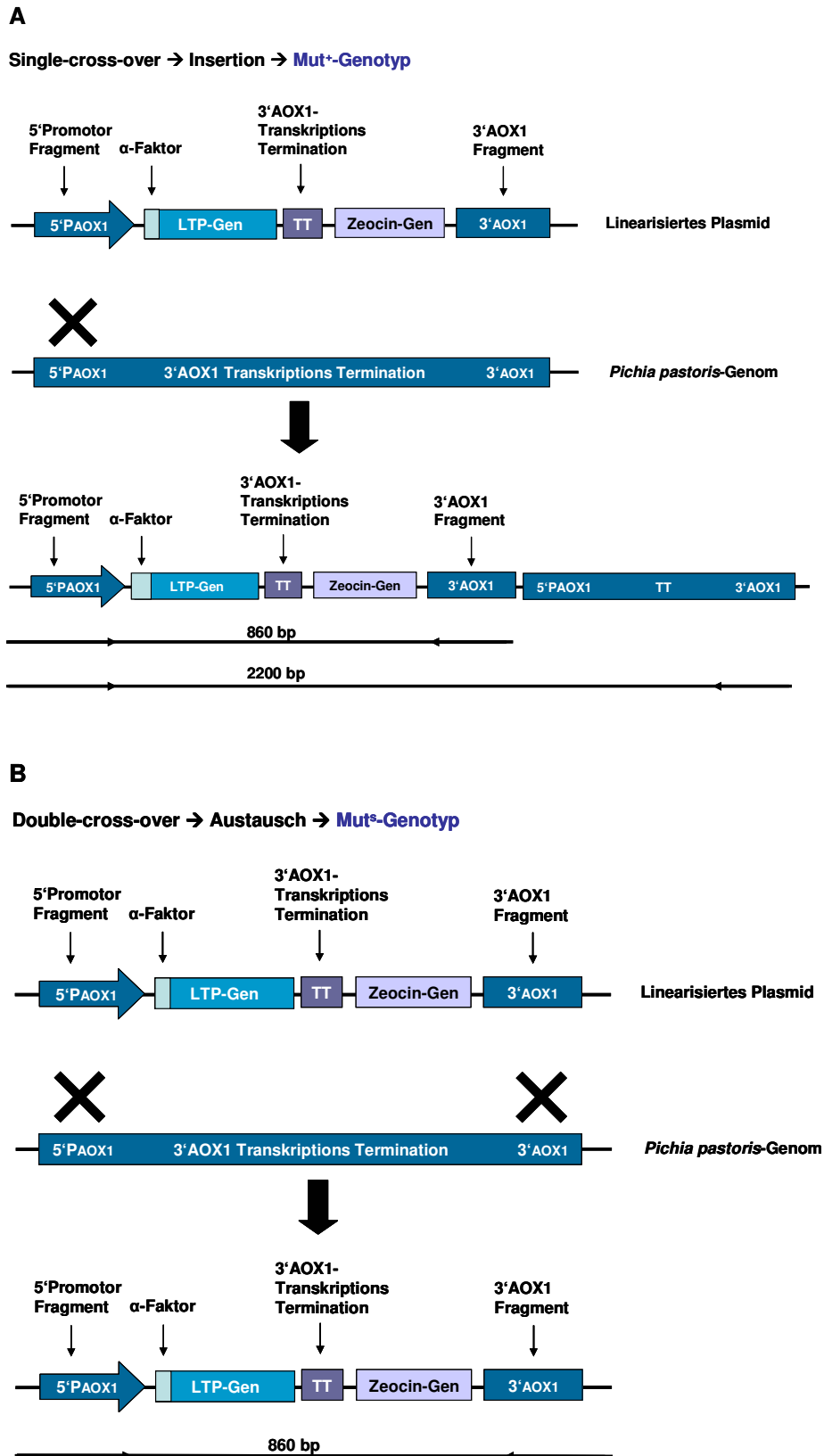


Abb. 3.2: Darstellung der Integration von rekombinanter DNA (pPICZαA/LTP) in das Hefegenom über Insertion der Fremd-DNA (A) oder durch Austausch mit dem AOX1-Gens (B).

α-Faktor: Sekretions-Signalsequenz; 3'-AOX1 Transkriptions Termination: Terminationssequenz für die RNA-Polymerase

3.2.4 Herstellung von elektrokompetenten *P. pastoris*

5 ml YPD-Medium wurden mit dem Wildtypstamm *P. pastoris* x-33 angeimpft und über Nacht bei 30 °C bei 200 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden 500 ml frisches YPD-Medium mit 25 µl der angewachsenen Übernachtskultur angeimpft und erneut über Nacht inkubiert. Die Zellkultur sollte eine OD₆₀₀ von 1,3-1,5 erreichen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 500 g, 4 °C) und in 500 ml sterilem Wasser (1 °C) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 250 ml 1 M Sorbitol (1 °C) resuspendiert. Anschließend erfolgte ein letzter Waschschrift durch Zentrifugation und Resuspension in 20 ml 1 M Sorbitol (1 °C). Nach Abzentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol (1 °C) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Die mehrmaligen Waschschriffe sind notwendig um die Salze, die die Leitfähigkeit einer folgenden Elektroporation beeinflussen würden, in der Zellsuspension zu entfernen.

3.2.5 Transformation von *P. pastoris*

Für eine effiziente Transformation wurden 5 µg DNA der pPICZαA/LTP-Konstrukte durch einen *Sac* I-Restriktionverdau linearisiert (3.2.18). Es folgte eine Reinigung der DNA mittels Phenol-Chlorophorm-Extraktion (3.2.16). Anschließend wurden 80 µl der salzfreien *P. pastoris* Zellsuspension (3.2.4) mit 5 µg linearisierter DNA in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette mit einer Wandstärke von 0,2 cm für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω in einem Gene Pulser (BioRad, München). Nach sofortiger Zugabe von 1 ml 1 °C kaltem 1 M Sorbitol wurden die Zellen für 2 h bei 30 °C in einem sterilen 15 ml Röhrchen (Greiner, VWR, Merck, Darmstadt) inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Aliquots (50 µl, 100 µl, 200 µl und 500 µl) des Transformationsansatzes auf YPDS-Agar-Platten ausplattiert und für mindestens 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Mut-Phänotyps einzelner Kolonien mittels Kolonie-PCR (3.2.6).

3.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) einzelner Kolonien von *P. pastoris*

Zur Überprüfung der integrierten pPICZαA/LTP-Konstrukte in das *P. pastoris*-Genom wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde ein Aliquot einer *P. pastoris*-Kolonie in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 1,5 min in der Mikrowelle bei

600 Watt erhitzt, um die Zellwand zu zerstören. Die frei vorliegende DNA konnte anschließend in 10 µl Aqua bidest resuspendiert werden. 1 µl dieser Suspension wurde in die PCR eingesetzt (3.2.23). Als Oligonukleotide wurde der 5'AOX1- und 3'AOX1-Primer (Tab. 3.1) eingesetzt.

3.2.7 Induktion der Proteinsynthese in *P. pastoris*

3.2.7.1 Induktion der Proteinsynthese eines Mut^S-Phänotypen

Methanol: 5% Methanol (v/v); sterilfiltriert

Hefestamm: *Pichia pastoris* x-33 (Invitrogen, Karlsruhe)

Der eukaryotische Expressionsvektor pPICZαA/LTP ist mittels Transformation (3.2.5) in die Hefezellen eingeschleust worden und durch homologe Rekombination im Genom integriert worden (3.2.3). Die Zellen wurden anschließend auf YPDS-Platten ausplattiert. Eine Einzelkolonie wurde gepickt und eine 100 ml Übernachtskultur in BMGY-Medium angelegt. Nachdem eine $OD_{600} \geq 1,5$ erreicht wurde, wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (1.500 g, 5 min, 20°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, während die Zellen in 10 ml methanolhaltigem BMMY-Medium resuspendiert wurden. Der dem Zielprotein vorgeschaltete PAOX1-Promotor regulierte die Induktion der Proteinsynthese und wurde durch die Zugabe von Methanol aktiviert. Die Zellen wurden bei 30°C und 200 rpm für 5 Tage (120 h) im Schüttler inkubiert. Die Methanolkonzentration wurde alle 24 h auf 0,5% (v/v) durch Zugabe von 100% Methanol eingestellt. Durch Zentrifugation (1.500 g, 5 min, 20°C) wurde der Kulturüberstand isoliert und die enthaltenen Proteine wurden anschließend mittels Affinitätschromatographie (3.3.2.1 und 3.3.2.2) aufgereinigt.

3.2.7.2 Induktion der Proteinsynthese eines Mut⁺-Phänotypen

Die Durchführung der Induktion der Proteinsynthese entsprach der Induktion der Mut^S-Phänotypen. Lediglich die Menge des Inkubationsmediums variiert. Mut⁺-Phänotypen wurden in 25 ml BMGY-Medium angeimpft und nach dem Zentrifugationsschritt in 200 ml BMMY-Medium resuspendiert.

3.2.8 Proteinexpression mittels Expressionsvektor pET100/D-TOPO in *E. coli*

Der verwendete Proteinexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) besitzt das Gen für die T7-RNA-Polymerase, das durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG) induziert wird. Durch die Bindung von IPTG an einen so genannten *lac* I-Repressor verliert dieser durch eine folgende Konformationsänderung die Fähigkeit weiterhin an die DNA-Sequenz des *lac* I-Operators zu binden. Das T7-RNA-Polymerase-Gen kann folgend in mRNA transkribiert und translatiert werden. Die T7-RNA-Polymerase induziert die Proteinexpression durch die Bindung an den T7-Promotor, der dem inserierten Zielprotein-Gen vorgeschaltet ist (Abb. 3.3). Durch die Präsenz einer konjugierten Topoisomerase kann das zu inserierende Gen direkt in den Vektor ligiert werden. Die gerichtete Integration des Gens wird durch einen 5'-CACC-Überhang der DNA ermöglicht. Die Selektion von positiven Klonen erfolgt über ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Der Vektor pET100/D-TOPO ermöglicht die Produktion eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen Histidin-Tag (6xHis), der durch eine Enterokinaseschnittstelle (EK) abgespalten werden kann.

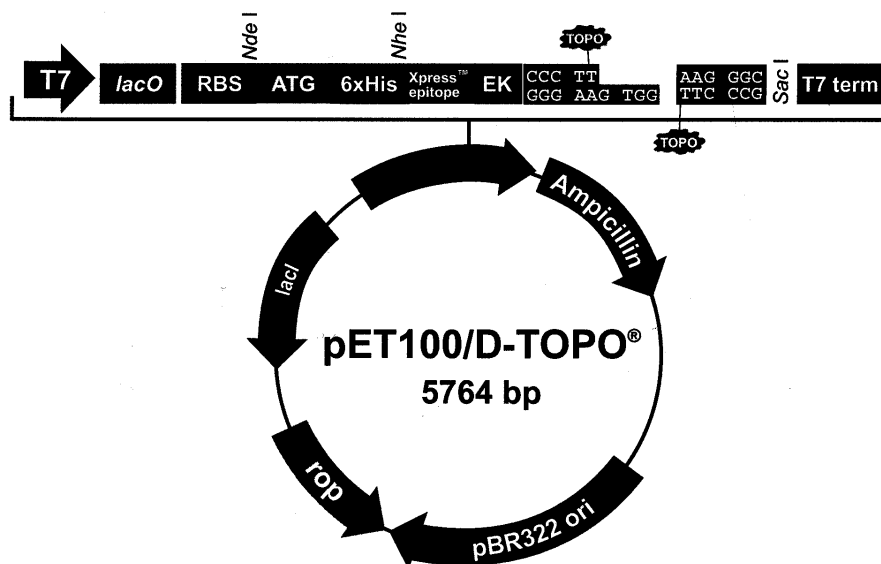


Abb. 3.3: Vektorkarte des prokaryotischen Proteinexpressionsvektors pET100/D-TOPO.

3.2.9 Transformation von *E. coli*

50 µl chemisch kompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-10 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert, wobei sich die DNA an die Bakterienzellwand anlagerte. Nach dem Hitzeschock von 45-90 Sekunden bei 42°C erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis von 2 min. Bei diesem Schritt werden die Bakterien einer Stresssituation ausgesetzt, die es ihnen ermöglicht die angelagerte DNA aufzunehmen. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 225 rpm im Bakterienschüttler vermehrt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 2500 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Bakterienpellet wurde im restlichen SOC-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, um positive Klone zu selektionieren (3.2.10). Die ausgestrichenen Platten wurden bei 37°C über Nacht oder bei Raumtemperatur über mehrere Tage inkubiert. Anschließend konnten einzelne Kolonien mit einer Impföse in Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt werden (3.2.1).

3.2.10 Selektion positiver Klone

Die Selektion der positiven Klone erfolgte durch den jeweiligen Selektionsmarker, der sich auf dem verwendeten Plasmid befand. Häufig kodiert ein solcher Selektionsmarker für eine spezifische Antibiotikaresistenz. Eine zusätzliche Selektion konnte mittels der so genannten Blau-weiß-Selektion (α -Komplementation) erreicht werden. Hierbei enthält der verwendete Vektor (z.B. pGEM T-easy) neben dem Gen für die Antibiotikaresistenz zusätzlich das *lacZ*-Gen als Selektionsmarker. Die Klonierungsstelle liegt dabei innerhalb des *lacZ*-Gens. Wird ein DNA-Fragment in den Vektor kloniert, kommt es zur Unterbrechung des *lacZ*-Gens, das dadurch inaktiviert wird. *LacZ'* kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase, das alleine keine β -Galaktosidase-Aktivität besitzt. Wird das α -Fragment zusammen mit dem C-terminalen ω -Fragment exprimiert, wird funktionelle β -Galaktosidase-Aktivität hergestellt. Dieser Vorgang wird als α -Komplementation bezeichnet. Bakterienkolonien, in denen das *LacZ*-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört ist, bleiben nach einer Inkubation mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) weiß, während Klone ohne Insert das α -Fragment exprimieren und sich blau färben. Das Enzym setzt bei der Reaktion das farblose Substrat X-Gal durch

Abspaltung des Zuckerrestes in einen blauen Farbstoff (5-Brom-4-chlor-3-indigo) um. Weitere Selektionsmethoden stellen die Kolonie-PCR bei *P. pastoris* (3.2.6), die cDNA-Sequenzierung (3.2.25) und der analytische Verdau der Plasmid DNA (3.2.18) dar.

3.2.11 Einfrieren der positiven Klone

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* oder *P. pastoris* wurde mit ca. 20-30% Glycerin versetzt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.12 Induktion der Proteinsynthese in *E. coli*

IPTG:	1 M Stammlösung; sterilfiltriert
Bakterien:	<i>E. coli</i> BL21-(DE3) (Novagen, Darmstadt) <i>E. coli</i> Origami (DE)3 (Gibco BRL, Karlsruhe) <i>E. coli</i> Origami (DE)3 pLys (Gibco BRL)
Medium:	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

Ein prokaryotischer Expressionsvektor (pET100/D-TOPO mit der cDNA von Pru p 3, Lac s 1.1 und Lac s 1.2) wurde mittels Transformation (3.2.9) in die Bakterienzellen eingeschleust. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie gepickt und eine 10 ml Übernachtskultur angelegt. Ein Liter LB-Medium wurde mit der frischen Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:100 angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 225 rpm im Bakterienrührer inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,5-0,7$ befanden sich die Zellen in der log-Phase und wurden mit Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und nach 5 Stunden geerntet. Hierfür wurden die Zellen in 250 ml Zentrifugenbecher (6 x 150 ml) pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Das exprimierte Zielprotein konnte anschließend mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (3.3.2.3) isoliert werden. Eine Besonderheit der *E. coli* Origami-Stämme sind Mutationen in zwei Genen, die für die Thioredoxin Reduktase und die Glutathion Reduktase kodieren. Dadurch entsteht ein oxidatives Milieu im Zytoplasma, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht und die Ausbeute löslicher und aktiver disulfidverbrückter Proteine deutlich erhöht. Das zusätzliche Lysomzymgen (Lys) des *E. coli* Origami (DE)3 pLys-

Stammes, dessen Produkt bei der Zerstörung der Zellmembran nach einer Zellyse mitverantwortlich ist, soll dadurch helfen die Proteinausbeute zu erhöhen.

3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Die in Bakterien eingeschleuste rekombinante DNA kann mit Hilfe der Plasmidpräparation gewonnen werden. Für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab wurden 2 ml einer Übernachtskultur verwendet (Mini-Präparation), während 50 ml zur Gewinnung einer größeren DNA-Menge eingesetzt wurden (Midi-Präparation). Mit Hilfe des „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ bzw. des "Qiagen Plasmid Midi Kit" der Firma Qiagen (Hilden) wurde nach den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Die Säulen enthalten ein Anionen-Austauscher-Material auf Silicabasis, die die in dem Zellysat enthaltene DNA bindet. Bei der Plasmid-Mini-Präparation bindet die DNA unter hoher Salzkonzentration an das Anionen-Austauscher-Material der Säule und wird durch Erniedrigung der Salzkonzentration mit Aqua bidest eluiert. Bei der Plasmid-Midi-Präparation bindet die DNA hingegen unter niedriger Salzkonzentration und wird durch Erhöhung der Konzentration eluiert. Anschließend folgte eine photometrische Bestimmung der DNA-Menge (3.2.15).

3.2.14 RNA-Isolierung aus Kopfsalat mittels RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Die RNA-Isolation aus Kopfsalat zur Identifizierung der Isoformen Lac s 1.1 und Lac s 1.2 erfolgte mittels RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Es wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die RNA wurde im letzten Schritt in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

3.2.15 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA

Nukleinsäure-Konzentrationen konnten mittels Ultraviolettabsorptionsspektrometrie sehr exakt gemessen werden. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer Nukleinsäure-Lösung absorbiert wird, verhält sich proportional zum Nukleinsäure-Gehalt. Die Absorption wurde bei 260 nm gemessen. Die Messung erfolgte mit 7 µl Probenvolumen und einer Schichtdicke von 0,5 cm. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger RNA bei einer Schichtdicke von 1 cm. Die Reinheit

einer Nukleinsäure ließ sich an dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) abschätzen. Ein hoher Reinheitsgrad weist ein Verhältnis von 1,8 auf, während geringere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen hinweisen.

3.2.16 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol-Chloroform: Phenol, Chloroform, Isomylalkohol (50:50:1)

Chloroform-Isoamylalkohol: Chloroform, Isomylalkohol (50:1)

Zur Reinigung von DNA-Lösungen wurden diese mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Lösung versetzt und etwa 1 min kräftig geschüttelt. Anschließend wurde für 2 min bei 10.500 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. In der unteren organischen Phase befanden sich die Proteine, die durch diesen Schritt von der DNA getrennt wurden. Phenolreste in der wässrigen Phase wurden durch Zugabe gleiches Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung entfernt. Erneut wurde 1 min kräftig geschüttelt und bei 10.500 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und der Rest verworfen. Es folgte eine Fällung der Nukleinsäure (3.2.17).

3.2.17 Fällung von Nukleinsäuren

Die Probe wurde mit 0,1 Volumenteil einer 3 M Natriumacetatlösung versetzt und gut geschüttelt. Es folgte eine Zugabe von 2-2,5 Volumenteil Ethanol absolut und erneutes Schütteln der Lösung. Die DNA/RNA wurde 20 min bei -20°C präzipitiert und anschließend bei 14.000 g, 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet mit ca. 1 ml 70% Ethanol gewaschen wurde, um die restlichen Salze zu entfernen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14.000 g 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der „Speed Vac“ getrocknet, um es anschließend mit einem entsprechenden Volumen Aqua bidest über Nacht bei 4°C zu lösen.

3.2.18 Restriktion von Plasmid-DNA

Verwendete Restriktionsenzyme:	<i>Xho</i> I (NEB, Frankfurt am Main), <i>Xba</i> I (NEB), <i>Sal</i> I (NEB), <i>EcoR</i> I (NEB), <i>Hind</i> III (NEB) und <i>Sac</i> I (NEB)
Puffer:	10-fach Puffer, vom Hersteller jeweils mitgeliefert
BSA:	100-fach, 10 mg/ml bovines Serum-Albumin, (NEB)

Isolierte DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen (Typ II), die jeweils spezifische Basensequenzen erkennen, geschnitten werden. Diese Restriktionsenzyme sind in der Lage, die Phosphodiester-Bindungen im doppelsträngigen DNA-Molekül zu spalten. Bei der Spaltung können 5'- bzw. 3'-glatte oder überlappende DNA-Enden entstehen. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer und gegebenenfalls BSA-Zusatz) wurden nach Angaben des Herstellers gewählt. Pro μg DNA wurden 1-2 Units Enzym zugesetzt. Die unterschiedlichen Restriktionsenzyme zeigten bei Zugabe des spezifischen Puffers 100% Aktivität. Bei gleichzeitiger Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen in einem Restriktionsansatz musste ein Puffer eingesetzt werden, der für beide Enzyme geeignet war (mindestens 80% Aktivität). Das Volumen des Restriktionsansatzes richtete sich nach der eingesetzten DNA-Menge, die nicht mehr als $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Ansatz betrug. Die Inkubationsdauer war von der DNA- und Enzymmenge abhängig. Handelte es sich um eine Kontrollrestriktion von Mini- oder Midipräparationen wurde in der Regel eine kleine DNA-Menge von ca. 500-700 ng verdaut, bei der eine Inkubationszeit von ~ 3 h ausreichte. DNA-Mengen ab $1 \mu\text{g}$ (z. B. $5 \mu\text{g}$ pPICZ α A/LTP-Konstrukte), die für anschließende Klonierungen benötigt wurden, wurden über Nacht inkubiert.

3.2.19 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

Agarose:	Agarose GTQ (Roth)
TAE-Puffer:	40 mM Tris-HCl; 5 mM NaAc; 5 mM EDTA; pH 7,8
Ethidiumbromid-Färbelösung:	10% Ethidiumbromid (w/v)
DNA-Probenpuffer (6-fach):	30% Glycerin (w/v) 0,025% Bromphenolblau (w/v)

Ein Gemisch von DNA-Fragmenten kann mit Hilfe eines Agarosegels nach Größe aufgetrennt werden. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Im elektrischen Feld laufen dabei kleinere DNA-Fragmente schneller als größere DNA-Fragmente. Diese physikalische Eigenschaft wird bei der Auftrennung von unterschiedlich großen Fragmenten genutzt. Die Größe der Fragmente wird durch einen Größenstandard, der DNA-Fragmente definierter Größe enthält, bestimmt. Für eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente wird die Konzentration des Gels entsprechend der zu erwartenden Größe des DNA-Fragmentes gewählt. Sollen sehr große DNA-Fragmente aufgetrennt werden (> 2-3 Kb), wird ein 0,8%-iges Agarosegel eingesetzt. Bei kleineren Fragmenten kann ein 1%-iges oder höher prozentiges Gel verwendet werden. Die Agarose wurde in TAE-Puffer unter Erwärmung gelöst, um anschließend ein Gel zu gießen. Die DNA wurde vor dem Auftragen in die Geltaschen mit einem DNA-Probenpuffer („*loading buffer*“) versetzt, der die Dichte der DNA-Probe erhöhte, so dass die Probe auf den Boden der Geltasche absank. Zusätzlich enthielt der DNA-Probenpuffer einen Farbstoff, wodurch die Lauffront markiert wurde. Anschließend wurde das Gel für wenige Minuten in eine Ethidiumbromid-Färbelösung gelegt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 300 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Aufgrund entstehender Strangbrüche sollte die DNA nur kurzzeitig dem UV-Licht ausgesetzt werden.

3.2.20 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung über ein Agarosegel wurde die Bande, die das gewünschte DNA-Fragment enthielt, mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die in dem Gelstück enthaltene DNA wurde mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“

(Qiagen, Hilden) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, das Prinzip wurde in Punkt 3.2.13 beschrieben.

3.2.21 Ligation von DNA

Enzym: T4 DNA Ligase (Roche)

Ligase-Puffer: 5-fach Puffer (Roche)

Bei dem Vorgang der Ligation kommt es zur Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe und der freien 3'-OH-Gruppe. Die Konzentration der beiden DNA-Fragmente wurde zuvor photometrisch bestimmt (3.2.15). Für die Ligation sollte das zu klonierende Fragment in 3-6 fachem molarem Überschuß gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt werden.

Die einzusetzende Menge des Inserts kann bei vorgegebener Vektormenge durch die folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} * \text{Insertgröße [Kb]}}{\text{Vektorgröße [Kb]}} * \text{molare Ratio Insert / Vektor}$$

In der Regel wurde nicht mehr als 0,5 µg Vektor-DNA eingesetzt. Der Ligationsansatz von 10 µl beinhaltet 0,5-1 U DNA Ligase und 2 µl Ligase-Puffer (5-fach). Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

3.2.22 Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde durch die Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase und einem Oligo-d(T)-Primer, der am Poly(A)-Schwanz der mRNA-Moleküle hybridisiert, katalysiert. Die isolierte Pfirsich- und Salat-Gesamt-RNA wurde mittels First-Strand cDNA Synthese Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers in cDNA-Moleküle umgeschrieben, die in einer nachfolgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) als Matrize zur Amplifikation genspezifischer cDNA diente.

3.2.23 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Tab. 3.4: Pipettierschema des PCR-Ansatzes.

Reagenzien	Volumen
10-fach PCR-Puffer (Applied Biosystems, Weiterstadt)	10 µl
25 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	4 µl
40 mM dNTP-Mix (Applied Biosystems)	1 µl
100 pmol/µl „Sense“-Primer	1 µl
100 pmol/µl „Antisense“-Primer	1 µl
2,5 U AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems)	0,5 µl
1 ng DNA oder 1 µl <i>P. pastoris</i> -Suspension (3.2.6)	x
Aqua bidest	add 100 µl

Ein PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Denaturiert wurde im ersten Zyklus 5 min bei 95°C in jedem folgenden Schritt 30 Sekunden. Anschließend wurde die Temperatur 30 Sekunden auf 50°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kam (Annealingschritt). Die Annealing-Temperatur wurde an die Schmelztemperatur des Primers angepasst und sollte mindestens 5°C unter dem Schmelzpunkt des Primers liegen. Nach dem Annealingschritt wurde die Temperatur für 1 min auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase, erhöht. Bei diesem Schritt wurde der Primer verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag (Elongationsschritt). Die Komplementierung lief an beiden Strängen der Template-DNA ab, so dass innerhalb eines Zyklus die Zahl der Ziel-DNA verdoppelt wurde. Wiederholte man den Zyklus, erhielt man die vierfache Menge usw. In der Regel wurden 30 Zyklen durchlaufen. Nach Beendigung der Zyklen fand für 8 min bei 72°C eine finale Elongation statt. Anschließend wurde die Reaktion bis zur Weiterverarbeitung auf 4°C gekühlt. Das Amplifikat wurde durch das Auftragen eines Aliquots auf ein Agarosegel analysiert (3.2.19). Anschließend wurde es mit dem "PCR-Purification-Kit" (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (3.2.15).

3.2.24 „Site-directed“ Mutagenesis Polymerasekettenreaktion

Punktmutationen einzelner oder mehrerer Nukleotide wurde mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene (La Jolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

3.2.25 cDNA Sequenzierung

Alle cDNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzierungen inkl. Primerwahl wurden online in Auftrag gegeben (<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl>). Anschließend wurde mindestens 0,5 µg lyophilisierte Plasmid-DNA verschickt. Die Reaktionsbedingungen wurden vom Anbieter gewählt.

3.2.26 Herstellung einer Salat cDNA-Expressionsbibliothek

Bei der Herstellung einer cDNA Bibliothek wurde gezielt nur Vollängen-cDNA isoliert und in Klonierungsvektoren integriert. Hierfür wurde aus dem Kopfsalat zuerst die Gesamt-RNA isoliert, daraus die mRNA, die dann anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Diese cDNA soll die Gesamtheit der exprimierten Gene der Salatblätter repräsentieren. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden zur Vermehrung in den pSCREEN-1b(+) Klonierungsvektor (3.1.6) ligiert und in Bakteriophagen verpackt (3.2.26.4). Bakteriophagen sind eine Gruppe von Viren, die nur Bakterien infizieren können. Durch solch eine Infektion gelangen die cDNA-Fragmente in das infizierte Bakterium, wo sie in Proteine translatiert werden.

3.2.26.1 RNA-Isolierung aus Kopfsalat mittels CsCl-Gradienten

GTC/β-Mercaptoethanol-Lösung:	4 M Guanidiniumthiocyanat (GTC)
	1% <i>N</i> -Lauroylsarcosyl
	25 mM Natriumacetat (pH 6,0)
	1 mM Natrium-EDTA
	1 M β-Mercaptoethanol (ME)
	steril ansetzen und ME erst kurz vor dem Gebrauch zusetzen

CsCl-Lösung:	5,7 M CsCl
	0,1 M EDTA
	pH 7,4
Ethanol/DEPC-Wasser	70% (v/v)

Einige Salatblätter (ca. 150 g) wurden mit DEPC-Wasser (3.1.3) gewaschen und in kleine Stücke geschnitten, die direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Anschließend wurden die gefrorenen Blätter mit einem Mörser zu feinem Pulver gemahlen und lyophilisiert (ca. 10 h). 10 g des getrockneten Materials wurden in 60 ml einer GTC/ β -Mercaptoethanol-Lösung aufgenommen und solange auf einem Magnetrührer bei 60°C inkubiert bis eine homogene Suspension vorlag. Um den Zellaufschluß zu verbessern wurde die Lösung für 10 min in einem Wasserbad bei 60°C erhitzt, dabei öfters gevortext. Anschließend wurde die Lösung in einem Corex®-Röhrchen (DuPont Instruments, Bad Homburg) bei 12.000 g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu entfernen. Jeweils 8 ml des klaren Überstands wurden vorsichtig auf 3 ml einer CsCl-Lösung in einem Corex®-Röhrchen geschichtet. Durch Zentrifugation für 18 h bei 32.000 rpm (Beckmannzentrifuge L8-70M, Rotor SW41) wurden die in der Lösung enthaltenen Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in dem CsCl-Dichtegradienten voneinander getrennt. Makromoleküle, die sich bei der Zentrifugation in der CsCl-Lösung befinden, bilden an der Stelle des Gradienten, die ihrer Dichte entspricht, eine Bande. RNA sedimentiert jedoch auf den Boden des Corex®-Röhrchens und konnte somit als Pellet von allen anderen Molekülen isoliert werden. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 200 μ l Ethanol/DEPC-Wasser dreimal gewaschen und anschließend in 300 μ l DEPC-Wasser eluiert. Es schloss sich eine RNA-Fällung an (3.2.17), wonach das luftgetrocknete Pellet erneut in 300 μ l DEPC-Wasser gelöst und bei -70°C gelagert wurde. Zur Weiterverarbeitung (3.2.26.2) wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (3.2.15).

3.2.26.2 Isolation der mRNA aus Gesamt-RNA

Mit Hilfe des „Oligotex Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) wurde nach den Angaben des Herstellers die mRNA aus der Gesamt-RNA isoliert. Ein Großteil der Gesamt-RNA besteht aus tRNA und rRNA, während die mRNA einen kleinen Teil von ca. 0,5%

ausmacht. Eukaryotische mRNAs besitzen im Gegensatz zu tRNAs und rRNAs einen Poly-A Anhang am C-Terminus. Diese Eigenschaft wird bei der mRNA-Isolationsmethode genutzt, wodurch d(T)-Oligomere an der Festphase der Säulen gebunden vorliegen. mRNA kann aufgrund ihrer Polyadenylierung an die Festphase binden, während rRNA und tRNA keine Bindungsmöglichkeiten besitzen und somit von der gebundenen mRNA getrennt werden. Die Hybridisierung der mRNA an die Festphase benötigt eine hohe Salzkonzentration und kann durch eine niedrigere Konzentration aufgehoben werden. Die Konzentration der in 20 µl DEPC-Wasser eluierten mRNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (3.2.15).

3.2.26.3 Reverse Transkription mittels „OrientExpress cDNA Kit“

Mit Hilfe des „OrientExpress cDNA Kit“ der Firma Novagen (Darmstadt) wurde nach den Angaben des Herstellers die mRNA in cDNA umgeschrieben und prozessiert. Verwendete Materialien (Oligonukleotide, Enzyme oder Säulen) wurden vom Hersteller mitgeliefert. Es wurde 50-150 ng mRNA durch reverse Transkription mit einem Oligo d(T)-Primer in cDNA umgeschrieben. Nach einer enzymatischen Herstellung von glatten 5'- und 3'-Enden der cDNA mittels T4-DNA-Polymerase, folgte eine Ligation von DNA-Fragmenten („Linker“) nach Angaben des Herstellers (Abb. 3.4). Hierbei wurden am 5'-Ende eine *EcoR* I und am 3'-Ende eine *Hind* III Endonukleaseschnittstelle generiert. Nach einem Restriktionsverdau (3.2.18) wurden die Fragmente über eine Gelfiltration nach der Größe nach Angaben des Herstellers fraktioniert.

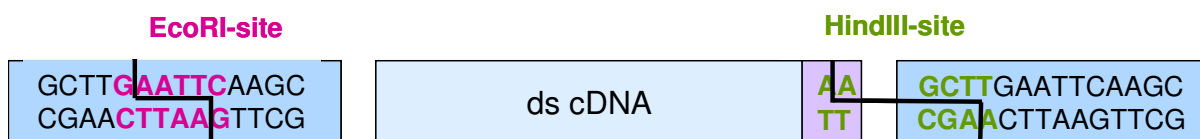


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der „Linker“-Ligation.

Schnittstellen wurden farbig dargestellt → EcoRI und HindIII.

3.2.26.4 In vitro Verpackung in den Phagenvektor λSCREEN

Für die Ligation in den *EcoR* I/*Hind* III geschnittenen λSCREEN Vektor pSCREEN-1b(+) wurden cDNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 50 bp und 2000 bp verwendet. Der rekombinante Vektor wurde anschließend in Bakteriophagen verpackt. Genaue Angaben der Ligations- und Verpackungsreaktion wurden dem „λSCREEN Vektor Kit“ (Novagen, Darmstadt) entnommen.

3.2.26.5 Titerbestimmung der λ SCREEN-Phagenbibliothek

Der *E. coli* Stamm ER1647 wurde über Nacht in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose bis zu einer OD₆₀₀= 1 kultiviert. Geschmolzene Top-Agarose wurde ebenfalls mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose versetzt und bei 47°C flüssig gehalten. Von den rekombinanten Phagen (3.2.26.4) wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe (1:100-1:100.000) in SM-Puffer angesetzt. Anschließend wurden je 100 µl jeder Phagenverdünnung mit 100 µl Bakteriensuspension für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Infektion der Bakterien wurde dieser Ansatz mit 3 ml flüssigem Topagar gemischt, sofort auf eine vorgewärmte LB-Platte (37°C) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken auf der gesamten Platte verteilt. Schließlich wurden die Platten nach Verfestigung der Top-Agarose über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die Infektion der Bakterien wurden einzelne Bakterienkolonien lysiert und erscheinen auf einer kontinuierlich bewachsenen Bakterienplatte als so genannte Plaques.

Der Phagentiter [plaque forming units pro ml] wurde durch folgende Formel bestimmt:

$$pfu / ml = n(\text{Plaques}) * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Bakteriensuspension}[ml]$$

3.2.26.6 Amplifizierung einer λ SCREEN-Phagenbibliothek

50 ml des *E. coli* Stammes ER1647 wurden über Nacht in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose bis zu einer OD₆₀₀= 1 kultiviert. Für eine H-Agar-Platte (Ø 15 cm) wurde 1 ml Bakteriensuspension mit primären Phagen (5×10^4) gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 10 ml flüssigem Top-Agar gemischt, sofort auf eine vorgewärmte H-Agar-Platte (37°C) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken auf der gesamten Platte verteilt. Schließlich wurde die Platte mit dem fest gewordenen Top-Agar für ca. 5-6 h bei 37°C inkubiert. Sobald die Plaques eine Größe von 1-2 mm erreicht hatten, wurde die Platte mit 10 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei diesem Schritt diffundierten die amplifizierten Phagen von der Platte in den SM-Puffer. Die Phagensuspension wurde von der Platte genommen und mit einer Endkonzentration von 5% (v/v) mit Chloroform versetzt. Größere Zelltrümmer und das Chloroform wurden durch Zentrifugation (10 min, 3.500 g, Raumtemperatur) entfernt. Der Phagenüberstand wurde nach Zugabe von DMSO (7%, v/v) bei -70°C gelagert. Der

Phagentiter wurde nach der Amplifikation, wie unter Punkt 3.2.26.5 beschrieben, bestimmt. In der Regel beträgt der Titer zwischen 10^9 - 10^{10} pfu/ml.

3.2.27 Screening einer cDNA-Expressionsbibliothek

Nitrocellulosemembran: Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Freiburg)

Die Bakterien wurden, wie unter 3.2.26.5 beschrieben, infiziert und ausplattiert. Auf einer Agar-Platte (\varnothing 10 cm) sollten nicht mehr als 3×10^4 Phagen ausplattiert werden. Sobald die Plaques eine Größe von ca. 1-2 mm erreicht hatten, wurden die Platten für 15-30 min bei 4°C abgekühlt. Die von den Bakterien produzierten Proteine konnten anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Die Membran wurde ohne Luftblasen auf die Phagenplatte gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten zur weiteren Proteinexpression mit der aufgelegten Membran für 3,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten nochmals für 1 h bei 4°C inkubiert, damit sich die Nitrocellulosemembran leichter abnehmen ließ. Vor dem Abziehen der Membran wurde ihre Position durch mehrere Einstiche mit einer sterilen Nadel am Rand der Platte markiert. Die membrangebundenen Proteine wurden, wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben, immunologisch detektiert.

3.2.28 Rescreening einer cDNA-Expressionsbibliothek

Um die Phagen mit dem gewünschten cDNA-Fragment zu selektionieren, wurde ein Rescreening durchgeführt. Die mittels der Immundetektion (3.3.7) ermittelten Klone, die die gewünschten cDNA-Fragmente enthielten, wurden aus der LB-Agarplatte ausgestochen und für 1 h bei Raumtemperatur in je 150 μ l SM-Medium inkubiert. Bei diesem Schritt diffundierten die Phagen aus dem Agar in den Puffer. Dieser Überstand wurde 1:50 und 1:500 in SM-Puffer verdünnt und erneut zur Infektion von *E. coli* ER1647 eingesetzt. Das Rescreening wurde so lange wiederholt, bis alle Plaques auf den Agarplatten als cDNA tragende Klone detektiert werden konnten. Mit dem erhaltenen Phagenlysat wurde im Anschluss eine *in vivo* „Excision“ (3.2.29) durchgeführt.

3.2.29 In vivo „Excision“

Der λ SCREEN Vektor pSCEEN-1b(+) besitzt ein *loxP*-cre System, das eine Umklonierung in ein bakterielles Plasmid ermöglichte. Zur Aktivierung dieses Systems muss ein Bakterienstamm, wie z. B. *E.coli* BM25.8, verwendet werden, der eine P1 cre Rekombinase produziert. Dieses Enzym ist für die Integration des Vektors pSCEEN-1b(+) mittels Rekombination verantwortlich. Zuerst wurde eine Übernachtskultur des *E.coli* Stammes BM25.8 in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose bis zu einer OD₆₀₀= 1 kultiviert. 100 μ l der positiv selektionierten Phagen (1:100 Verdünnung) wurden mit 100 μ l Bakteriensuspension vermischt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C fand die Infektion der Bakterien statt. Anschließend wurden 100 μ l dieser Bakterien/Phagen-Suspension auf LB-Amp-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach einer erfolgreichen Rekombination des Phagenplasmids in das bakterielle Plasmid besaßen die Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin und konnten aufgrund dieses Markers selektioniert werden. Die so erhaltenen Einzelkolonien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Das rekombinante bakterielle Plasmid wurde mittels Plasmid Mini-Präparation (3.2.13) isoliert, um anschließend eine DNA-Sequenzierung (3.2.25) durchführen zu können.

3.2.30 5'Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Mit der Methode der „Rapid Amplification of 5'cDNA Ends“ (5'RACE) ist es möglich, die unbekanntes 5'-Enden von cDNA-Fragmenten zu identifizieren. Diese Methode wurde mittels „GeneRacer Kit“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Verwendete Enzyme wurden vom Hersteller mitgeliefert. Das Schema der Methode ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

In dem ersten Schritt dieser Methode wurde die isolierte mRNA mit Alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Bei dieser Reaktion bleiben intakte, Vollängen mRNA-Moleküle unverändert, weil deren 5'-Enden durch eine 7-Methylguanosin-Kappe geschützt wurde. 5'-Enden von teilweise degradierten oder unvollständig transkribierten mRNA-Molekülen wurden währenddessen dephosphoryliert. Danach wurden die 7-Methylguanosin-Kappen mit Tobacco Pyrophosphatase (TAP) entfernt, wobei ein phosphoryliertes 5'-Ende zurückblieb. In einem dritten Schritt wurde mit der T4 Ligase ein RNA-Oligonukleotid an das 5'-Ende der phosphorylierten RNA ligiert.

Unvollständigen mRNA-Molekülen fehlte eine Phosphatgruppe für die Ligationsreaktion, wodurch gewährleistet wurde, dass nur Vollängen-mRNA-Moleküle in die Reaktion gingen. Anschließend wurde eine Reverse Transkription mit einem im Kit enthaltenen so genannten GeneRacer Oligo-(dT)-Primer durchgeführt. Um ein 5'-Ende zu erhalten wurde in einer „Touchdown“ PCR-Reaktion (Tab. 3.5) mit der erhaltenen cDNA, einem reversen, genspezifischen Primer (GSP, Tab. 3.1) und einem im Kit enthaltenen GeneRacer 5'-Primer, der komplementäre Nukleotide zu dem ligierten 5'-Oligo besaß, durchgeführt. Das somit erhaltene 5'RACE Produkt wurde in den pCR 4-TOPO Vektor (3.1.6) kloniert und anschließend sequenziert (3.2.25).

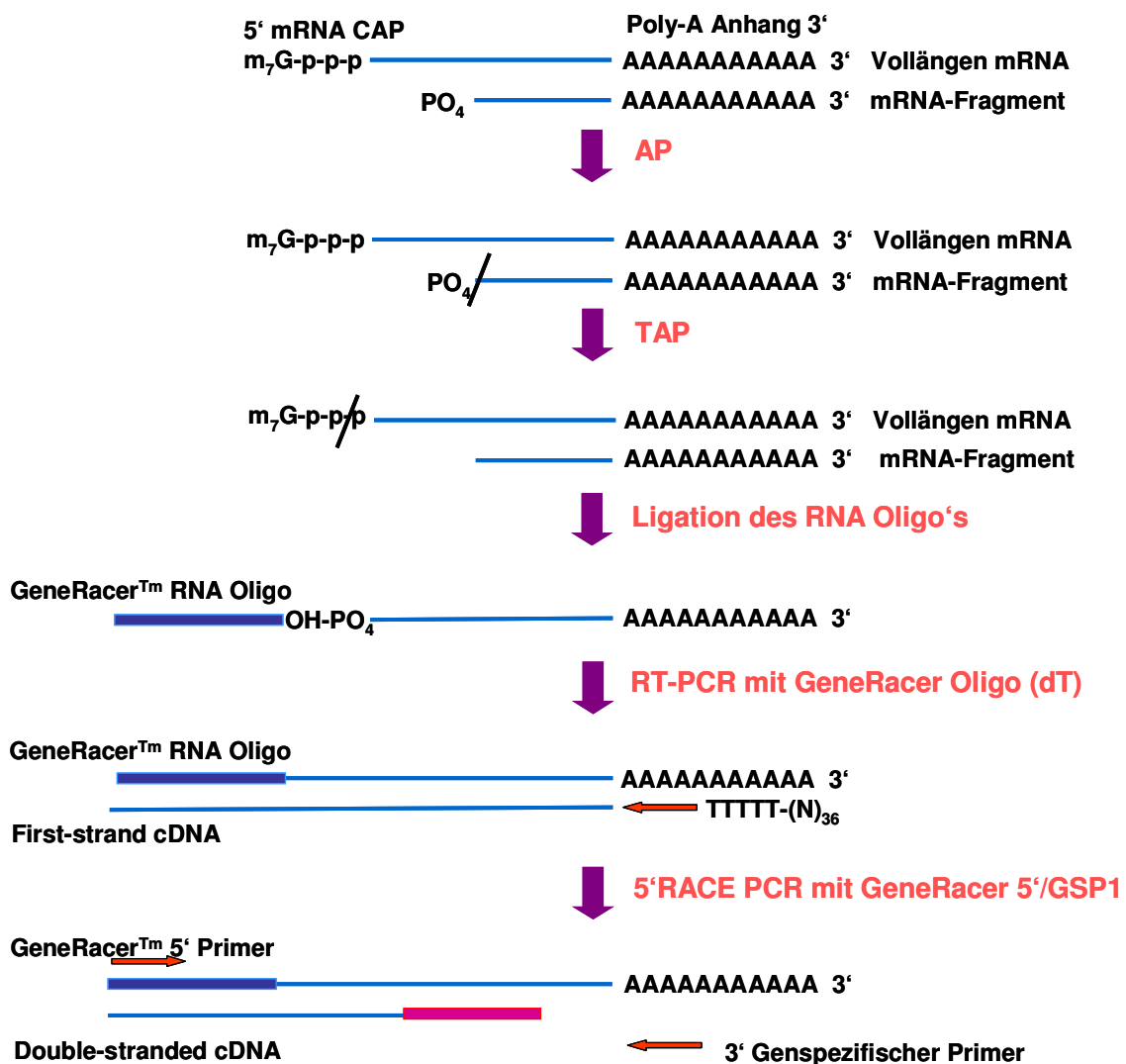


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der 5'RACE.

Tab. 3.5: Touchdown PCR-Programm.

TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
94 °C	2 min	1
94 °C	30 Sekunden	5
72 °C	1 min/1 kb DNA	
94 °C	30 Sekunden	5
70 °C	1 min/1 kb DNA	
94 °C	30 Sekunden	25
60 °C	30 Sekunden	
72 °C	1 min/1 kb DNA	
72 °C	10 min	1

3.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Herstellung von Allergenextrakten

Bei der Extraktion von Proteinen aus pflanzlichen Lebensmitteln sollte eine möglichst vollständige Isolierung von allen Proteinen im nativen Zustand gewährleistet werden. Bei der Proteinextraktion aus zerkleinertem, pflanzlichem Gewebe mittels wässrigen Pufferlösungen, setzen die zerstörten Zellen Phenole frei, die in einer enzymatischen Bräunungsreaktion mittels Phenoloxidase zu Melaninen umgesetzt werden. Hierbei reagieren Phenole mit freien Aminogruppen von Proteinen, wodurch es zu einer irreversiblen Zerstörung der nativen Proteine und somit zu einem Allergenitätsverlust der Extrakte kommt [Vieths et al. 1992a]. Um diese Zerstörung zu reduzieren wurde zur Herstellung der Extrakte die Tieftemperaturmethode (3.3.1.1) verwendet, während zur Isolation der Lipidtransfer Proteine aus pflanzlichem Gewebe (3.3.1.2) das von Björkstén et al. entwickelte Puffersystem genutzt wurde [Clements 1965, Björkstén et al. 1980, Vieths et al. 1992b].

3.3.1.1 Extraktion mittels Tieftemperaturmethode

Bei der von Clemens entwickelten und von Vieths modifizierten Tieftemperaturmethode wurde das pflanzliche Gewebe bei -20 °C mit Aceton homogenisiert, filtriert und der gewaschene Rückstand lyophilisiert [Clements 1965, Vieths et al. 1992b]. Bei der Inkubation des Homogenisates in Aceton werden die

gelösten phenolischen Inhaltsstoffe abgetrennt, während die niedrige Inkubationstemperatur die Enzymaktivität der Phenoloxidase reduzieren soll. Anschließend können die Proteine mittels PBS-Puffer aus dem Lyophilisat extrahiert werden. Hierfür wurden 10 g des Lyophilisats in 8 ml PBS-Puffer für 4 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Der proteinreiche Überstand wurde durch eine anschließende Zentrifugation bei 17.000 g, 4°C für 30 min isoliert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt (3.3.3).

3.3.1.2 Isolierung von natürlichen LTP aus pflanzlichem Gewebe

Bei der Isolation von natürlichem Lipidtransfer Protein (LTP) aus Pfirsichen und Salat wurde das von Björkstén et al. entwickelte Puffersystem, in dem das zerkleinerte pflanzliche Gewebe in 1-fach PBS-Puffer mit 2% Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 10 mM Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat (DIECA) homogenisiert wurde, angewendet. PVPP bildet starke H-Brücken mit Phenolen aus und reduziert dadurch die Hydroxilierung der Phenole zu Katecholen. Im aktiven Zentrum enthält die Phenoloxidase zwei Cu^{2+} -Ionen, die für die enzymatische Aktivität benötigt werden. EDTA bindet $\text{Ca}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, während DIECA mit der Phenoloxidase um Cu^{2+} -Ionen konkurriert. Durch die Konkurrenz der Stoffe um die Cu^{2+} -Ionen wird die enzymatische Aktivität ebenfalls stark eingeschränkt.

Das Homogenisat wurde anschließend für maximal 2 h auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Der proteinreiche Überstand wurde nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 10.000 rpm und 4°C isoliert und gegen 1-fach PBS dialysiert. PVPP ist ein unlöslicher Kunststoff, der durch die Zentrifugation entfernt wurde. EDTA und DIECA wurden mittels Dialyse für mindestens 48 h unter Anwendung eines Dialyseschlauches (Ausschlussgrenze 3,5 kDa, Roth, Spectrum, Karlsruhe) entfernt. Die im Überstand enthaltenen, gelösten Lipidtransfer Proteine wurden wie unter 3.3.2.1 und 3.3.2.2 beschrieben chromatographisch aufgereinigt.

3.3.2 Chromatographische Reinigung von LTPs

3.3.2.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Kationen-Austauschsäule: Mono S HR 5/5 Säule (Phadia, Freiburg)

Puffer A (Startpuffer) : 50 mM NaAc
steril filtriert, pH 5

Puffer B: 50 mM NaAc
1 M NaCl
steril filtriert, pH 5

Die im Hefekulturüberstand bzw. im Extrakt gelösten Proteine wurden mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) über eine Mono S HR 5/5 Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml aufgetrennt. Hierbei handelte es sich um einen Kationen-Austauscher, bei dem die stationäre Phase negativ geladene Ionen enthält. Proteine die eine positive Nettoladung besitzen, können aufgrund ihrer Ladung an die stationäre Phase der Säule binden. Die Seitenketten der Proteine können neben ungeladenen auch saure und basische Reste tragen und so zur Gesamtladung des Proteins beitragen. Bei niedrigen pH-Werten ist die Gesamtladung wegen der Protonierung der geladenen Seitenketten positiv, bei höheren pH-Werten aufgrund der Deprotonierung negativ. Zwischen diesen beiden Zuständen liegt der für jedes Protein charakteristische isoelektrische Punkt (pI). Hier gleichen sich positive und negative Ladungen aus und das Protein erscheint nach außen ungeladen. Der Isoelektrische Punkt der LTPs befindet sich zwischen 9,5 und 9,8. Durch die Dialyse gegen dem Startpuffer (Puffer A) für mindestens 48 h unter Anwendung eines Dialyseschlauches (Ausschlussgrenze 3,5 kDa, Roth, Spectrum, Karlsruhe), der einen pH von 5 besaß, lagen die LTPs positiv geladen vor und besaßen somit eine hohe Affinität zu den negativ geladenen Kationen an der Festphase der chromatographischen Säule. Nachdem die Mono S HR 5/5 Säule mit dem Startpuffer äquilibriert wurde, konnte die filtrierte Probe über die Beladungssäule (50 ml), der so genannten „Superloop“, mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule geladen werden. Vor der Elution wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer (Puffer A) gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu 1 M (0-100% Puffer B). Durch die Anwesenheit von geladenen Natrium- und Chloridionen wurden die elektrostatischen

Wechselwirkungen von Proteinen mit der Matrix unterbunden, so dass die Proteine von der Matrix gelöst wurden. Die separierten Proteine wurden durch eine UV-Absorption bei 280 nm gemessen. Die Signalintensität wurde in der Einheit Milli Absorption Units (mAU) angegeben. Das Eluat wurde unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt und nachfolgend mittels SDS-PAGE (3.3.6) auf den Gehalt an LTP überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert, um die Probe zur weiteren Reinigung mittels Gelfiltration (3.3.2.2) einzusetzen.

3.3.2.2 Gelfiltration

Gelfiltrationssäulen:	Superdex 30 HR 16/60 (Phadia, Freiburg) Superdex 75 HR 10/30 (Phadia)
MOPS-Puffer:	20 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 0,5 M NaCl, steril filtriert, pH 7,6

Die durch einen Kationen-Austauscher partiell gereinigten Proteinfractionen wurden mit Hilfe der Gelfiltration weiter gereinigt. Die Trennung der Moleküle beruht auf ihrer unterschiedlichen Molekülgröße. Als Gelmatrix werden kugelförmige Polymere verwendet, die in Abhängigkeit ihres Vernetzungsgrades porös sind. In die Poren dieser Matrices können sich kleinere Proteine geeigneter Größe festsetzen. Ihre Retentionszeit vergrößert sich dadurch. Sind die Proteine zu groß, können sie sich nicht in den Poren festsetzen und durchlaufen die Gelmatrix mit höherer Fließgeschwindigkeit. Hochmolekulare Proteine eluieren somit vor niedermolekularen Proteinen.

Für eine gute Trennung in einem Molekularbereich von 3-75 kDa wurde die Superdex 75 HR 10/30 verwendet, während die Superdex 30 HR 16/60 für eine optimale Trennung in einem Bereich von 5-30 kDa eingesetzt wurde. Die jeweilige Säule wurde mit zweifachen Säulenvolumen mit 20 mM MOPS-Puffer äquilibriert bis eine stabile Basislinie vorhanden war. Anschließend wurde die lyophilisierte Probe in 0,5-1 ml 20 mM MOPS-Puffer gelöst und aufgetragen. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde die Probe fraktioniert eluiert. Das Eluat wurde unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU in 0,5 ml gesammelt. Nach Beendigung des Laufs wurden anhand eines Coomassie- oder silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgels (3.3.6) die Fraktionen ermittelt, die LTP enthielten. Die

entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und eine Proteinbestimmung mittels BCA (3.3.3.2) durchgeführt.

3.3.2.3 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Ni ⁺⁺ -NTA-Agarose:	Qiagen, Hilden
Lysispuffer (nativ):	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 125 U Benzonase, pH 8
Lysispuffer (denaturierend):	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 125 U Benzonase, 8 M Harnstoff, pH 8
Waschpuffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 500 mM NaCl, 25-1000 mM Imidazol, pH 8

Die geernteten *E. coli* Zellen (3.2.12) wurden unter nativen oder denaturierten Bedingungen aufgeschlossen, um das freigesetzte Zielprotein anschließend über einen Histidin-Tag an Nickel-NTA-Agarose als Metallchelatkomplex zu binden. Die fraktionierte Elution der gebundenen Proteine erfolgte mittels Imidazol, welches mit Histidin um die Bindungsstellen an der Nickel-NTA-Agarose konkurriert. Das *E. coli* Pellet (3.2.12) wurde in 40 ml Lysispuffer (nativ oder denaturierend) resuspendiert. Bei einer denaturierenden Aufreinigung wird im Gegensatz zu nativen dem Lysispuffer 8 M Harnstoff zugesetzt. Die Zellen wurden durch 3-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und folgendem Auftauen in einem warmen Wasserbad (37°C) aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden anschließend in Corex®-Röhrchen abzentrifugiert (17.000 g, 4°C, 1 h). Die Ni-NTA-Agarose (3 ml) wurde währenddessen dreimal mit 5 ml Lysispuffer gewaschen (1.500 g, 5 min, Raumtemperatur) und danach für 2 h mit dem Zelllysate (40 ml) unter leichtem Rühren ohne Schaumbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Agarose wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um die ungebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Poly-Prep®-Säule (Bio-Rad, München) mit der gewaschenen und proteinbeladenen Agarose bestückt. Die gebundenen Proteine wurden mit jeweils 3x1 ml Elutionspuffer mit 25-1000 mM Imidazol fraktioniert eluiert.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt mittels SDS-PAGE (3.3.6) überprüft.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Färbelösung:	5-fach, Roti-Quant (Roth, Karlsruhe)
BSA:	2 mg/ml bovines Serum Albumin (Pierce, Bonn)
Mikrotiterplatte:	96-well Platte (VWR, Darmstadt)

Bei dem Bradford-Test erfolgt die Bindung von Coomassie Brilliant Blau G250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm nach Bindung des Proteins verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Nachweisgrenze liegt etwa bei 0,05 bis 0,5 µg/ml. Detergenzien, wie z. B. SDS, Tween-20, etc., können als Störfaktoren das Testergebnis verfälschen. Die Standardkurve wurde mit 0-160 µg/ml BSA durch eine Dreifachbestimmung ermittelt. Zu je 24 µl 1-fach Färbelösung wurden insgesamt 60 µl Proteinlösung (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 in Aqua bidest verdünnt) zugegeben. Die Messung erfolgte photometrisch als Doppelbestimmungen innerhalb von 20 min bei einer OD₅₉₅ mittels ELISA-Reader (3.1.1).

3.3.3.2 Proteinbestimmung mittels Bicinchinonsäure (BCA)

BSA:	2 mg/ml bovines Serum Albumin (Pierce, Bonn)
Mikrotiterplatte:	96-well Platte (VWR, Darmstadt)

Die BCA-Methode zeichnet sich durch eine Empfindlichkeit mit einer Nachweisgrenze von 0,1 bis 1 µg/ml, sowie einer geringen Störanfälligkeit aus. Lediglich Komplexbildner und Reduktionsmittel stören die Reaktion. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺-Ionen dieses Komplexes werden zu Cu⁺-Ionen reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Reduktion erfolgt durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin, Tryptophan und der Peptidbindung. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 562 nm

photometrisch mittels ELISA-Reader (3.1.1) bestimmt. Die Proteinbestimmung wurde mittels „BCA Protein Assay Kit“ von Pierce (Bonn) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.4 Rückfaltung von Proteinen

Zur Rückfaltung von Proteinen wurde das „Protein Refolding Kit“ der Firma Novagen (Darmstadt) nach Angaben des Herstellers angewendet. Zuerst wurde die Proteinprobe gegen den Dialysepuffer mit 1,4-Dithiothreitol (DTT), zur Reduzierung der gebildeten Disulfidbrückenbindungen, dialysiert (Slide-A-Lyzer®Dialysekassette, 0,5-3 ml Volumen, Ausschlussgrenze 3,5 kDa, Pierce, Bonn). Es folgte eine Dialyse ohne DTT, damit anschließend unter Einwirkung eines Redoxsystems (reduziertes/oxidiertes Glutathion) die Disulfidbrückenbindungen erneut ausgebildet werden konnten.

3.3.5 Reduktion und Alkylierung von nPru p 3

100 µl einer nPru p 3-Lösung (2,5 mg/ml) (4.2.7.1) wurde nach Zugabe von 200 µl Tris-HCL (200 mM, pH 8,5) und 20 µl DTT (450 mM) für 45 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe nach einer Zugabe von 40 µl Jodacetamid (500 mM) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine Dialyse (Slide-A-Lyzer Dialysis Kassette, Pierce, Bonn) für mindestens 24 h gegen PBS, welches zu Beginn mindestens alle 4 h erneuert wurde. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Messung (3.3.3.2) bestimmt. Die aufgehobene IgE-Reaktivität wurde mittels Immundetektion ermittelt (3.3.7)

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

Auftragspuffer: 6% SDS (w/v)
40% Glycerin (v/v)
0,1% Bromphenolblau (w/v)
60 mM Tris (pH 8)

Trenn- und Sammelgel setzen sich aus folgenden Lösungen zusammen:

Acrylamid: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

Lösung A: 1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8

Lösung B:	0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8
APS:	20 mg/ml Ammoniumpersulfat (Bio-Rad, München)
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Merck, Darmstadt)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte aufgrund ihrer Masse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [Laemmli 1970]. Das Proteingemisch wurde zunächst unter Zusatz von sodium dodecyl sulfate (SDS) gelöst. SDS ist ein Detergenz, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Die SDS-Anionen binden sich an die Proteinhauptketten, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis entsteht. Durch die nach außen gerichteten negativen Sulfatgruppen wird die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins vernachlässigbar. Die Komplexe aus SDS und denaturiertem Protein wurden nach Erhitzung von 5 min bei 95°C anschließend auf ein Polyacrylamidgel (Dicke= 1,5 mm) aufgetragen und bei 150 V aufgetrennt. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde den Proben vor dem Erhitzen in einigen Versuchen zusätzlich 0,5 M 1,4-Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Im Gel konnten die Proteine durch Silberfärbung (3.3.9.2) oder Coomassie Brilliant Blau G250 (3.3.9.1) gefärbt werden. Durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid kann die Porengröße der Polyacrylamidgele variiert werden (Tab. 3.6). Je nach Größe der Proteine wurde eine dementsprechende Zusammensetzung gewählt. In der Regel wurden 60 µg Proteinextrakt und 0,5-1 µg gereinigtes Protein pro cm Taschenbreite aufgetrennt.

Tab. 3.6: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration.

TRENNGEL				SAMMELGEL	
	10%	12,5%	15%		5%
Acrylamid	3,4 ml	4,2 ml	5 ml	Acrylamid	1,7 ml
Lösung A	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	Lösung B	2,5 ml
Aqua bidest	3,8 ml	3 ml	2,3 ml	Aqua bidest	5,4 ml
APS	300 µl	300 µl	200 µl	APS	400 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	TEMED	20 µl

3.3.7 Immundetektion (Westernblot)

Blotmembran:	0,2 µm Nitrocellulose Transfer Membrane (Schleicher und Schuell, Dassel)
Blotpuffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,6
Filterpapier:	3 MM (Wathman, Schleicher und Schuell)
Färbelösung:	Ponceau S (Sigma, Deisenhofen)
Blockierlösung:	5% Magermilchpulver (Merck, Darmstadt) in PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20 (Sigma))
Inkubationslösung:	2,5% Magermilchpulver (Merck) in PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20 (Sigma))
Waschlösung:	PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20 (Sigma))
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl; pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml BCIP in Dimethylformamid
NBT-Stammlösung	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
AP-Färbelösung	0,4 ml AP-Puffer 0,1 ml BCIP-Stammlösung 0,1 ml NBT-Stammlösung in 10 ml Aqua bidest

Beim Western-Blotting wurden die durch SDS-PAGE (3.3.6) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zur nachfolgenden Immundetektion überführt. Dieses Blotting wurde im Tank-Blot-Verfahren durchgeführt, wobei das Blot-

Sandwich (Abb. 3.6) luftblasenfrei in einer mit Blotpuffer gefüllten Schale zusammengesetzt wurde. Das Sandwich wurde in die Blotapparatur (Mini Protean II™, Bio-Rad, München) eingesetzt, so dass die Nitrocellulose zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet waren.

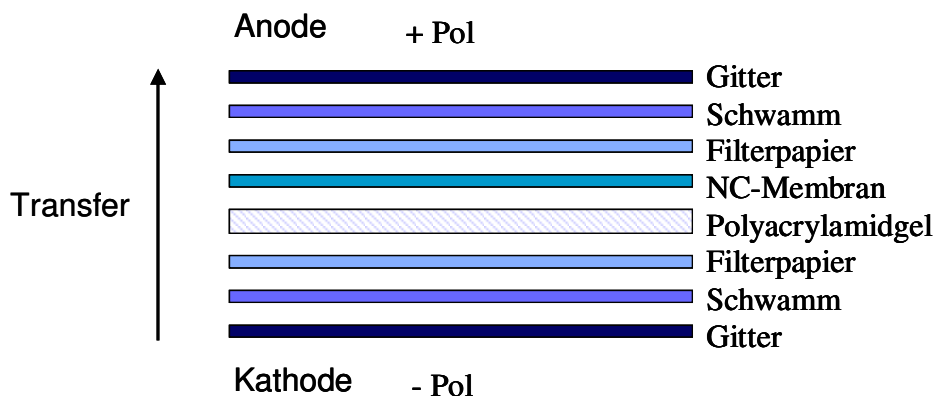


Abb. 3.6: Aufbau eines "Westernblot-Sandwiches".

Die Blotdauer betrug 45 min bei 150 V. Zur Überprüfung der transferierten Proteine wurden die Nitrocellulosemembran mittels Ponceau-S-Färbung (3.3.9.3) gefärbt. Im Folgenden wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation (1 h) mit Blockierungspuffer entfernt. Nach einem Waschschrift (15 min) der Membran folgte eine Seruminkubation (Humanseren 1:10 oder kreuzreaktives Kaninchen anti-Pru p 3 Serum 1:20.000 in Inkubationspuffer verdünnt, Gesamtvolumen 600 µl, 3.1.2) über Nacht bei Raumtemperatur. Nachdem die ungebundenen Antikörper durch einen weiteren Waschschrift (3x5 min) entfernt wurden, folgte eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Maus anti-human IgE 1:750 oder Ziege anti-Kaninchen IgG 1:6.000 in Inkubationspuffer verdünnt, Gesamtvolumen 600 µl, 3.1.2) der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Nach erneutem Waschen (3x5 min) wurde Streptavidin (1:3.000 in Inkubationspuffer verdünnt, Gesamtvolumen 600 µl), welches mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, für weitere 30 min inkubiert. Die gewaschene Membran (3x5 min) wurde vollständig in entsprechender Menge an AP-Färbelösung („AP Conjugate Substrate Kit“, 3.1.2) inkubiert und unter mehrmaligem Schwenken gefärbt, bis ein violetter Farbkomplex zu erkennen war. Die Reaktion wurde mit Aqua bidest abgestoppt und die Membran bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.8 Immunoblotinhibition

Durch eine Immunoblotinhibition können kreuzreaktive Antikörper identifiziert werden. Die Durchführung entsprach prinzipiell der der Immundetektion (3.3.7). Abweichend davon wurden die Humansenen (1:10 in Inkubationspuffer verdünnt, Gesamtvolumen 600 µl) entweder mit 100 µg Proteinextrakt, 25 µg Glykopeptid (Man α 1-6(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc → MUXF-Glykopeptid), Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc → MM-Glykopeptid oder 5 µg gereinigtem Protein für 1,5 h bei Raumtemperatur unter leichtem Wippen präinkubiert. Als Positivkontrolle wurde die Reaktion des Serums ohne Zugabe des Inhibitors durchgeführt. Die Detektion erfolgte wie unter 3.3.7 beschrieben.

3.3.9 Proteinfärbung

3.3.9.1 **Coomassie Brilliant Blau Färbung**

Färbelösung: Coomassie Stain Solution 1×Solution (Bio Rad, München)

Entfärbelösung: 10% Eisessig
90% Aqua bidest

Coomassie Brilliant Blau G250 ist ein Farbstoff der unspezifisch an Proteine binden kann. Schon 10 ng eines Proteins pro mm Taschenbreite ergeben eine erkennbare Bande bei einer Coomassie Brilliant Blau G250 Färbung. Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese (3.3.6) für mindestens 1 h in der Coomassie-Lösung inkubiert, wodurch sie auch gleichzeitig fixiert wurden. Das Gel wurde anschließend so lange entfärbt (ca. 14 h) bis die blauen Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

3.3.9.2 **Silberfärbung**

Fixierlösung: 30% Ethanol
10% Essigsäure

Inkubationslösung: 30% Ethanol
0,5% Glutardialdehyd
0,02 M Natriumthiosulfat
0,5 M Natriumacetat

Silbernitratlösung: 0,1% Silbernitratlösung
0,02% Formaldehyd

Entwickler:	2,5% Natriumcarbonat 0,01% Formaldehyd
Stopplösung:	50 mM EDTA
Waschlösung:	Aqua bidest

Bei der Silberfärbung bilden Ag-Ionen Komplexe mit Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cystein-Resten der Proteine. Die Ag⁺-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, wodurch die Proteine sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieser Färbung kann 1 ng Protein pro mm Taschenbreite deutlich detektiert werden.

Zu Beginn der Färbung wurde das Acrylamid-Gel für 30 min in der Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel direkt in die Inkubationslösung übertragen und für weitere 30 min inkubiert. Es schloß sich ein intensiver Waschschriff mit der Dauer von 1 h an, bei dem die Waschlösung alle 10 min erneuert wurde. Danach wurde das Gel für 20 min in der Silbernitratlösung inkubiert. Nach kurzem Waschen in Aqua bidest wurde das Gel durch Zugabe des Entwicklers gefärbt und mit der Stopplösung beendet. Abschließend wurde es in Aqua bidest gewaschen.

3.3.9.3 Ponceau-S-Färbung

Die Effizienz des Western-Blot-Transfers wurde mittels Ponceau-S-Färbung überprüft. Der Western-Blot wurde für 1-5 min in Färbelösung (Roth, Karlsruhe) geschwenkt und anschließend mit Wasser entfärbt bis die transferierten Proteine als deutlich sichtbare rote Banden zu erkennen waren.

3.3.10 Limulus Amöbozyten-Lysat-Test

Der *Limulus* Amöbozyten-Lysat-(LAL) Test wurde zur Quantifizierung von Endotoxinen in Proteinlösungen verwendet. Das *Limulus* Amöbozyten-Lysat ist ein wäßriger Extrakt von Hämolymphezellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*). Dieses Lysat enthält prokoagulante Proteine und stellt das Nachweisreagenz dar. Endotoxine, so genannte Lipopolysaccharide, gram-negativer Bakterien lösen dosisabhängig das Gelieren des Lysats aus, in dem eine Enzymkaskade aktiviert wird.

Die genaue Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers Acila (Mörfelden-Walldorf). Hierbei wurden zu 100 µl einer Verdünnungsreihe der Testprobe in pyrogenfreien Reaktionsröhrchen (Pyroquant, Mörfelden-Walldorf) 100 µl des Amöbozyten-Lysats hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde gründlich gemischt und umgehend 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Röhrchen aus dem Inkubator genommen und um 180° invertiert. Der Test war positiv zu bewerten, sobald sich ein Gel gebildet hatte, das am Boden des Reaktionsröhrchens haften blieb. In Verbindung mit einer Standardverdünnungsreihe (Acila, Mörfelden-Walldorf) von bekanntem Endotoxingehalt wurde die Endotoxinmenge in einer Probe quantitativ bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode konnten geringe Konzentrationen von bis zu 0,03 Endotoxin-Units (EU) pro ml festgestellt werden.

3.3.11 Strukturanalysen

3.3.11.1 Massenbestimmung mittels nano ESI-MS

Das exakte Molekulargewicht der gereinigten Proteine wurde mit nano Elektrospray-Ionierungs-Massenspektrometrie (nano-ESI-MS) mit Unterstützung von Frau Dr. L. Perono-Garoffo im Labor von Herrn Dr. A. Conti (CNR-ISPA, c/o Bioindustry Park, Proteome Lab, Colletterto Giacosa, Italien) bestimmt. Vor der Durchführung wurde die Proben gegen 25 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,2) dialysiert. Die Konzentration der Proben wurde auf einen Wert von $\geq 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Insgesamt wurden je 100 µl dieser Lösungen mit einem Iontrap Massenspektrometer (LC/MSD XCT Plus, Agilent, Foster City, California US) untersucht. Die Proteinlösungen wurden über ein nano-ESI interface im direct infusion mode mit einem Fluss von 5 µl/min in das Massenspektrometer injiziert. Die Aufzeichnung der Massenspektren erfolgte unter Verwendung von voreingestellten Standard-Geräteparametern. Die Massenspektren wurden Software gestützt (DataAnalysis for LC/MSD-Trap, Agilent) ausgewertet und das Molekulargewicht der untersuchten Proben aus den so erhaltenen Daten manuell errechnet.

3.3.11.2 N-terminale Sequenzierung

Aliquots von gereinigtem Protein oder von *P. pastoris* Kulturüberstand (3.2.7) wurden mittels SDS-PAGE (3.3.6) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau G250 (3.3.9.1) gefärbt. Die gefärbten Banden wurden ausgeschnitten und die Proteine

passiv an PVDF Membranen adsorbiert [Messer et al. 1997]. Die Aminosäuresequenz der adsorbierten Proteine wurde dann wie von Matsudaira [Matsudaira 1987] beschrieben mit einem 492 Procise sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bestimmt. Durchgeführt wurde die Sequenzierung mit Unterstützung von Herrn Dr. A. Conti.

3.3.11.3 Strukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie

Küvetten:	Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim)
	1 mm Schichtdicke
Phosphatpuffer:	10 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,3

Die Sekundärstruktur eines gereinigten Proteins kann mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie ermittelt werden. Die Probe wird mit rechts und links zirkular polarisiertem Licht bestrahlt. Dann wird der Unterschied in der Absorption zwischen beiden Polarisationsrichtungen gemessen.

250 µg LTP-Lösung wurde gegen 10 mM KH₂PO₄ Puffer in einer Dialysekassette (Slide-A-Lyzer®Dialysekassette, 0,1-0,3 ml Volumen, Ausschlussgrenze 3,5 kDa, Pierce, Bonn) dialysiert und bei einem Spektrum von 185-255 nm mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm/min gemessen. Das Gesamtvolumen der Probe durfte 300 µl nicht überschreiten, während die Salzkonzentration unter 10 mM sein musste. Die Auflösung der Datenpunkte betrug 0,2 nm. Zehn Messungen wurden akkumuliert, während das Pufferspektrum subtrahiert wurde. Um die Einwirkung von Hitze auf die Sekundärstruktur von Proteinen zu untersuchen, wurden CD-Spektren bei 20°C, bei 90°C und nach einer Abkühlung auf 20°C gemessen und analysiert. Die Temperaturerhöhung erfolge pro Minute für 1°C. Die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRW}$ ($10^3 \text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) wurde nach folgender Gleichung aus den gemessenen Werten berechnet:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{100 \times \theta [m \text{deg}]}{c \times d \times N}$$

Dabei sind $[\Theta]_{MRW}$ die mittlerer residuale Elliptizität, θ [mdeg] die gemessene Elliptizität in mdeg, c die Proteinkonzentration, d die Schichtdicke der Küvette und N die Anzahl der Aminosäuren.

3.3.12 Bestimmung des spezifischen IgEs/IgGs

3.3.12.1 Herstellung von Allergenscheiben

Filterpapierscheibchen:	Bromcyan aktivierte Filterpapier (Hycor, Kassel)
Kopplungslösung:	0,1 M NaHCO ₃
Desaktivierungslösung:	0,1 M Ethanolamin in 0,1 M NaHCO ₃
Acetatpuffer:	0,1 M Na-Acetatpuffer (5,7 ml Eisessig mit 50 ml 0,1 M NaOH versetzen, mit Aqua bidest auf 800 ml auffüllen, pH 4,0 mit 0,1 M NaOH einstellen, auf 1 L mit Aqua bidest auffüllen)
Lagerpuffer:	PBS + 0,3% BSA

Zur quantitative Bestimmung des spezifischen IgEs in Patientenserum mittels EAST (3.3.12.2) wurden 0,5 µg LTPs an Bromcyan aktivierte Filterpapierscheiben gekoppelt [Ceska et al. 1972]. Die Filterpapierscheibchen wurden zunächst mit der Kopplungslösung für 5 min gewaschen. Pro Scheibe wurden jeweils 170 µl der jeweiligen Lösungen benötigt. Alle Inkubationen fanden auf dem Kreisschüttler statt. Die Allergene wurden in der Kopplungslösung verdünnt, und nach Absaugen der Flüssigkeit von den Filterpapierscheibchen, über Nacht bei 4°C mit diesen inkubiert. Nach erneutem Absaugen wurde zweimal für je 10 min mit der Kopplungslösung gewaschen. Zur Desaktivierung der freien Bindungsstellen wurden die Scheiben für 2 h mit der entsprechenden Lösung inkubiert. Nach Absaugen der Lösung folgte eine Wiederholung des Schrittes für 1 h. Es erfolgte erneut zweimaliges Waschen für 10 min mit der Kopplungslösung, anschließend zweimal 30 min mit dem Acetatpuffer und zweimal 10 min mit dem Lagerpuffer. Nach Absaugen der restlichen Flüssigkeit, wurden die Scheiben mittels Lyophilisator gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.3.12.2 Enzym Allergosorbens Test (EAST)

Durchgeführt wurde der Enzym Allergosorbens Test (EAST) mit Hilfe des „Spezifischen IgE ELISA RV 5“-Kit der Firma Allergopharma (Reinbeck). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es handelt sich hierbei um einen nicht-kompetitiven Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von

allergenspezifischen IgE in Patientenserum. Durch die Inkubation der gekoppelten Allergenscheiben (3.3.12.1) mit Patientenserum binden die spezifischen IgE-Antikörper aus dem Serum an die kovalent gebundenen Allergene der Festphase. Überschüssiges IgE aus dem Serum wurde durch einen Waschschrift entfernt. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex kann durch eine Bindung eines mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-human-IgE-Antikörper an das gebundene spezifische IgE detektiert werden. Überschüssiges anti-human-IgE wurde ebenfalls durch einen Waschschrift entfernt. Die Menge des gebundenen anti-human-IgEs ist proportional zu der Menge des gebundenen spezifischen IgEs aus dem Serum. Durch den Vergleich mit Referenzseren, die eine bekannte Menge an gräserpollenspezifischem IgE besitzen und mit Gräserpollen-Allergenscheiben inkubiert wurden, können die ermittelten Werte der Patientenserum in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Die Werte werden in U/ml oder in EAST-Klassen (0-4) angegeben. 1 U/ml entspricht 2,4 ng/ml spezifischem IgE.

Tab. 3.7: Einteilung der IgE-Konzentrationen in EAST-Klassen.

SPEZ. IGE-KONZENTRATION [U/ML]	EAST-KLASSE
≤ 0,35	0 (negativ)
> 0,35 ≤ 0,7	1 (niedrig)
> 0,7 ≤ 3,5	2 (mittel)
> 3,5 ≤ 17,5	3 (hoch)
>17,5	4 (sehr hoch)

3.3.12.3 ImmunoCAP- Fluoroenzym-Immuno-Assay (FEIA)

Der ImmunoCAP-Fluoreszenz-Enzyme-Immuno-Assay (FEIA) unterscheidet sich von einem Enzym Allergosorbens Test (EAST) durch seine hohe Empfindlichkeit aufgrund seiner höheren allergenbindenden Kapazität. Es handelt sich hierbei ebenfalls um einen nicht-kompetitiven Enzymimmunoassay, mit dem die Konzentration des spezifischen IgEs eines Patientenserums ermittelt werden kann. Das Testprinzip beruht auf der Bindung von spezifischem IgE aus dem Patientenserum an ein an der Festphase gekoppeltes Allergen. Die Detektion erfolgt anschließend durch einen fluoreszierenden Zweitantikörper.

Die durchgeführten ImmunoCAP-Messungen von Allergenextrakten wurden mit kommerziellen ImmunoCAPs (Phadia, Freiburg) für Kirsche (f242), Haselnuss (f17), Pfirsich (f95) und Salat (f215) durchgeführt. Die gereinigten LTPs wurden mit Unterstützung von Herrn Dr. J. Lidholm (Phadia, Uppsala, Schweden) in einer Konzentration von 5 µg/CAP kovalent an die Festphase gekoppelt und als so genannte experimentelle ImmunoCAPs bezeichnet [Marknell et al. 2002]. Für die Sensitivitätsstudie, EAST versus ImmunoCAP-FEIA, wurden experimentelle ImmunoCAPs, bei denen rCor a 8 (*E. coli*) und rPru p 3 (*E. coli*) gekoppelt vorlag, von Herrn Dr. J. Lidholm zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Werte wurden wie beim EAST in U/ml angegeben und können ebenfalls in so genannte CAP-Klassen eingeteilt werden.

Tab. 3.8: Einteilung der CAP-Klassen.

SPEZ. IGE-KONZENTRATION [U/ML]	CAP-KLASSE
< 0,35	0 (negativ)
0,35 - 0,7	1 (niedrig)
0,7 - 3,5	2 (mittel)
3,5 - 17,5	3 (hoch)
17,5 - 50	4 (sehr hoch)
50 - 100	5 (sehr hoch)
> 100	6 (sehr hoch)

3.3.12.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mikrotiterplatte:	96-well, Maxisorb (Nunc, Wiesbaden)
Carbonatpuffer:	50 mM Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃
Waschlösung:	TBS-T (TBS + 0,05% Tween 20)
Inkubationslösung:	TBS-T (TBS + 0,05% Tween 20) + 0,1% BSA
Blockierungslösung:	TBS-T (TBS + 0,05% Tween 20) + 1% BSA
Färbelösung:	1 Färbetablette mit p-Nitrophenylphosphat pro 5 ml 1-fach AP-Puffer (BioRad, München)

Ein „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) wurde zur quantitativen Bestimmung der spezifischen IgG-Antikörpertiter verwendet. Dieser Test wurde mit

Unterstützung von Frau S. Randow (Paul-Ehlich-Institut, FG 5/01, Langen) durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils gereinigtes Protein (nPrup 3, denaturiertes nPrup 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8 (*P. pastoris*), nArt v 3, nAmb a 6, nPla a 3 und rPrup av 3 (*P. pastoris*)) und 100 µg/ml Ovalbumin in Carbonatpuffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. Alle Inkubations- und Waschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Zur Kopplung der LTPs an die Mikrotiterplatte (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) wurden 100 µl der Proteinlösung pro Kavität über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei-maligem Waschen wurden die Platten mit 300 µl der Blockierungslösung für 2 h inkubiert. Nach drei-maligem Waschen der Mikrotiterplatte wurde das Serum 1:100, 1:400 und 1:1.600 in Inkubationslösung verdünnt und für 1,5 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die ELISA-Platten mit 100 µl des Sekundär-Antikörpers (100 µl Ziege anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, 1:5.000, 3.1.2) pro Kavität für 1 h inkubiert. Es erfolgte ein letzter Waschschritt mit nachfolgender Färbung mittels Zugabe von 100 µl Färbelösung pro Kavität. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.3.13 Inhibitions-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mikrotiterplatte:	96-well, Maxisorb (Nunc, Wiesbaden)
Citratpuffer:	210 mM $C_6H_8O_7 \times H_2O$ 303 mM KOH pH 3,95
TMB-Stammlösung:	21 mM Tetramethyl-Benzidin (TMB) in 1% Aceton (v/v) und 9% Methanol (v/v)
Wasch- und Inkubationslösung:	PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20)
Blockierungslösung:	PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20) + 1% BSA
Färbelösung:	Citratpuffer + 1 mM TMB-Stammlösung + 3 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Stopplösung:	3 M H_2SO_4

Bei einem kompetitiven Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kann die Antikörperkreuzreaktivität mit bestimmten Antigenen nachgewiesen werden. Hierbei

wird die Spezifität der IgE-Bindung der Antikörper in einem Patientenserum indirekt durch Präinkubation des Serums mit einer definierten Antigenmenge ermittelt. Natürliches Pru p 3, nLac s 1, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*) wurden an die Festphase gekoppelt, während das Patientenserum mit den zu untersuchenden Antigenen (nPru p 3, nLac s 1, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*)) präinkubiert wurde. Hierbei konkurrieren die gelösten Antigene (Inhibitoren) mit den Antigenen, die an der Festphase gebunden waren, um die Bindung von IgE-Antikörpern aus dem Serum. Nach der Präinkubation wurde die Restaktivität des Serums gegen das gekoppelte Antigen an der Festphase bestimmt und mit der Gesamtaktivität, die sich aus der Reaktivität des Serums ohne Präinkubation ergab, verglichen. Die Höhe der ermittelten Inhibition lässt Rückschlüsse über die Affinität und Spezifität der IgE-Bindung und damit über die Art der Epitope zu.

In Vorversuchen wurde durch Verdünnungsreihen des Antigens und des Serums die jeweils entsprechende Verdünnung ermittelt, bei der eine möglichst geringe Antigenmenge mit einem leichten Überschuss an IgE-Molekülen bei einer $OD_{600} = 0,7-1,2$ detektiert werden konnte. Die ermittelte Antigenmenge (0,006-1 μg pro Kavität) wurde in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Maxisorb-Mikrotiterplatte gekoppelt. Nach einem 3-maligen Waschschrift wurde mit 300 μl der Blockierungslösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die gereinigten Allergene (Inhibitoren) wurden in PBS-T logarithmisch in fünf Stufen verdünnt, so dass Konzentrationen von 0,002-20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden konnten. Die ebenfalls durch Vorversuche ermittelte nötige Serumverdünnung wurde in PBS-T angelegt. Es folgte eine Präinkubation von 55 μl des verdünnten Serums mit 55 μl der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (0,002-20 $\mu\text{g/ml}$) von 60 min bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem Waschen der Maxisorb-Mikrotiterplatte wurde das absorbierte Allergen mit 100 μl des präinkubierten Patientenserums bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Sekundär-Antikörper (100 μl Maus anti-human IgE, Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt, 1:2.000, 3.1.2) für weitere 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit nachfolgender Färbung mittels Zugabe von 100 μl Färbelösung pro Kavität. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbung durch Zugabe von 50 μl Stopplösung beendet und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung der nicht spezifischen

Bindung (NSB) wurden mindestens drei Kavitäten lediglich mit den entsprechenden Puffern und Antikörperlösungen ohne Zugabe von Serum oder Inhibitor behandelt.

Der Grad der Inhibition [%] wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{\text{Ext}(B_0) - \text{Ext}(P)}{\text{Ext}(B_0) - \text{Ext}(NSB)} \times 100$$

Ext (B₀): mittlere Extinktion des Patientenserums ohne Zugabe des Inhibitors

Ext (P): mittlere Extinktion der Probenwerte

Ext (NSB): mittlere Extinktion der Nicht spezifische Bindung (NSB)-Werte

3.3.14 Immunisierung von CBA/J Mäusen

Die Immunisierung der Mäuseseren wurde mit Unterstützung von Mitarbeitern der Forschungsgruppe „Zelluläre Allergologie“ unter der Leitung von Dr. G. Reese (Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung 5/01, Langen) durchgeführt.

Fünf bis sechs Wochen alte CBA/J Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) wurde 0,5 ml Allergen-Alum®-Lösung (1 µg Protein + 500 µg Aluminiumhydroxid (Merck, Darmstadt) pro Maus) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Zur Immunisierung wurden je 1 µg nPru p 3, denaturiertes nPru p 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8 (*P. pastoris*), nArt v 3, nAmb a 6 und nPla a 3 verwendet. Den Kontrollmäusen wurde statt des Allergens eine Ovalbumin-Alum®-Lösung (Ovalbumin Inject®, Pierce, Bonn) in gleicher Konzentration verabreicht. Fünf weitere Immunisierungen (i.p.) mit gleicher Dosierung erfolgten alle zwei Wochen. Zwei Wochen nach der sechsten Immunisierung wurden die Seren durch kardiale Punktion gewonnen. Die individuellen IgG- und IgE-Antikörperreaktivitäten wurden mittels Mediatorfreisetzung aus RBL-2H3-Zellen (3.3.16) bzw. ELISA (3.3.12.4) bestimmt. Seren mit hoher IgE- oder IgG-Antikörperreaktivität wurden gepoolt.

3.3.15 In vitro Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten

Die *in vitro* Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten wurde von Kleine et al. entwickelt und von Foetisch et al. modifiziert [Kleine, I et al. 2001, Foetisch et al. 2003]. Mit Hilfe dieses Tests kann sowohl die biologische Potenz eines Allergens als auch Kreuzreaktivitäten zwischen zwei verschiedenen Allergenen bestimmt werden.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass die Histaminfreisetzung von passiv sensibilisierten basophilen Granulozyten mit Patienten-IgE, nach Stimulation mit einem Antigen, gemessen werden kann. Die Menge der Histaminfreisetzung korreliert mit der biologischen Potenz des jeweiligen Allergens.

Die Bestimmungen wurden mit Hilfe eines kommerzielle erhältlichen ELISA-Kits (Histamine, ELISA IM2015, Immunotech Beckman coulter, Unterschleißheim) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die basophilen Granulozyten aus dem Vollblut eines Nicht-Allergikers angereichert. Zellständige IgE-Antikörper wurden durch Inkubation der basophilen Granulozyten in einem sauren Milieu entfernt; die Zellen wurden anschließend mit einem Patientenserum passiv sensibilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Allergenextrakt oder gereinigtem Allergen stimuliert. BSA wurde als Negativkontrolle eingesetzt, während durch die Lyse der Zellen der maximale Histamin-Freisetzungsgesamt gemessen wurde, der als 100%-Referenzwert zur Berechnung der Allergen induzierten Histamin-Freisetzung in Prozent diente. Die Ergebnisse wurden durch eine Doppelbestimmung ermittelt.

3.3.16 RBL-2H3 (Rat basophilic leukemia cell 2H3)-Mediatorfreisetzungstest

Der RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest ist eine weitere Methode zur Bestimmung der biologischen Potenz von Allergenen, sowie der Kreuzreaktivität zwischen zwei verschiedenen Allergenen. Der Test wurde nach dem Protokoll von Hoffmann et al. [Hoffmann et al. 1999a, Hoffmann et al. 1999b] mit Unterstützung von Frau S. Randow (Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Allergologie, Langen) durchgeführt. Die RBL-2H3 Zellen wurden mit dem jeweiligen Pool der Antiseren von Mäusen (3.3.14) passiv sensibilisiert. Durch Stimulation mit einem Allergen, das spezifisches IgE auf der Oberfläche dieser Zellen quervernetzte, wurde das Enzym β -Hexosaminidase ausgeschüttet, das nach Zugabe des Substrats p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid ein Farbumschlag bewirkte. Anschließend wurde die Menge des umgesetzten Substrates bei 405 nm im ELISA-Reader (3.1.1) photometrisch bestimmt.

Natürliches Pru p 3, denaturiertes nPru p 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8 (*P. pastoris*), rPru av 3 (*P. pastoris*), nArt v 3, nAmb a 6 und nPla a 3 wurden in einer Konzentration von 1 μ g/ml-10 pg/ml als Stimulanz eingesetzt.

3.3.17 LTP-induzierte T-Zell-Proliferation

3.3.17.1 T-Zell-Kreuzreaktivität von LTPs

Zur Identifizierung von kreuzreaktiven T-Zell Epitopen wurden antigenspezifische T-Zell-Proliferationsversuche mit Unterstützung von Frau Prof. Dr. B. (Medizinische Universität, Wien, Österreich) durchgeführt. Pru p 3-spezifische T-Zell-Klone wurden zur Bestimmung der Kreuzreaktivität mit anderen LTPs (rCor a 8 (*P. pastoris*), rPru av 3 (*P. pastoris*), nLac s 1) stimuliert [Bohle et al. 2003]. Hierzu wurden zunächst mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus dem Vollblut von Pru p 3-sensibilisierten Pfirsichallergikern (von Dr. A. Mari (Experimental Allergy Unit IDI-IRCCS, Rom, Italien) bezogen) mittels Dichtegradienten abgetrennt. Durch die Zugabe des natürlich gereinigten, endotoxinfreien Pru p 3 wurden spezifische Pru p 3 T-Zellen zur Proliferation angeregt. Es folgte eine Isolierung von Pru p 3-spezifischen T-Zell-Linien und im Anschluss die der T-Zell-Klone. Die Zellvermehrung wurde nach einer Stimulation durch den Einbau von radioaktiv markierten ³H-Thymidin (0,5 µCi pro Kavität) gemessen. Die gemessene Radioaktivität wurde in counts per minute [cpm] ermittelt und als Stimulationsindex (SI) angegeben. Dieser errechnet sich aus dem Absolutwert dividiert durch die Negativkontrolle, bei dem kein Antigen zugegeben wurde. Ein SI von ≥ 2 wurde als signifikante Proliferation gewertet.

3.3.17.2 Identifizierung der T-Zellepitope des Pru p 3

Ein weiteres Ziel war die Identifizierung von Pru p 3 spezifischen T-Zell Sequenzepitopen. Hierfür wurde eine Epitopcharakterisierung von Pru p 3 durchgeführt, bei der insgesamt 27 synthetische Peptide (Thermo Electron GmbH, Ulm) mit einer Länge von 12 Aminosäuren analysiert wurden, die jeweils neun überlappende Aminosäuren besaßen (Peptid 1: AA 1-12, Peptid 2: AA 4-15, Peptid 3: AA 7-18, ...usw.). Die Epitopcharakterisierung wurde mit Pru p 3-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Nach Kultivierung der antigenspezifischen T-Zellen (5×10^4 Zellen pro Kavität), wurden die einzelnen Peptide 1-27 in einer Konzentration von 5 µg/ml (1 µg/Kavität) zugegeben und die T-Zell-Proliferation durch den ³H-Thymidin-Einbau gemessen [Jahn-Schmid et al. 2002]. Ein Stimulationsindex (SI) von ≥ 2 wurde als positive Proliferation gewertet. Eine Messung der Proliferation korreliert mit der Stimulation durch Pru p 3-Peptide, die ein Epitop präsentieren.

4. Ergebnisse

4.1 Bedeutung des LTPs aus Salat bei der allergischen Soforttypreaktion

4.1.1 Analyse unterschiedlicher Salatvarietäten

4.1.1.1 Bestimmung des Proteinmusters unterschiedlicher Salatvarietäten

Von insgesamt fünf verschiedenen Salatvarietäten (Chicoree, Eisbergsalat, Romana, Mini-Romana und Frisee), die aus Spanien bezogen wurden, konnten mittels Tief-temperaturmethode (3.3.1.1) Extrakte hergestellt werden, die anschließend mittels SDS-PAGE (15%-PAGE, nicht reduzierte Bedingungen) (3.3.6) und Silberfärbung (3.3.9.2) auf Unterschiede im Proteinmuster analysiert wurden. Lediglich geringe Unterschiede wurden in der Stärke des Proteinmusters oberhalb von 6 kDa beobachtet (Abb. 4.1). Das Auftreten der Proteinbanden unterhalb von 6 kDa zeigte deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Varietäten. Lediglich die Innen- und Außenblätter des Eisbergsalats zeigten eine Proteinbande bei ca. 3,5 kDa (Spur 2 und 3).

Ein geringer Unterschied im Proteinmuster von jüngeren Salatblättern (Innenblätter) und älteren (Außenblätter) war ebenfalls nachweisbar (Abb. 4.1, Spur 2 versus 3 und 4 versus 5). Die Proteinbanden der Innenblätter des Eisbergsalats (Spur 2) zeichnen sich in den meisten Fällen durch eine stärkere Intensität aus (4 kDa, 8 kDa, 25 kDa, 32 kDa und 36 kDa). Im Gegensatz dazu zeigten die Außenblätter des Romanasalats intensivere Proteinbanden bei 16 kDa und 32 kDa (Spur 4 und 5).

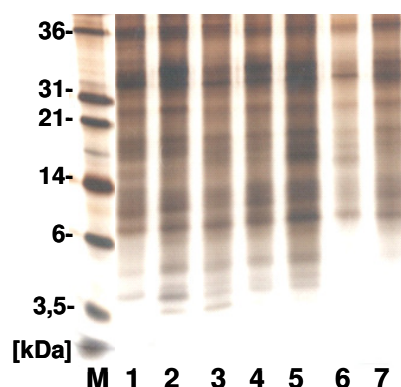


Abb. 4.1: Analyse unterschiedlicher Salatvarietäten mittels SDS-PAGE und Silberfärbung.

3,5 µg/cm wurden von jedem Proteinextrakt über ein 15%-iges Tris-Glycin-Gel aufgetrennt. 1: Chicoree; 2: Eisbergsalat Innenblätter; 3: Eisbergsalat Außenblätter; 4: Romana Innenblätter; 5: Romana Außenblätter; 6: Frisee; 7: Mini-Romana; M: Molekulargewichtsstandard Mark 12.

4.1.1.2 IgE-Reaktivität unterschiedlicher Salatvarietäten

Von den insgesamt 29 spanischen Salatallergikern (Tab. 9.1.1) zeigten sechs Seren deutliche Unterschiede in der IgE-Reaktivität gegen Kopfsalat- im Vergleich zu Mini-Romanasalatextrakt. Fünf Patienten (APF 7530, NSR 8059, AGG 8066, STV 1035 und LMC 11362) zeigten eine deutliche IgE-Bindung an ein 9 kDa Protein aus dem Kopfsalatextrakt, das als LTP identifiziert wurde (4.1.3), während keine Reaktivität oder eine wesentlich schwächere bei dem Mini-Romanasalatextrakt gefunden wurde (Abb. 4.2, A versus B, Spur 1-4 und 5). Ein einziges Serum (MCO 10161) zeigte eine stärkere Reaktivität gegen das 9 kDa Protein aus dem Mini-Romanasalat- im Vergleich zum Kopfsalatextrakt (Abb. 4.2, A versus B, Spur 5). Bei den Patientenseren MCO 10161 und LMC 11362 konnte eine zusätzliche Sensibilisierung gegen ein ca. 14 kDa Protein lediglich bei dem Mini-Romanasalatextrakt detektiert werden (Abb. 4.2, A versus B, Spur 5 und 6). Ein Kontrollserum von einem Nicht-Allergiker wurde mitgeführt und zeigte keine IgE-Reaktivität (Resultat nicht gezeigt). Immunoblot-Inhibitionsstudien mit Kopfsalat- und Mini-Romanasalatextrakt an der Festphase zeigten jeweils eine vollständige Aufhebung der IgE-Reaktivität der Salatallergikerseren durch Präinkubation der Seren mit jeweils der anderen Salatextraktvarietät (Daten nicht gezeigt). Somit wurden keine immunologischen Unterschiede zwischen Kopfsalat- und Mini-Romanasalatextrakt beobachtet.

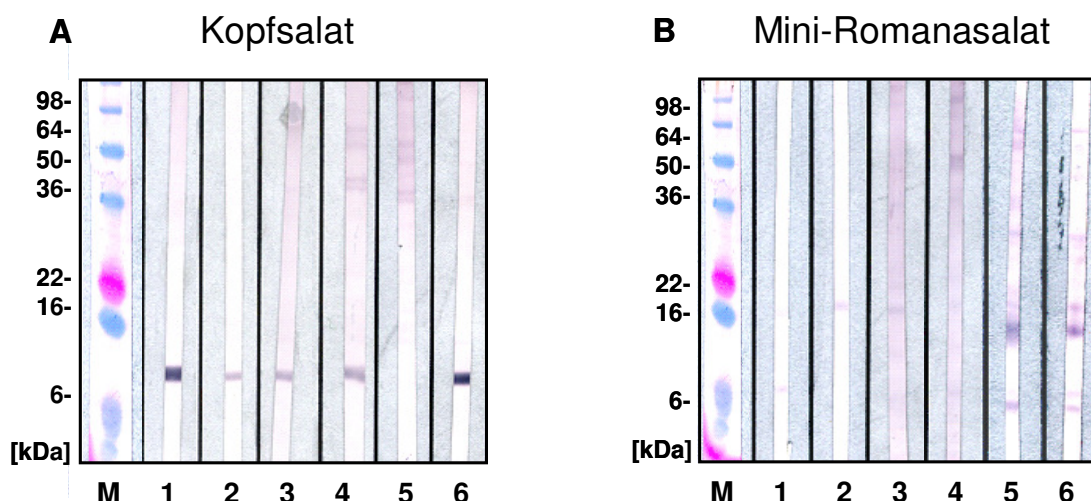


Abb. 4.2: IgE-Reaktivität ausgewählter spanischer Salatallergikerseren mit Kopfsalatextrakt (A) und Mini-Romanasalatextrakt (B) (60 µg/cm Extrakt).

1: APF 7530; 2: NSR 8059; 3: AGG 8066; 4: STV 1035; 5: MCO 10161; 6: LMC 11362

M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2.

Zusätzlich wurde Serum eines deutschen Salatallergikers (UR) mit allergischen Reaktionen auf Endiviansalat, die nach dem Verzehr von Kopfsalat ausblieben, untersucht. Das spezifische IgE gegen Kopfsalat wurde mittels CAP-FEIA-Bestimmung (3.3.12.3) (Kopfsalat f215, Phadia, Freiburg) bei diesem Patienten mit 0,52 U/ml (Klasse 1) bestimmt. Abbildung 4.3 A zeigt lediglich spezifisches IgE gegen LTP aus Kopfsalat (Spur 4) und nicht aus Endiviansalat (Spur 8). Ein kreuzreaktives anti-Pru p 3 Kaninchenserum (Positivkontrolle, Spur 3 und 7) konnte LTP im Kopfsalat- und Endiviansalatextrakt nachweisen. Die Puffer- (Spur 1) und Nicht-Allergiker-Kontrolle (Spur 2) zeigten keine IgE-Reaktivitäten. Abbildung 4.3 B zeigt eine komplette Inhibition der IgE-Reaktivität des deutschen Salatallergikerserums UR mit mit Kopfsalatextrakt (Positivkontrolle) (Spur 4), während der Endiviansalatextrakt lediglich eine partielle Inhibition bewirkte (Spur 5). Somit waren deutliche immunologische Unterschiede zwischen Kopf- und Endiviansalat nachweisbar.

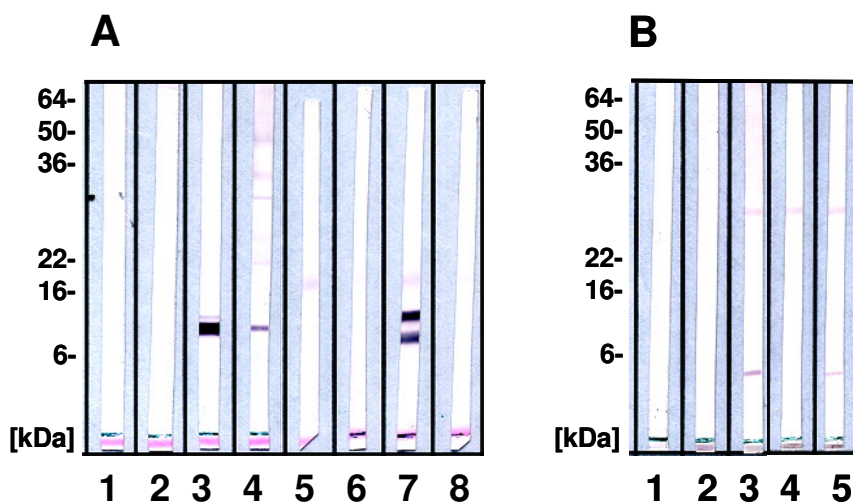


Abb. 4.3: IgE-Reaktivität (A) und Inhibition der IgE-Bindung (B) eines Serums von einem deutschen Salatallergiker (60 µg/cm Extrakt).

A: Spur 1-4 Kopfsalatextrakt; Spur 5-8 Endiviansalatextrakt

1, 5: Pufferkontrolle; 2, 6: Nicht-Allergiker PEI 231; 3, 7: anti-Pru p 3 Kaninchenserum;
4, 8: Patientenserum UR.

B: Spur 1-5 Kopfsalatextrakt

1: Pufferkontrolle; 2: Nicht-Allergiker PEI 231; 3: keine Inhibition; 4: Inhibition mit 100 µg Kopfsalatextrakt; 5: Inhibition mit 100 µg Endiviansalatextrakt.

4.1.2 Vergleich des LTP-Gehalts von jüngeren und älteren Salatblättern

Aufgrund von Berichten (persönliche Mitteilung von Frau Dr. med. M. San Miguel Moncin, Allergy Department of the Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spanien) einer stärkeren allergischen Reaktion der Patienten auf jüngere Salatblätter, insbesondere beim Verzehr von Mini-Romanasalat, wurden mittels Tieftemperaturmethode (3.3.1.1) Extrakte von inneren (jüngeren) und äußeren (älteren) Salatblättern des Eisberg- und Romansalats hergestellt und analysiert. Das IgE-reaktive Proteinmuster zeigte keine deutlichen Unterschiede in der Stärke der Bindung von IgE-Antikörpern (Abb. 4.4).

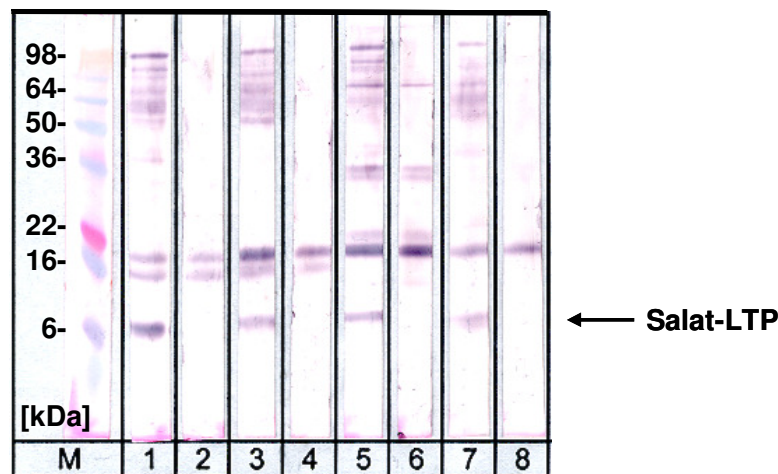


Abb. 4.4: IgE-Reaktivität eines Serenpools der Patienten LCGH 9343 (LTP-sensibilisiert) und YSF 8695 (höhermolekulare Allergene > 45 kDa) gegen Proteine aus inneren und äußeren Salatblättern des Eisberg- und Romansalats.

Seren: 1, 3: LCGH 9343; 5, 7: YSF 8695; 2, 4, 6, 8: Nicht-Allergiker PEI 131.

Festphase (60 µg/cm Extrakt): 1, 2: Innenblätter Eisbergsalat; 3, 4: Außenblätter Eisbergsalat; 5, 6: Innenblätter Romansalat; 7, 8: Außenblätter Romansalat; M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2.

4.1.3 Identifizierung des LTPs Lac s 1 aus Salat

Das LTP Lac s 1 aus Salat wurde in den verwendeten Extrakten durch Inhibitionsstudien unter Verwendung des deutschen Salatallergikerserums UR identifiziert. Abbildung 4.5 zeigt eine komplette Inhibition der IgE-Reaktivität des deutschen Salatallergikerserums mit den in Abschnitt 4.2.7 isolierten LTPs nPru p 3 aus dem Pfirsich (Spur 4) und rPru av 3 aus der Kirsche (Spur 5).

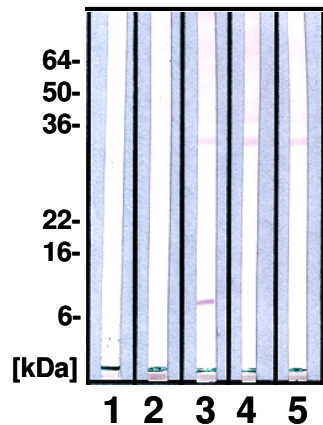


Abb. 4.5: Inhibition der IgE-Bindung eines Serums von einem deutschen Salatallergiker (60 µg/cm Kopfsalatextrakt).

1: Pufferkontrolle; 2: Nicht-Allergiker PEI 231; 3: keine Inhibition; 4: Inhibition mit 5 µg nPru p 3; 5: Inhibition mit 5 µg rPru av 3.

4.1.4 IgE-Sensibilisierungsmuster von Lac s 1

Unter den im IgE-Immunoblot (3.3.7) gegen Kopf- und Mini-Romanasalat getesteten spanischen Salatallergikern (n=29) trat ein charakteristisches Sensibilisierungsmuster auf. In Abbildung 4.6 wird dies am Beispiel von Kopfsalatextrakt exemplarisch für zwei spanische Patientenseren gezeigt. Entweder waren die Patienten monosensibilisiert gegen das LTP mit einer Größe von 6 kDa (Abb. 4.6, Spur 1) oder zeigten Reaktionen gegen höhermolekulare Allergene des Salats (> 50 kDa) (Abb. 4.6, Spur 2). In der Gruppe der spanischen Salatallergiker waren 10% (3/29) der Patienten gegen höhermolekulare Allergene des Kopfsalats sensibilisiert, 90% (26/29) der Patienten zeigten eine Monosensibilisierung gegen das LTP (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Spanien sind in Deutschland bis jetzt nur Einzelfälle von Patienten mit einer Salatallergie bekannt. Zwei der drei rekrutierten deutschen Salatallergiker (UR und AG) hatten ebenfalls eine Monosensibilisierung gegen das LTP aus Kopfsalat, während der dritte Patient (DG) gegen ein höhermolekulares Allergen (~35 kDa) sensibilisiert war (Daten nicht gezeigt).

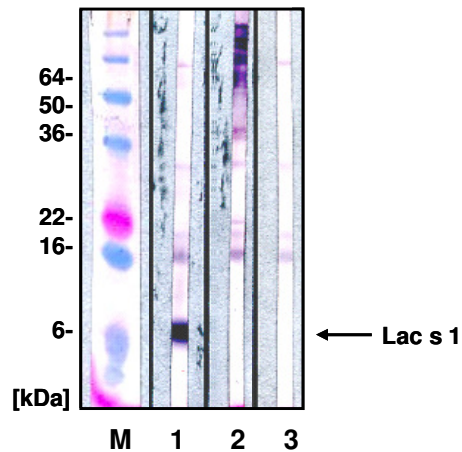


Abb. 4.6: IgE-Reaktivität von zwei ausgewählten Patientenseren mit Kopfsalatextrakt (60 µg/cm Extrakt).

1: LCGH 9343; 2: YSF 8695; 3: Nicht-Allergiker PEI 230

M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2.

4.1.5 Häufigkeit und Stärke der Sensibilisierung gegen Salatextrakt

29 der 51 spanischen Lebensmittelallergiker, die gezielt aufgrund einer Allergie gegen Pfirsich, Kirsche, Haselnuss und Salat rekrutiert wurden, haben eine Salatallergie, während aus Deutschland drei Seren aus Einzelfallbeschreibungen zur Verfügung standen. Eine umfangreichere Rekrutierung von Salatallergikern wurde in Deutschland jedoch nicht durchgeführt.

In der spanischen Patientengruppe (n=29) wurde eine IgE-abhängige Sensibilisierung gegen das LTP aus Kopfsalatextrakt mit einer Häufigkeit von 90% mittels IgE-Immunoblot gefunden. Im Gegensatz dazu wurde mittels kommerziellen ImmunoCAPs (3.3.12.3), mit denen die IgE-Bindung gegen Kopfsalatextrakt quantitativ bestimmt wurde, eine deutlich geringere Sensitivität von nur 76% beobachtet. Die IgE-Konzentrationsbestimmungen mittels dieses Tests fielen mit 0,36-2,9 U/ml (Klasse 1-2) niedrig aus. Bei den drei deutschen Patienten (3.1.9) wurden ebenfalls geringe Mengen an spezifischem IgE (UR: 0,52 U/ml, AG: 0,46 U/ml und DG: <0,35 U/ml) mittels kommerzieller ImmunoCAPs gegen Kopfsalatextrakt nachgewiesen.

4.1.6 Identifizierung immunologisch relevanter Kohlenhydratstrukturen

Mit dem Serum AFC 7241 war eine IgE-Reaktivität gegen höhermolekulare Salatallergene (45-100 kDa) detektierbar. Hingegen detektierte das Serum EDP 6491

das Salat-LTP *Lac s 1* (6 kDa) (Abb. 4.7). Durch eine homologe Inhibition (Positivkontrolle), bei der die Seren mit dem Salatextrakt präinkubiert wurden, konnten alle IgE-reaktiven Banden inhibiert werden (Spur 2), während mit Milchpulverlösung keine Inhibition zu erkennen war (Spur 3) (3.3.8). Die IgE-Reaktivitäten der höhermolekularen Salatallergene waren durch eine Präinkubation des Serums AFC 7241 mit dem Glykopeptid MUXF ($\text{Man}\alpha 1-6(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$) nahezu komplett inhibierbar (AFC 7241, Spur 4). Durch Präinkubation des Serums EDP 6491 mit MUXF wurde hingegen die IgE-Reaktivität nicht inhibiert (EDP 6491, Spur 4). Das Glykopeptid MM ($\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$) inhibierte bei keinem der beiden Seren die IgE-Bindung (Spur 5). Die Invertase *Lyc e 2* aus der Tomate [Westphal et al. 2003] diente in diesem Versuch als Positivkontrolle für ein bekanntes IgE-reaktives Glykoprotein (Spur 6-8). Die nahezu komplette Inhibition der höhermolekularen Allergene durch das Glykopeptid MUXF zeigte, dass die IgE-Reaktivität des Serums AFC 7241 durch Kohlenhydratepitope determiniert war.

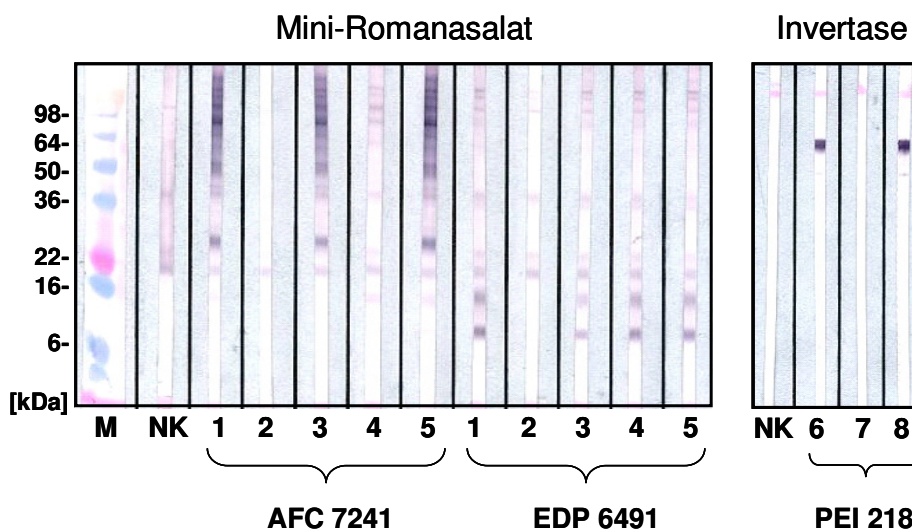


Abb. 4.7: Immunoblotinhibition der IgE-Reaktivität der Patientenserum AFC 7241 und EDP 6491.

IgE-Immundefektion von 60 µg/cm Mini-Romanasalatextrakt (links) und 0,5 µg/cm natürlicher Invertase *Lyc e 2* aus der Tomate (rechts).

1, 6: keine Inhibition; 2: Inhibition mit 100 µg Mini-Romanasalatextrakt; 3: Inhibition mit 100 µg Milchpulver; 4, 7: Inhibition mit 25 µg MUXF; 5, 8: Inhibition mit 25 µg MM; NK: Nicht-Allergikerserum PEI 230; M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2. AFC 7241: sensibilisiert gegen höhermolekulare Salatallergene, EDP 6491: LTP-sensibilisiert und PEI 218: Tomatenallergiker mit *Lyc e 2* Sensibilisierung.

4.1.7 Identifizierung von LTP-Isoformen aus Salat

4.1.7.1 Identifizierung von Lac s 1.1 und Lac s 1.2

Zwei LTP-Isoformen, Lac s 1.1 (Acc. No. EF101532) und Lac s 1.2 (Acc. No. EF101531), aus Salat wurden in Vorversuchen identifiziert. Hierbei wurde die Gesamt-RNA aus Salat unter Verwendung des RNeasy Plant Mini Kit (3.2.14) isoliert und mittels RT-PCR (3.2.22) in cDNA umgeschrieben. Nachfolgend wurde die cDNA unter Verwendung eines degenerierten sense Primers (LTP 8, Tab. 3.1), der von einem konservierten Sequenzabschnitt des Beifuss-LTPs Art v 3 (Acc. No. P0C088) abgeleitet wurde, und einem Oligo-d(T)-Primer mittels PCR amplifiziert. Die unbekanntenen 5'-Enden der erhaltenen cDNA-Fragmente wurden mittels 5'RACE (3.2.30) unter Einsatz des im Kit enthaltenen 5'Gene Racer Primers und der degenerierten antisense Primer (GSP1 Salat LTP oder GSP2 Salat LTP, Tab. 3.1) identifiziert. Anschliessend wurden die Vollängen-cDNA-Konstrukte beider Salatisoformen durch Einsatz der spezifischen Primer (K1 in SP/ K2 cterm und K6 ab SP/K1 cterm, Tab. 3.1) mittels PCR erhalten. Die daraus abgeleitete Aminosäure-abfolge ergab für die Lac s 1.1 Isoform eine Länge von 89 Aminosäuren, während die zweite Isoform Lac s 1.2 eine Größe von 91 Aminosäuren besaß (Abb.4.8, A). Die Anzahl und Position der acht Cysteinreste ist bei beiden Isoformen identisch. Die Aminosäuresequenzen beider Isoformen waren zu 62% identisch. Die N-terminale Sequenz des nLac s 1 (n=12) [Miguel-Moncin et al. 2003] zeigte im Vergleich mit beiden Isoformen 58% (7/12) (Lac s 1.1) und 42% (5/12) (Lac s 1.2) identische Aminosäuren. Im Gegensatz dazu zeigten beide Isoformen aus Salat mit der N-terminalen Sequenzen des Platanenpollen-LTPs Pla a 3 (n=25) [Lauer et al. 2007] eine Übereinstimmung von 72% (18/25) (Lac s 1.1) und 56% (14/25) (Lac s 1.2). Das natürliche Salat-LTP zeigte ebenfalls eine Übereinstimmung von 58% (7/12) mit der N-terminalen Sequenz des nPla a 3. Die N-terminale Sequenz des nArt v 3 (n=37) zeigte im Vergleich mit beiden Isoformen 46% (17/37) (Lac s 1.1) und 54% (20/37) (Lac s 1.2) identische Aminosäuren. Lac s 1.1 besitzt 66% identische Aminosäuren mit entfernt verwandten LTPs aus Pfirsich (Pru p 3 Acc. No. AJ277163) und Kirsche (Pru av 3 Acc. No. AF221501), während 57% identische Aminosäuren mit dem Haselnuss-LTP (Cor a 8 Acc. No. AF329829) vorliegen. Lac s 1.2 zeigte geringere Sequenzübereinstimmungen von 56% bzw. 58% mit dem Pfirsich- bzw. Kirsch-LTP und 55% mit dem Haselnuss-LTP (Abb. 4.8, B). Die Aminosäuresequenz beider

Beispiel eines Vollängen-mRNA-Konstrukts einer LTP-Isoform aus Salat mit einer Größe von 90 Aminosäuren, welche durch die cDNA-Bibliothek aus Salat isoliert werden sollen. Unter Berücksichtigung der Nukleotidlänge der 5' UTR, des LTP-Signalpeptids, der kodierenden Region und der 3' UTR ergibt sich eine erwartete Größe von ca. 700 bp für die gesuchten LTP-Vollängenfragmente. In Abb. 4.9 B ist deutlich zu sehen, dass Konstrukte dieser Größe in der isolierten mRNA vorhanden waren (Abb. 4.9 B, Pfeil).

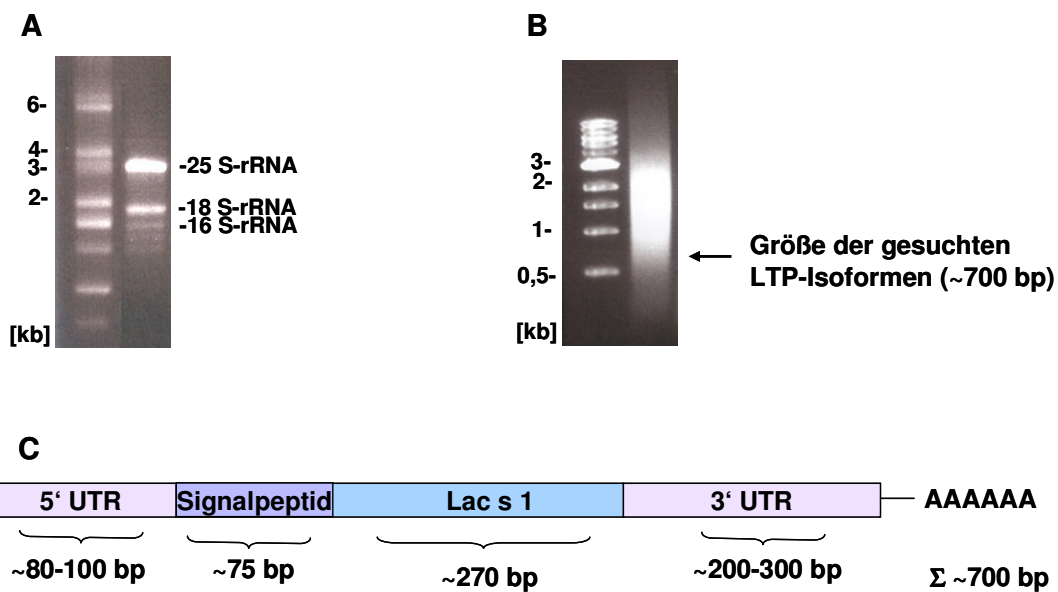


Abb. 4.9: Isolation der Gesamt-RNA und der mRNA aus Salat.

A: 2,2 µg Gesamt-RNA; B: 650 ng mRNA; C: schematische Darstellung eines LTP-Vollängenkonstrukts. (A und B: 1,5% Agarosegel).

Die mRNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben (3.2.26.3) und präsentierte die Gesamtheit der exprimierten Gene des kompletten Salatgewebes. Zur Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek aus Salat wurde mittels PCR (3.2.23) unter Einsatz der Salat-LTP spezifischen Primer (3.1.5) (Tab. 3.1, siehe auch Abb. 4.10 B, Lac s 1.1: K1 in SP/K2 cterm und Lac s 1.2: K6 ab SP/K1 cterm), die initial zur Amplifikation der beiden LTP-Isoformen Lac s 1. 1 und Lac s 1.2 verwendet wurden, überprüft, ob die cDNA der beiden Isoformen in der Bibliothek enthalten waren. Wie in Abb. 4.10 A dargestellt konnte die cDNA beider LTP-Isoformen als deutliche DNA-Bande detektiert werden, die mit der errechneten Größe von 345 bp für Lac s 1.1 (Spur 1) und 270 bp für Lac s 1.2 (Spur 2) übereinstimmten. Die Sequenzierung (3.2.25) beider PCR-Produkte bestätigte eine komplette Übereinstimmung mit den bekannten

Sequenzen der beiden Salatisoformen Lac s 1.1 und Lac s 1.2. Die eingesetzten Primer waren somit Isoform-spezifisch. Eine bekannte cDNA Sequenz aus *Lactuca sativa* stand zu dem Zeitpunkt der Untersuchungen nicht in der NCBI-Gendatenbank als Positivkontrolle zur Verfügung.

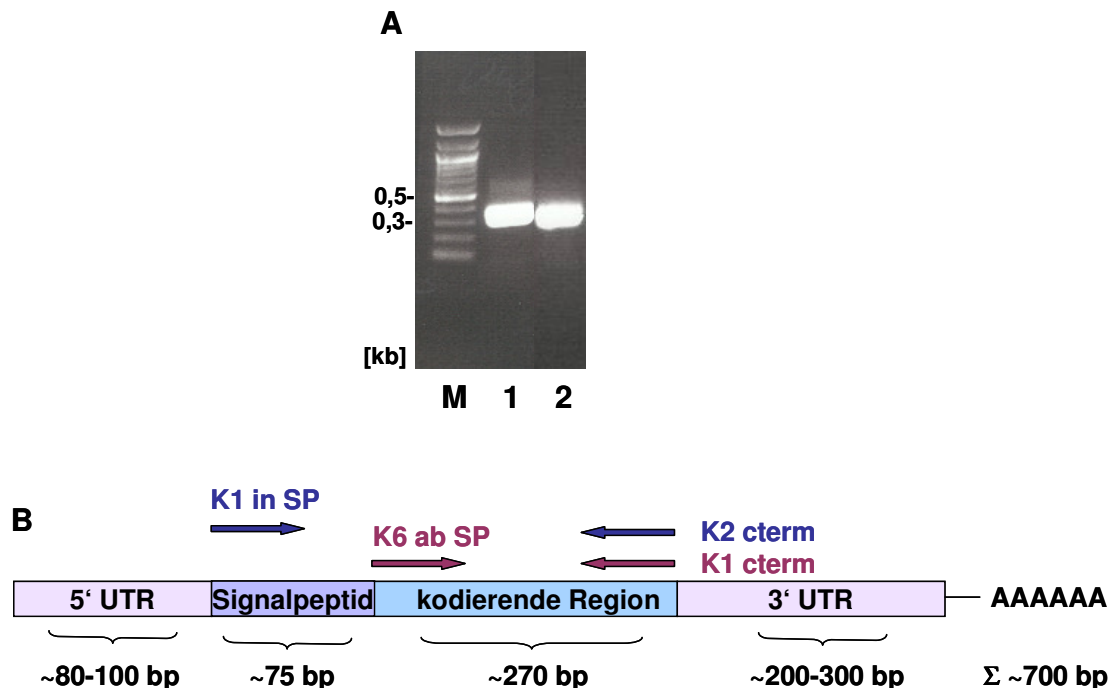


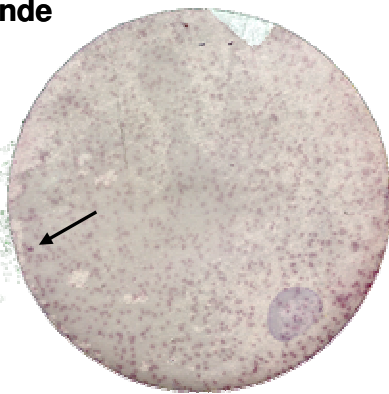
Abb. 4.10: Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek aus Salat mit spezifischen Lac s 1 Primern.

A = M: 100 bp Ladder; 1: Lac s 1.1 cDNA, Primer: K1 in SP / K2 cterm; 2: Lac s 1.2 cDNA, Primer: K6 ab SP / K1 cterm.

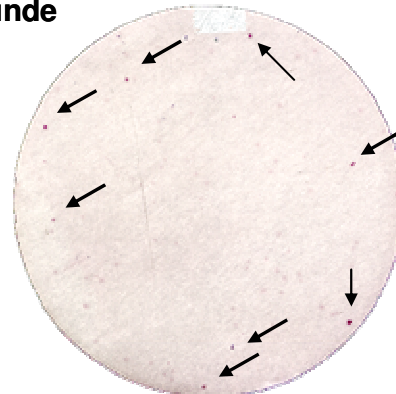
B = Darstellung der Hybridisierungsstellen für die spezifischen Salat-Primer am Schema einer cDNA Salat-LTP-Isoform.

Die isolierten cDNA-Fragmente wurden zur Vermehrung in den Klonierungsvektor pSCEEN-1b(+) (3.1.6) eingebracht und anschließend in die Phagenköpfe eingeschleust (3.2.26.4). Die cDNA-Bibliothek aus Salat besaß eine Größe von 4×10^5 pfu/ml vor der Amplifizierung (3.2.26.5) und 3×10^9 pfu/ml danach (3.2.26.6). Nach der Amplifizierung folgte ein Immunscreening (3.2.27) mit einem Pool der Seren YSF 8695 und AFC 7241, um weitere Salatallergene isolieren und identifizieren zu können. Ausgewählt wurden die Seren aufgrund ihrer spezifischen IgE-Reaktivität, die mittels IgE-Immunoblot (3.3.7) gegen Kopfsalat- und Mini-Romanasalat bestimmt wurde. Nach dem Screening von vier Agarplatten (\varnothing 10 cm) mit jeweils 3×10^4 pfu/ml rekombinanten Phagen, konnte ein positiver Klon detektiert

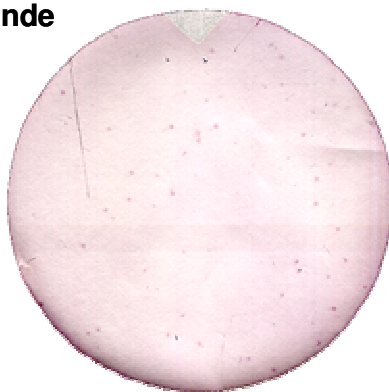
werden (siehe Abb. 4.11, 1. Runde). Das Rescreening (3.2.28) wurde mehrere Amplifizierungsrunden wiederholt, bis alle Plaques auf der Agarplatte als cDNA tragende Klone detektiert wurden. Nach der 2. Runde wurden acht positive Klone unter 87 Plaques beobachtet. Diese Anreicherung nahm in der 3. Runde auf weitere 61 positive Plaques von insgesamt 93 zu. In der nachfolgenden Amplifikationsrunde konnten die insgesamt 44 Plaques als cDNA tragende Klone detektiert werden.

1. Runde

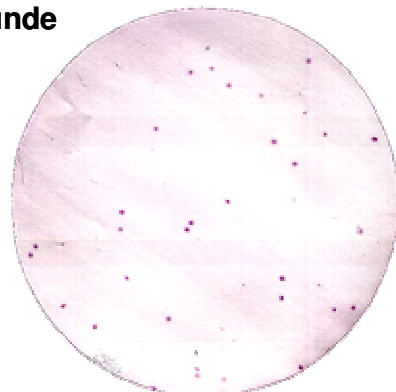
Plaques Σ	1380
Positive Plaques	1 (0,07%)

2. Runde

Plaques Σ	87
Positive Plaques	8 (9,2%)
Anreicherungsfaktor	131

3. Runde

Plaques Σ	93
Positive Plaques	61 (65%)
Anreicherungsfaktor	7

4. Runde

Plaques Σ	44
Positive Plaques	44 (100%)
Anreicherungsfaktor	1,5

Abb. 4.11: IgE-Immunscreening der cDNA-Bibliothek aus Salat mit einem Pool der Patientenserum YSF 8695 und AFC 7241 zur Identifizierung von höhermolekularen Allergenen.

Pro Platte 3×10^4 pfu/ml rekombinanten Phagen; Platte 2-4 Reamplifikation des positiven Phagenklons von Platte 1 (Pfeil).

Durch eine *in vivo* „Excision“ (3.2.29) des Vektors pSCEEN-1b(+) von dem positiv selektierten Phagen und dessen Integration in ein bakterielles Plasmid, sowie einer nachfolgenden DNA-Sequenzierung (3.2.25), wurde mit der erhaltenen Sequenzinformation mittels 5'RACE (3.2.30) (Primer: 5'Gene Racer Primer; Salat hm rev 1 oder Salat hm rev 2, Tab. 3.1) ein Vollängen-cDNA Konstrukt erhalten. Durch Sequenzanalysen in einer Datenbank (NCBI → Blast) wurde die isolierte cDNA als ribosomale RNA identifiziert und zeigte eine identische Nukleotidsequenz von 99% mit der 16s rRNA aus *Nicotiana plumbaginifolia* (Familie: *Solanaceae*, Gattung: Tabak). Die IgE-Reaktivität, die mit den beiden Salatallergikerseren YSF 8695 und AFC 7241 detektiert wurde, erwies sich somit als unspezifische Reaktion.

Durch ein Immunscreening (3.2.27) zur Identifikation weiterer Salat-LTP-Isoformen mit den Seren AMA 7334, GVC 6391, SGR 7268 und SSG 7799, von LTP-monosensibilisierten Salatallergikern, wurden keine positiven Klone detektiert. Insgesamt wurden 14 Agarplatten (Ø 10 cm) mit jeweils 3×10^4 pfu/ml rekombinanten Phagen gescreent. Durch ein serologisches Screening der cDNA-Expressionsbibliothek aus Salat in *E. coli* konnten letztendlich keine positiven Transformanden identifiziert werden.

4.2 Klonierung, Expression, Extraktion und Reinigung der LTPs

4.2.1 Klonierung der LTPs in den Hefeexpressionsvektor pPICZαA

Für die Klonierungen in den Hefeexpressionsvektor pPICZαA (3.2.2) wurde die cDNA von Pru p 3 und beiden Lac s 1-Isoformen mit spezifischen Primern (Pru p 3: Pru p 3 sense/Pru p 3 antisense; Lac s 1.1: K1 in SP/K2 cterm und Lac s 1.2: K6 ab SP/K1 cterm, Tab. 3.1) aus cDNA des jeweiligen Lebensmittels, die nach einer RT-PCR (3.2.19) zur Verfügung stand, mittels PCR (3.2.23) isoliert. Die cDNA der LTPs Cor a 8 und Pru av 3 standen aus der Plasmidbank der Abteilung „Allergologie“ des Paul-Ehrlich-Instituts zur Verfügung. Anschließend erfolgte eine Klonierung der PCR-Produkte über die Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I in den pPICZαA Vektor (siehe Abb. 4.12).

Zu Beginn wurde die cDNA der LTPs Pru av 3 und Cor a 8 in den pPICZαA Vektor so kloniert, dass ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen c-myc- und Histidin-Tag gebildet wurde, die durch das Fehlen einer Endoproteaseschnittstelle nicht

abgespalten werden konnten. Aufgrund fehlender Erfahrung über die Expressionsrate, diente der C-terminale Fusionsanteil zur Kontrolle der Expression. Nach ersten Induktionsergebnissen war deutlich zu erkennen, dass die LTPs in großen Mengen exprimiert wurden und ein zusätzlicher Fusionsanteil nicht notwendig war. Der C-terminale Anhang von 43 Aminosäuren im Vergleich zu der LTP-Proteingröße im Durchschnitt von 90 Aminosäuren, könnte zudem einen negativen Einfluss auf die Proteinfaltung und Epitopbildung haben. Aus diesem Grund war das Ziel die Herstellung eines rekombinanten Proteins ohne Fusionsanteil. Hierfür wurde mittels Site-directed-mutagenesis (3.2.24) bei beiden LTPs durch spezifische Primer (Tab. 3.1) am C-terminalen Ende im Anschluss an die kodierende Sequenz ein Stopcodon eingefügt. Die PCR-Produkte der restlichen LTPs Pru p 3, Lac s 1.1 und Lac s 1.2 beinhalteten, neben den Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I, zuzüglich ein eingefügtes Stopcodon im Anschluss der kodierenden Sequenz (Tab. 3.1), wodurch die Proteine direkt ohne C-terminalen Anhang exprimiert wurden.

Positive pPICZ α /LTP-Konstrukte wurden durch eine Kontrollrestriktion der DNA (3.2.18) mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Xba*I identifiziert und wurden zusätzlich durch eine Sequenzanalyse (3.2.25) überprüft. Zur Expression und Reinigung der LTPs (Pru p 3, Pru av 3, Cor a 8, Lac s 1.1 und Lac s 1.2) wurde im Folgenden mit den positiven pPICZ α /LTP-Konstrukten gearbeitet, die keinen C-terminalen Anhang besaßen.

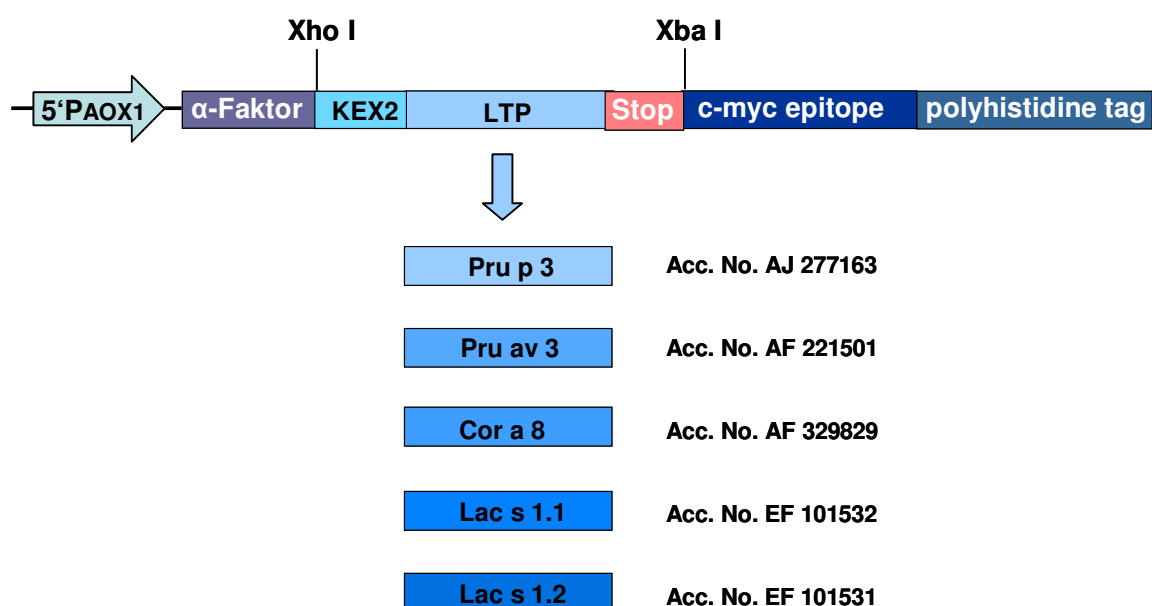


Abb. 4.12: Schematische Darstellung der pPICZ α /LTP-Konstrukte.

4.2.2 Expression der LTPs Pru p 3, Pru av 3, Cor a 8 und Lac s 1 in *P. pastoris*

Nach Herstellung der unterschiedlichen LTP-Konstrukte (siehe 4.2.1) wurden die positiven pPICZ α /LTP-Konstrukte mittels Elektroporation (3.2.5) in die Hefe *P. pastoris* eingeschleust und durch homologe Rekombination (3.2.3) in das Genom integriert. Zur Expressionskontrolle wurde der pPICZ α Vektor ohne Insert ebenfalls in *P. pastoris* transformiert. Eine Selektion der positiven Klone erfolgte durch die neu erworbene Zeocin-Resistenz. Zur Überprüfung der integrierten DNA und zur Bestimmung des Mut-Phänotyps wurde eine Kolonie-PCR (3.2.6) durchgeführt, bei der die eingesetzten Primer (5' AOX1/3'AOX1, Tab. 3.1) die inserierte Vektor-DNA (860 bp) bzw. das AOX1 Gen (2,2 kb) amplifizierten. Durch die Detektion einer DNA-Bande von 860 bp wurde die Integration der Vektor-DNA in das Hefegenom nachgewiesen (siehe Abb. 3.2). Hierbei wurde durch ein Gene-Replacement das AOX1-Gen durch die Vektor-DNA ersetzt (Abb. 3.2, B). Im Hefegenom befand sich demnach nur noch das AOX2-Gen für den Methanolabbau. Die Lac s 1-Isoform-, Pru av 3- und Cor a 8-Transformanden gehörten zu den so genannten Mut^s-Phänotypen und konnten somit nur langsam in methanolhaltigem Medium wachsen. Wurde neben einer 860 bp Vektor-DNA-Bande eine zusätzliche von 2,2 kb des AOX1-Gens detektiert, gehörten die Transformanden zu den so genannten Mut⁺-Phänotypen (Abb. 3.2, A). Alle Pru p 3-Transformanden entsprachen diesem Mut⁺-Phänotypen.

Es folgte die Kultivierung der selektionierten Klone in dem Anzuchtmedium BMGY. Entsprechend zum jeweiligen Mut-Phänotyp wurde das jeweilige Induktionsprotokoll verwendet (3.2.7). Durch die Überführung der Hefezellen in das methanolhaltige Induktionsmedium BMMY wurde die Expression der Proteine induziert. Durch ein N-terminales Sekretionssignal (α -Faktor) wurden die gebildeten Proteine in den Kulturüberstand sezerniert. Anschließend wurden die im Überstand befindlichen Proteine mittels SDS-PAGE (3.3.6) analysiert.

Abb. 4.13 zeigt die Proteine des Hefeüberstandes nach der jeweiligen Induktion der LTP-Proteinsynthese mittels SDS-PAGE (3.3.6) und Silberfärbung (3.3.9.2). Die Auftrennung zeigte für die jeweilige Expression eine deutlich erkennbare LTP-Bande im niedermolekularen Bereich um die 6 bis 14 kDa. Neben dieser relativ scharfen LTP-Bande wurden weitere hefespezifische Proteine im höhermolekularen Bereich

angefärbt, die ebenfalls in der Expressionskontrolle (pPICZαA Vektor ohne LTP-Insert) zu sehen waren (Daten nicht gezeigt). Bei Cor a 8 ließ sich zusätzlich eine deutliche Bande im niedermolekularen Bereich beobachten (Abb. 4.13, grauer Pfeil), die ebenfalls im Kulturüberstand der Expressionskontrolle nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich hierbei um Bestandteile des Medium oder um hefespezifische Proteine.

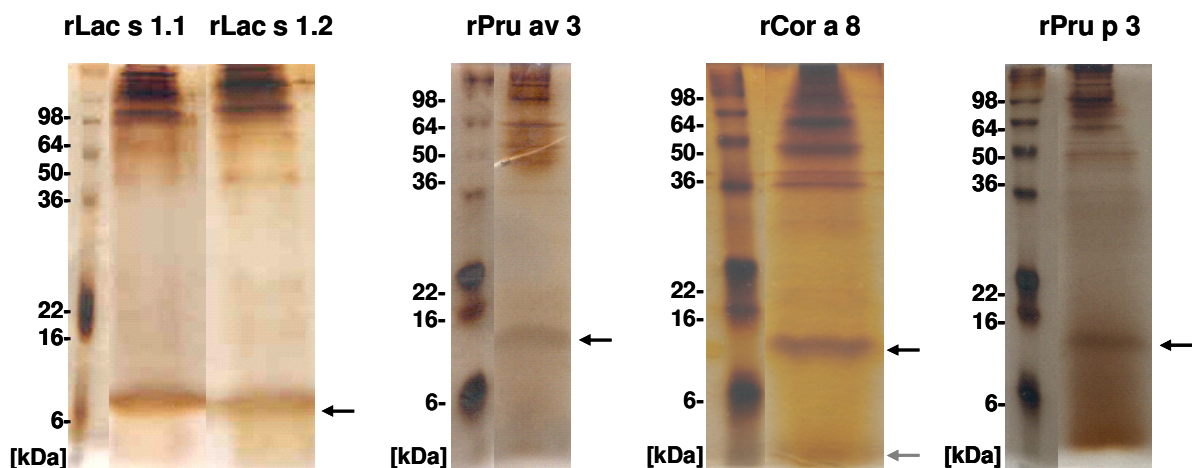


Abb. 4.13: SDS-PAGE der Proteine aus dem Hefekulturüberstand nach Induktion der Proteinsynthese (Silberfärbung).

40 µl von jedem Kulturüberstand wurden auf ein 15%-iges Tris-Glycin-Gel aufgetragen. Die LTP-Bande ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Der graue Pfeil zeigt eine Bande im niedermolekularen Bereich. Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2.

Die exprimierten Proteine im Kulturüberstand wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und sollten mit einem kreuzreaktiven Kaninchen anti-Pru p 3-Serum identifiziert werden. Bei rPru av 3, rCor a 8 und rPru p 3 wurde eine deutliche IgG-reaktive Proteinbande detektiert (Daten nicht gezeigt), während für beide Lac s 1-Isoformen keine immunologische Reaktion auftrat (Daten nicht gezeigt). Durch eine nachfolgende IgE-Immundetektion (3.3.7) bei Verwendung eines Serums von einem Salatallergiker wurden ebenfalls keine IgE-reaktiven Proteinbanden gefunden (Daten nicht gezeigt). Beide Lac s 1-Isoformen wurden daraufhin N-terminal ansequenziert (3.3.11.2) und zeigten einen Verlust von 23 Aminosäuren am N-terminalen Ende (4.4.2). Die Abspaltung erfolgte bei beiden Proteinen nach einer identischen Aminosäureabfolge (YLRNGG↓). Hierbei scheint

es sich um eine spezifische Schnittstelle von hefespezifischen Endoproteasen zu handeln. Eine Identifizierung dieser spezifischen Endoproteasen war nicht möglich. Durch Zugabe eines Proteaseinhibitor-Cocktails (P-8215, Lot 114K4131, Sigma, Deisenhofen) zu dem methanolhaltigen Induktionsmedium, dessen Inhaltsstoffe Serin-, Cystein-, Asparagin- und Metalloproteasen inhibieren, konnte keine Verbesserung der Lac s 1-Proteinsynthese erzielt werden. Aus diesem Grund wurden beide LTP-Isoformen aus Salat als Alternative in den prokaryotischen pET100/D-TOPO Vektor umklontiert und in *E.coli* exprimiert (4.2.3).

4.2.3 Chromatographische Reinigung der in *P. pastoris* exprimierten LTPs

Die im Hefekulturüberstand angereicherten Proteine (rPru av 3, rCor a 8 und rPru p 3) wurden mittels chromatographischer Reinigung (3.3.2.1 und 3.3.2.2) für weitere Analysen isoliert.

4.2.3.1 Chromatographische Reinigung von rPru av 3 (*P. pastoris*)

Das Protein wurde wie unter 4.2.2 beschrieben in *P. pastoris* exprimiert und mittels Sekretionssignalpeptid in den Kulturüberstand transportiert. Nach Abspaltung des Sekretionssignalpeptids durch hefespezifische Endoproteasen lag rPru av 3 als Nicht-Fusionsprotein im Kulturüberstand zur weiteren Reinigung vor. Der Überstand von 200 ml Kultur wurde gefriergetrocknet und in 20 ml des Startpuffers der Mono S HR 5/5 Säule gelöst (3.3.2.1). Es folgte eine Dialyse gegen den Startpuffer (3.3.2.1), wobei eine Volumenzunahme auf insgesamt 40 ml entstand. Um die Kapazität der Mono S HR 5/5 Säule (maximal 50 mg Protein) effektiv zu nutzen, wurde sie im Anschluss vorsichtshalber mit der Hälfte des dialysierten Materials (~17 mg Protein) beladen. Rekombinantes Pru av 3 eluierte bei ca. 120 mM bis 190 mM NaCl von der Säule (Abb. 4.14, oben). In den vorherigen Fraktionen (Durchlauf und Fraktionen 1-8) konnte schon vor der Elution mittels NaCl-Gradient ungebundenes Material von rPru av 3 von hoher Reinheit gesammelt werden (Abb. 4.14, unten). An der Säule gebundenes rPru av 3 wurde anschließend mit Verunreinigungen durch Hefeproteine, die sich bei der gleichen Salzkonzentration von der Säule lösten, eluiert (Fraktion 9-14) (Abb. 4.14, unten). Die Fraktionen 1-14 wurden vereinigt und einer weiteren Reinigung mittels Gelchromatographie (3.3.2.2) unterzogen, um die Hefeproteine von Pru av 3 abzutrennen.

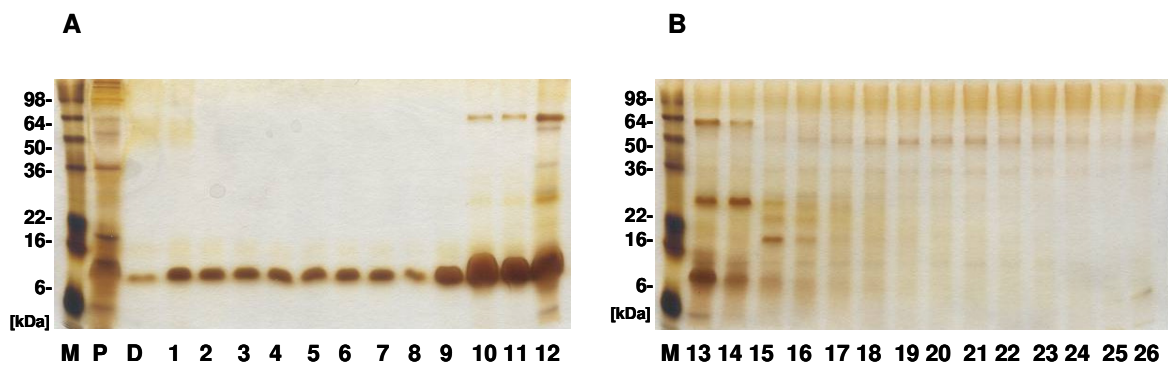
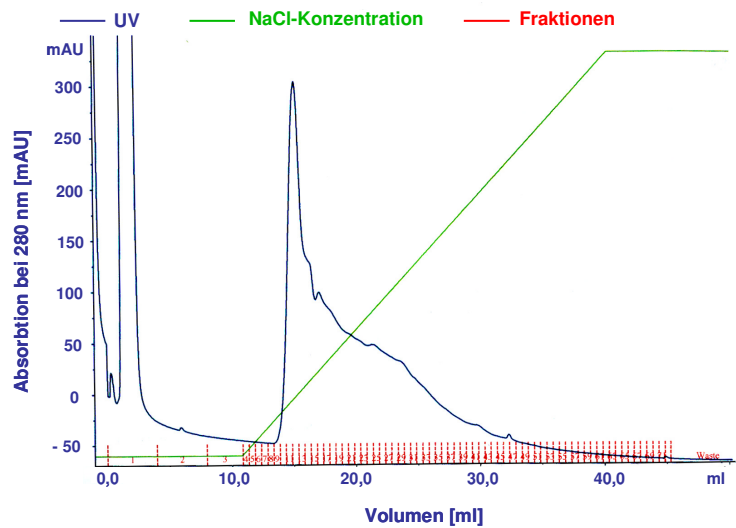


Abb. 4.14: Reinigung von rPru av 3 mittels Kationenaustausch-Chromatographie.

(oben) Chromatogramm des Hefekulturüberstandes nach Induktion der Pru av 3 Proteinsynthese (Mono S HR 5/5 Säule). Säulenvolumen: 1 ml, Probenvolumen: 20 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Bindungspuffer: 50 mM NaAc, pH 5, Elutionspuffer: 50 mM NaAc, 1 M NaCl, pH 5. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu 1 M (0-100% Elutionspuffer), während das Eluat unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt wurde.

(unten) Die einzelnen Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycinegel getrennt (Silberfärbung). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; P: Probe; D: Durchlauf, Spur 1-3: Waschschrift, Spur 4-26: Elution.

Der partiell gereinigte Proteinpool wurde gefriergetrocknet und in 1 ml Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) (3.3.2.2) gelöst (Abb. 4.15, Probe), um anschließend die Superdex 75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule zu beladen. Die Elution erfolgte mit einem konstanten Salzgradienten von 0,5 M NaCl. Rekombinantes Pru av 3 wurde nach ca. 15 ml Durchlauf des Elutionspuffers mit einer Reinheit von über 95% von der Säule eluiert (Abb. 4.15, oben). Die Fraktionen 15-19 (2,5 ml) wurden vereinigt (Abb. 4.15, unten).

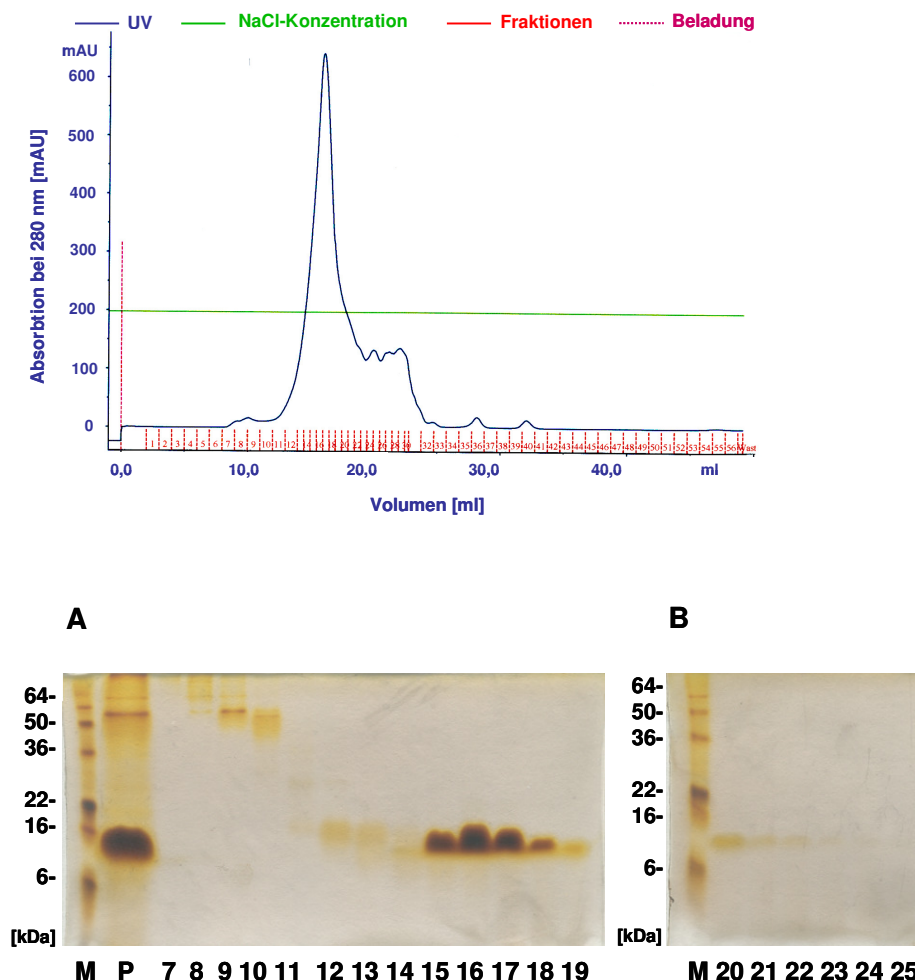


Abb. 4.15: Reinigung des partiell gereinigten Pru av 3 mittels Gelchromatographie.

(oben) Chromatogramm des partiell gereinigten Pru av 3 (Superdex 75 HR 10/30 Säule). Säulenvolumen: 24 ml, Probenvolumen: 1 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Elutionspuffer: 20 mM Morpholinopropansulfonsäure, 0,5 M NaCl, pH 7,6. Das Eluat wurde unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt.

(unten) Die einzelnen Fraktionen der Gelchromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycingel getrennt (Silberfärbung). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; P: Probe.

Die andere Hälfte des dialysierten Hefekulturüberstandes wurde derselben Reinigungsstrategie unterzogen und lieferte ebenfalls einen Pru av 3 Proteinpool (2,5 ml) von hoher Reinheit. Nach der Vereinigung der beiden Pools (5 ml) wurde mittels BCA-Proteinbestimmung (3.3.3.2) eine Konzentration von 1,2 mg/ml ermittelt. Daraus resultierte eine Gesamtausbeute von 6 mg rPru av 3 mit einer abgeschätzten Reinheit von über 95% (Abb. 4.25).

4.2.3.2 Chromatographische Reinigung von rCor a 8 (*P. pastoris*)

Rekombinantes Cor a 8 wurde, wie für rPru av 3 unter 4.2.3.1 beschrieben, aus 200 ml Hefekulturüberstand isoliert. Lediglich die Beladung der Kationenaustauschersäule mit dem gesamten dialysierten Material (40 ml) wich von der unter 4.2.3.1 beschriebenen Durchführung ab.

Cor a 8 eluierte bei ca. 120-280 mM NaCl (Abb. 4.16, oben) und konnte in den Fraktionen 10-14 mit Verunreinigungen von höhermolekularen Hefeproteinen detektiert werden (Abb. 4.16, unten). Die Cor a 8 enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet, um sie anschließend in 0,5 ml MOPS-Puffer (3.3.2.2) zu lösen (Abb. 4.17, Probe) und einer weiteren Reinigung mittels Gelchromatographie (3.3.2.2) zu unterziehen.

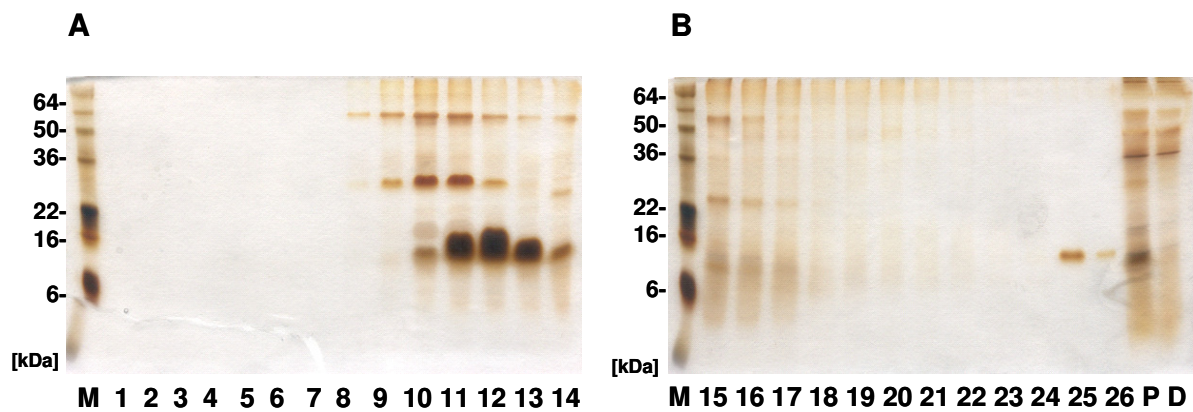
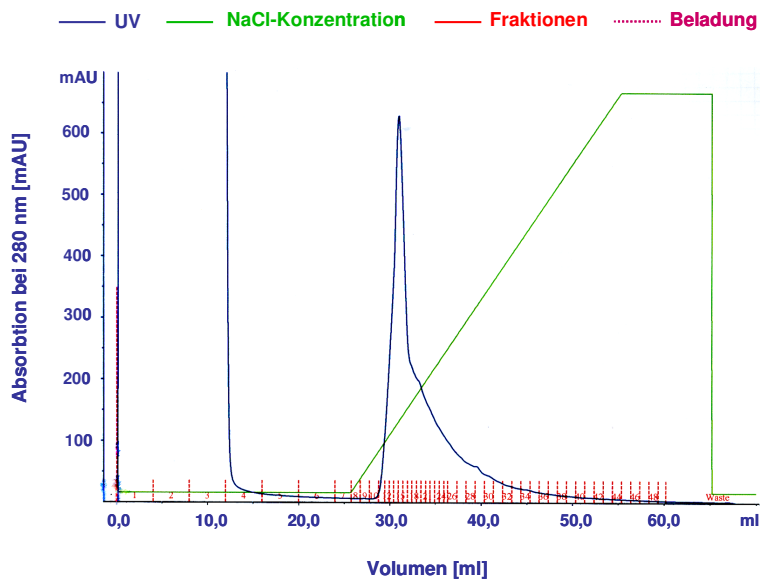


Abb. 4.16: Reinigung von Cor a 8 mittels Kationenaustausch-Chromatographie.

(oben) Chromatogramm des Hefekulturüberstandes nach Induktion der Cor a 8 Proteinsynthese (Mono S HR 5/5 Säule). Säulenvolumen: 1 ml, Probenvolumen: 40 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Bindungspuffer: 50 mM NaAc, pH 5, Elutionspuffer: 50 mM NaAc, 1 M NaCl, pH 5. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu 1 M (0-100% Elutionspuffer), während das Eluat unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt wurde.

(unten) Die einzelnen Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycinegel getrennt (Silberfärbung). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; P: Probe; D: Durchlauf, Spur 1-7: Waschschrift, Spur 8-26: Elution.

Eine Superdex 75 HR 10/30 Säule wurde mit der Probe (0,5 ml) beladen und das Eluat fraktioniert gesammelt (Abb. 4.17, links). Die Proteine konnten nicht durch eine

Silberfärbung (3.3.9.2), lediglich durch eine Coomassie Brilliant Blau Färbung (3.3.9.1), detektiert werden. Die Fraktionen 16-19 enthielten das Zielprotein, wobei nur in den Fraktionen 17 und 18 größere Mengen an gereinigtem rCor a 8 vorlagen (Abb. 4.17, rechts). Diese beiden Fraktionen wurden vereinigt. Mittels BCA-Methode wurde eine Proteinkonzentration von 2,9 mg/ml bestimmt. Die Gesamtausbeute des Proteinpools (1,5 ml) lag somit bei 4,3 mg rCor a 8 mit einer Reinheit von über 95% (Abb.4.25).

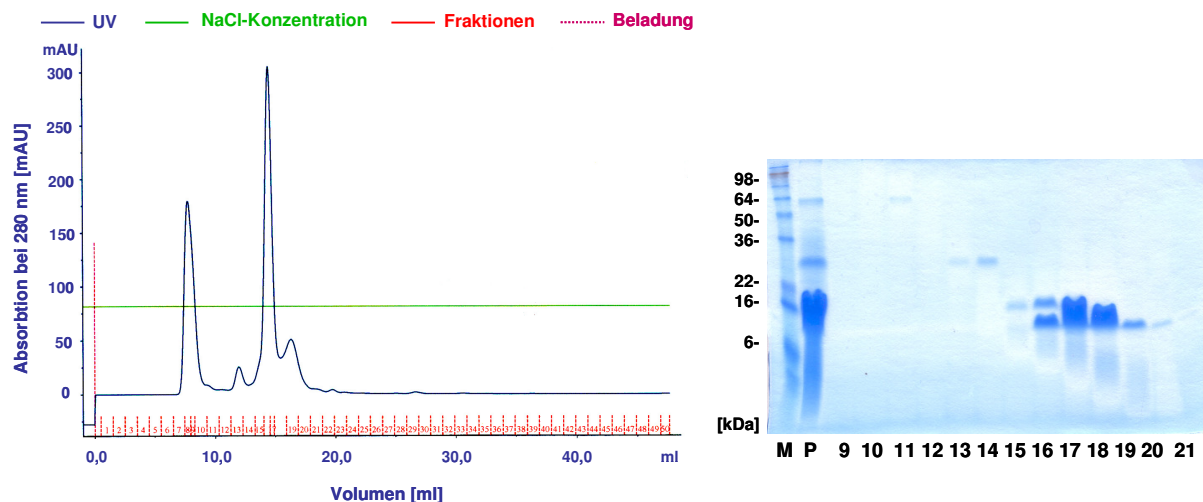


Abb. 4.17: Reinigung des partiell gereinigten Cor a 8 mittels Gelchromatographie.

(links) Chromatogramm des partiell gereinigtem Cor a 8 (Superdex 75 HR 10/30 Säule). Säulenvolumen: 24 ml, Probenvolumen: 0,5 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Elutionspuffer: 20 mM Morpholinopropansulfonsäure, 0,5 M NaCl, pH 7,6. Das Eluat wurde unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt.

(rechts) Die einzelnen Fraktionen der Gelchromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycinegel getrennt (Coomassie Brilliant Blau). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; P: Probe.

4.2.3.3 Chromatographische Reinigung von rPru p 3

Rekombinantes Pru p 3 wurde ebenfalls wie für rPru av 3 unter 4.2.3.1 beschrieben aus dem Hefekulturüberstand isoliert (Daten nicht gezeigt). Es wurde jedoch nur eine geringe Gesamtausbeute von insgesamt 80 µg/L rPru av 3 gewonnen.

Die Induktion der Pru p 3 Proteinsynthese erschien im Vergleich zu den restlichen LTPs (Lac s 1, Pru av 3 und Cor a 8) eine ausreichende Menge des Proteins hervorgebracht zu haben (Abb. 4.13). Die Färbung des SDS-Polyacrylamidgels des Hefekulturüberstands nach der Pru p 3 Proteinsynthese wurde im Vergleich zu den

anderen Gelen jedoch wesentlich länger durchgeführt, um eine deutliche Proteinbande zu erhalten. Die Zugabe eines Protease-Cocktails (P-8215, Lot 114K4131, Sigma, Deisenhofen) zu dem methanolhaltigen Induktionsmedium führte auch bei diesem Ansatz zu keiner Verbesserung der Pru p 3-Proteinsynthese. Die cDNA des Pfirsich-LTPs wurde nachfolgend ebenfalls in einen prokaryotischen pET100/D-TOPO Vektor umkloniert und in *E.coli* exprimiert.

4.2.4 Klonierung der Lac s 1-Isoformen und Pru p 3 in den prokaryotischen Expressionsvektor pET100/D-TOPO

Der prokaryotische Expressionsvektor pET100/D-TOPO (3.2.8) ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus dem Zielprotein und einem N-terminalen His-Tag und somit die Isolierung der LTPs mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (3.3.2.3). Das 5'- und 3'-Ende der DNA des jeweiligen LTPs wurde durch Einsatz der spezifischen Primer (pET-100/D-TOPO/Pru p 3 und pET-100/D-TOPO/Lac s 1, Tab. 3.1) in einer PCR-Reaktion (3.2.23) modifiziert, um das Amplifikat anschließend in den prokaryotischen Expressionsvektor zu klonieren. Die gerichtete Integration der LTP-Gene wurde durch einen 5'-CACCC-Überhang der PCR-Produkte ermöglicht. Durch die Präsenz einer Topoisomerase wurden die zu inserierenden LTP-DNA-Sequenzen direkt in den Vektor ligiert.

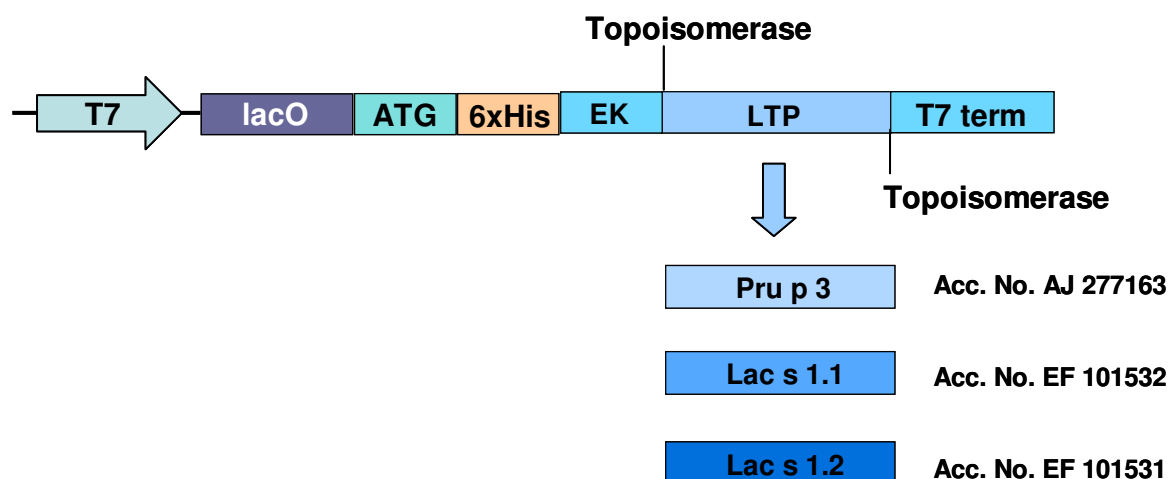


Abb. 4.18: Schematische Darstellung der pET100/D-TOPO/LTP-Konstrukte.

4.2.5 Expression (*E. coli*) und Reinigung von rPru p 3 und rLac s 1

Aufgrund der geringen Proteinausbeute von rPru p 3 (4.2.3.3) und der N-terminalen Abspaltung mehrerer Aminosäuren der beiden Lac s 1 Isoformen bei einer Expression der Proteine in *P. pastoris* (4.4.2), wurde das eukaryotische *E. coli* Expressionssystem gewählt.

Abb. 4.19 A zeigt die Auftrennung der gereinigten Salatisoformen, rLac s 1.1 und rLac s 1.2, sowie des Pfirsich-LTPs, rPru p 3, nach einer nativen Aufreinigung mittels SDS-PAGE (3.3.6) unter nicht reduzierten Bedingungen. Die Ausbeute betrug 1 mg/L für rPru p 3 und 0,25 mg/L für rLac s 1.1 und rLac s 1.2. Bei allen drei gereinigten Proteinen war eine Multimerisierung des Zielproteins detektierbar. Neben dem Monomer ließen sich Di-, Tri- und teilweise Tetramere deutlich erkennen. Durch den N-terminalen Anhang von 36 Aminosäuren (~4,3 kDa) stieg die durchschnittliche Größe der rLTPs von ~10,8 kDa (90 Aminosäuren) auf ~15,1 kDa an. Es wurden Monomere bei 15 kDa und Multimere bei 30 kDa (Dimer), 45 kDa (Trimer) und 60 kDa (Tetramer) nachgewiesen. Bei der rLac s 1.1-Isoform war das Monomer die stärkste Proteinbande, während die Multimere hingegen als schwächere Banden auftraten. Bei rLac s 1.2 hingegen konnte nur eine schwache diffuse Proteinbande als Monomer detektiert werden, während die Multimere wesentlich stärker repräsentiert waren. Das Monomer von rPru p 3 zeigte nahezu eine vergleichbare Bandenintensität zu den entstandenen Multimeren. Durch die Zugabe von 0,5 M 1,4-Dithiothreitol wurden die Disulfidbrückenbindungen aufgehoben und somit eine Multimerisierung verhindert. Abb. 4.19 B zeigt dies am Beispiel von rLac s 1.1.

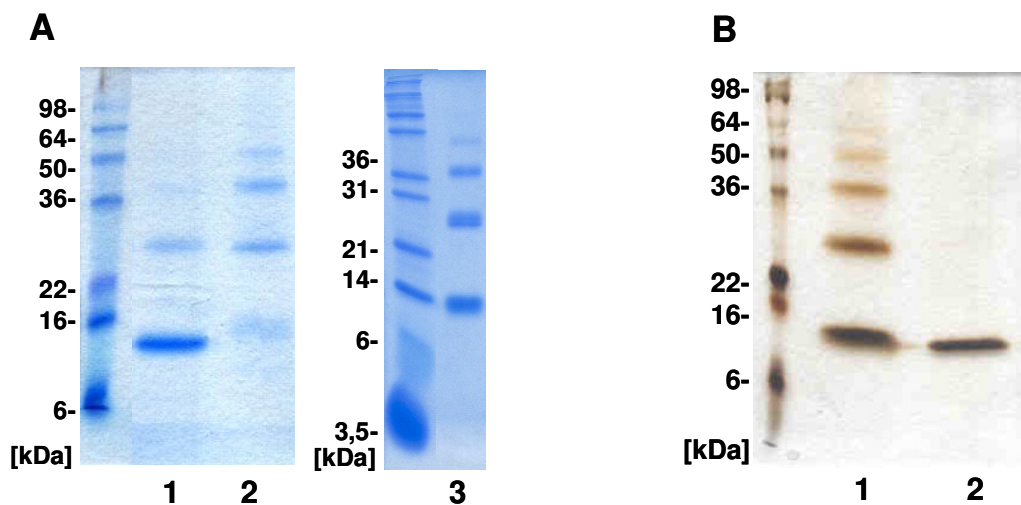


Abb. 4.19: SDS-PAGE des gereinigten Pru p 3, Lac s 1.1 und Lac s 1.2.

Gleiche Mengen gereinigtes rLTP wurden in einem 15%-igen Tris-Glycingel unter nicht reduzierten Bedingungen getrennt und durch eine Coomassie Brilliant Blau Färbung detektiert (A). rLac s 1.1 wurde zusätzlich unter reduzierten Bedingungen durch Zugabe von 0,5 M DTT in einem 15%-igen Tris-Glycingel getrennt und mittels Silberfärbung detektiert (B). A: Spur 1: rLac s 1.1; Spur 2: rLac s 1.2, Spur 3: rPru p 3. B: Spur 1: rLac s 1.1 ohne DTT; Spur 2: rLac s 1.1 mit 0,5 M DTT; Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2 und Mark 12.

Eine IgE-Immundetektion (3.3.7) mit beiden rLac s 1-Isoformen unter nicht reduzierten Bedingungen zeigte für rLac s 1.1 eine Immunreaktivität entsprechend der vorhandenen Proteinmengen (Abb. 4.19 A, Spur 1 versus Abb. 4.20 A, Spur 3 und 4). Lac s 1.2 zeigte für das Di- und Trimer die stärkste Proteinbande, während das Tri- und Tetramer die stärkste IgE-Reaktivität zeigten (Abb. 4.19 A, Spur 2 versus Abb. 4.20 B, Spur 3).

Nach Reduktion der Proben mittels 0,5 M 1,4-Dithiothreitol-Zugabe wurde eine deutliche Reaktion des Nicht-Allergiker-Serums mit rLac s 1.1 detektiert (Abb. 4.20 A, Spur 6). Bei rLac s 1.2 wurde die IgE-Reaktivität durch 1,4-Dithiothreitol-Zugabe komplett aufgehoben (Abb. 4.20 B, Spur 7 und 8). Eine Reduktion der Proben würde demnach keine Möglichkeit bieten die Proteinmenge des Monomers zu erhöhen ohne die IgE-Reaktivität zu verändern.

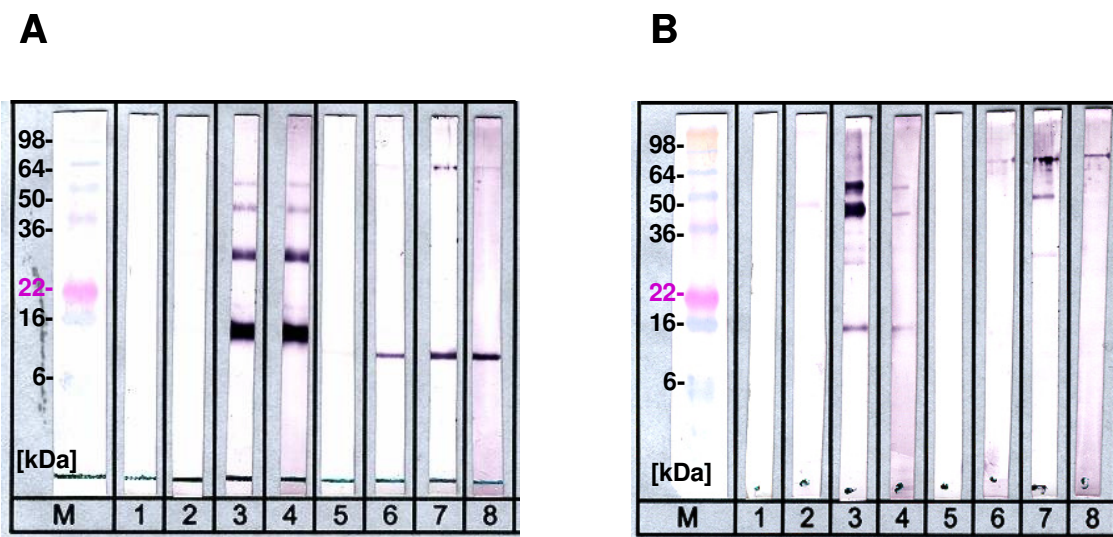


Abb. 4.20: IgE-Reaktivität von zwei Salatallergikern mit gereinigtem rLac s 1.1 (A) und rLac s 1.2 (B) unter nicht reduzierten und reduzierten Bedingungen [1 µg/cm gereinigtes Lac s 1].

Seren: 3, 7: Salatallergiker RSA 8773; 4, 8: Salatallergiker SSG 7799; 1, 5: Pufferkontrolle; 2, 6: Nichtallergiker PEI 231; M: Molekulargewichtsstandard SeeBlau Plus 2

Festphase: 1-4 nicht reduzierte Bedingungen; 5-8: Reduktion mit 0,5 M DTT.

Zur Steigerung der Proteinmenge, insbesondere der monomeren Form, der Lac s 1.2-Isoform wurden weitere *E. coli* Expressionsstämme verwendet. Durch die Verwendung des *E. coli* Origami (DE)3 pLys- oder *E. coli* Origami (DE)3-Stammes (3.2.12) konnten weder größere Proteinausbeuten noch eine Verschiebung der Proteinmengen in Richtung des Monomers erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Unterschiedliche Induktionsbedingungen bei Verwendung des *E. coli* Origami (DE)3- und *E. coli* BL21-Stammes, bei denen die Proteinexpression zu verschiedenen Wachstumszeiten der Kultur mit OD₆₀₀-Werten von 0,5; 0,7 und 0,9 induziert wurde, erbrachten ebenfalls keine Verbesserung. Ebenfalls ohne deutliche Verbesserung der Proteinausbeuten blieb eine längere Expression der Proteine bei geringerer Temperatur von 22°C über Nacht. Eine Reinigung unter denaturierten Bedingungen unter Einsatz von Harnstoff lieferte ebenfalls keine Steigerung der Proteinausbeute. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde keine weitere Reinigung von rLac s 1.2 durchgeführt.

Zur Steigerung der Proteinausbeute von rLac s 1.1 und rPru p 3 wurde die Proteinexpression in einem Volumenansatz von insgesamt 6 Liter (rLac s 1.1) bzw. 4 Liter (rPru p 3) Bakteriensuspension (*E. coli* BL21) induziert (3.2.12) und die Reinigung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (3.3.2.3).

Zur Isolierung des Monomers von rLac s 1.1 wurde das Protein nach einer Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (3.3.2.3) mittels Ionen-Austausch-Chromatographie (3.3.2.1) isoliert, während rPru p 3 nur mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (3.3.2.3) gereinigt wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Gesamtproteinbestimmung mit der BCA-Methode (3.3.3.2) ergab eine Ausbeute von insgesamt 2,8 mg rLac s 1.1 (200 µg/ml, 14 ml → 0,47 mg/L *E. coli*) und 4,5 mg rPru p 3 (90 µg/ml, 50 ml → 1,13 mg/L *E. coli*). Mittels CD-Spektroskopie (3.3.11.3) wurde keine korrekte Sekundärstruktur von dem gereinigten rLac s 1.1 Monomer und den rPru p 3 Multimeren nachgewiesen (4.4.3). Ein Proteinrückfaltungsprotokoll (3.3.4) führte zu keiner Verbesserung. Aus diesem Grund wurden beide LTPs aus dem jeweiligen Lebensmittel isoliert (3.3.1.2) und chromatographisch gereinigt (3.3.2.1 und 3.3.2.2).

4.2.6 Isolierung von nPru p 3 und nLac s 1 aus Lebensmittelextrakten für die immunologische Charakterisierung

Das Pfirsich-LTP, Pru p 3, und das Salat-LTP, Lac s 1, wurde aufgrund der unter 4.2.2/4.2.3.3 und 4.2.5 gezeigten Schwierigkeiten im *P. pastoris*- und *E. coli*-Expressionssystem aus dem jeweiligen Lebensmittel isoliert. Hierfür wurden die Proteine aus der Schale von 2 kg Pfirsichen bzw. aus 680 g Kopfsalatblättern extrahiert (3.3.1.2). Die gelösten Proteine konnten anschließend chromatographisch gereinigt werden (3.3.2.1 und 3.3.2.2).

4.2.7 Chromatographische Reinigung von nPru p 3 und nLac s 1

Die im Lebensmittelextrakt enthaltenen LTPs (nPru p 3 und nLac s 1) wurden mittels chromatographischer Reinigung (3.3.2.1 und 3.3.2.2) für weitere Analysen isoliert.

4.2.7.1 Chromatographische Reinigung von nPru p 3

Das Pfirsich-LTP wurde, wie unter 3.3.1.2 beschrieben, aus der Pfirsichschale isoliert, und ebenfalls über eine zweistufige Chromatographie gereinigt (3.3.2.1 und 3.3.2.2). Der Lebensmittelextrakt mit einem Gesamtvolumen von 500 ml wurde halbiert und nPru p 3 wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten chromatographisch gereinigt. Natürliches Pru p 3 wurde nach der Beladung der Mono S HR 5/5 Säule mit 250 ml Pfirsichextrakt bei 190 mM bis 300 mM NaCl eluiert und in den Fraktionen 7-11 mit höhermolekularen Fremdproteinen detektiert (Abb. 4.21). Die

Pru p 3 enthaltenen Fraktionen 7-11 wurden vereinigt und gefriergetrocknet, um sie anschließend in 0,5 ml MOPS-Puffer (3.3.2.2) zu lösen (Abb. 4.22, Probe) und einer weiteren Reinigung mittels Gelchromatographie (3.3.2.2) zu unterziehen. Durch Anwendung dieser Methode wurde in den Fraktionen 16 bis 19 2,5 ml gereinigtes, nPru p 3 isoliert (Abb. 4.22). Aus der zweiten Hälfte des Pfirsichschalenextrakts wurde durch Anwendung der gleichen Reinigungsstrategie ebenfalls erfolgreich 2,5 ml gereinigtes Pru p 3 isoliert (Daten nicht gezeigt). Die Gesamtausbeute betrug 12,5 mg (5 ml, 2,5 mg/ml) gereinigtes nPru p 3 (Pool 1). Natürliches Pru p 3 war nach der Elution von der Superdex 75 HR 10/30 Säule (Gelchromatographie) nicht durch eine Silberfärbung (3.3.9.2), lediglich durch eine Coomassie Brilliant Blau Färbung (3.3.9.1), anfärbbar.

Dieses Verfahren wurde zur Isolierung von nPru p 3 dreimal durchgeführt. Bei der zweiten Reinigung wurden 7 mg und bei der dritten 5 mg gereinigtes nPru p 3 isoliert und vereinigt (Pool 2). Die Proteingesamtausbeute zeigte einen Reinheitsgrad von über 95% (Abb. 4.25).

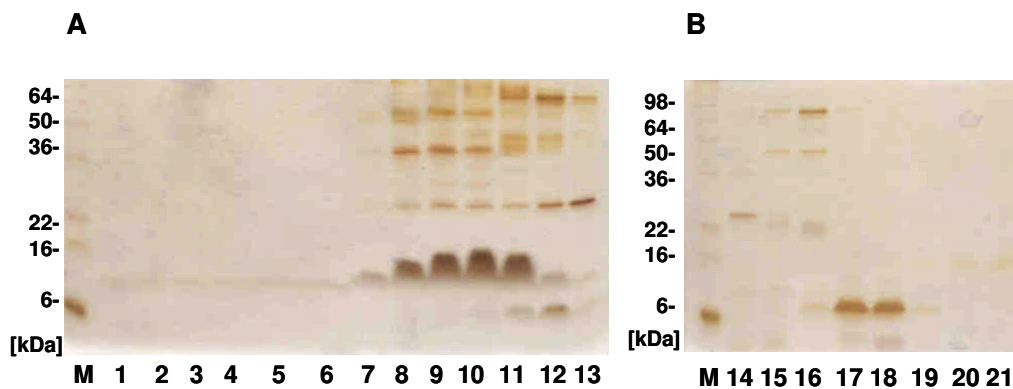
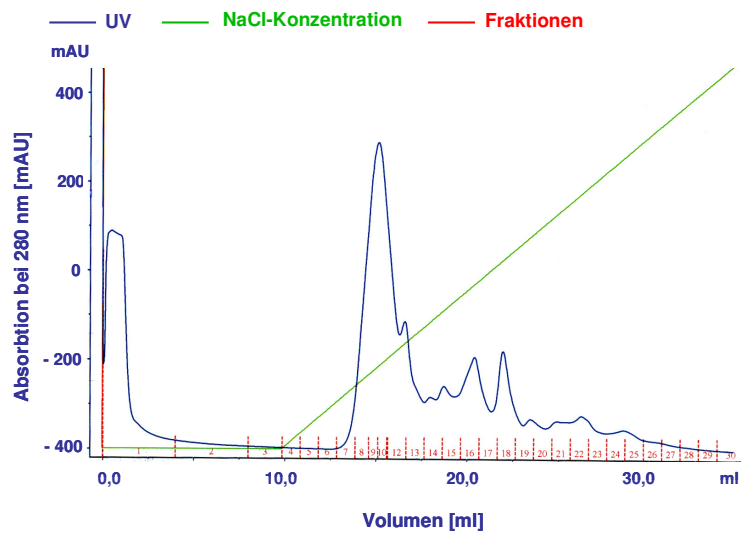


Abb. 4.21: Reinigung von Pru p 3 mittels Kationenaustausch-Chromatographie.

(oben) Chromatogramm des Pfirsichschalenextraktes (Mono S HR 5/5 Säule). Säulenvolumen: 1 ml, Probenvolumen: 250 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Bindungspuffer: 50 mM NaAc, pH 5, Elutionspuffer: 50 mM NaAc, 1 M NaCl, pH 5. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu 1 M (0-100% Elutionspuffer), während das Eluat unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt wurde.

(unten) Die einzelnen Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycinegel getrennt (Silberfärbung). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2. Spur 1-3: Waschschrift, Spur 4-21: Elution.

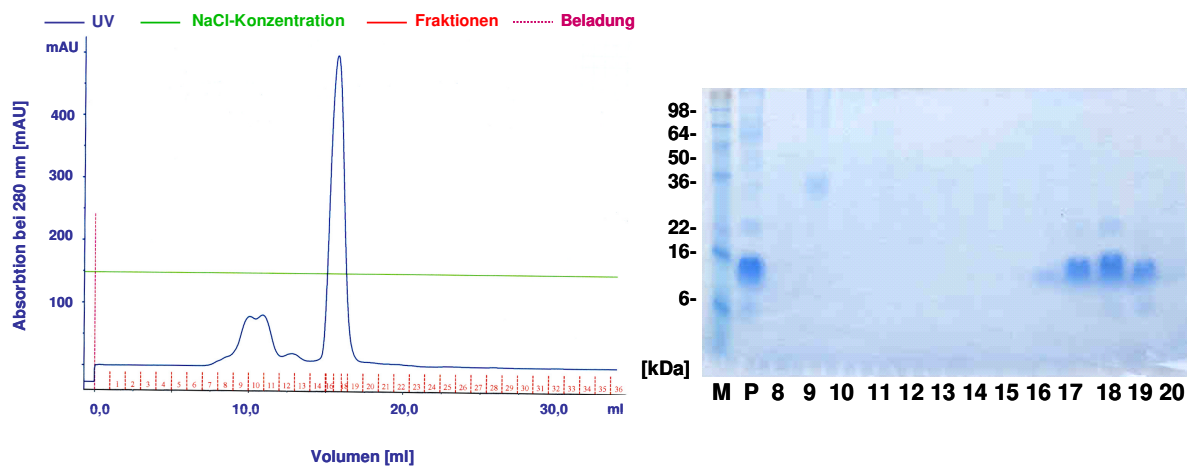


Abb. 4.22: Reinigung des partiell gereinigten Pru p 3 mittels Gelchromatographie.

(links) Chromatogramm des partiell gereinigtem Pru p 3 (Superdex 75 HR 10/30 Säule). Säulenvolumen: 24 ml, Probenvolumen: 1 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Elutionspuffer: 20 mM Morpholinopropansulfonsäure, 0,5 M NaCl, pH 7,6. Das Eluat wurde unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt.

(rechts) Die einzelnen Fraktionen der Gelchromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycinegel getrennt (Coomassie Brilliant Blau). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; P: Probe.

4.2.7.2 Chromatographische Reinigung von nLac s 1

Natürliches Lac s 1 wurde wie unter 3.3.1.2 beschrieben aus frischen Salatblättern extrahiert und mittels zweistufiger Chromatographie (3.3.2.1 und 3.3.2.2) von den Fremdproteinen isoliert. Aufgrund des geringen Proteingehalts des Salats umfasste der Proteinextrakt ein Gesamtvolumen von 900 ml. Die Beladung der Mono S HR 5/5-Säule fand über Nacht mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min statt. Nach einer IgG-Immundetektion (3.3.7) mit einem kreuzreaktiven Kaninchen anti-Pru p 3-Serum wurde in den Fraktionen 14-19 die Hauptmenge an nLac s 1 detektiert (Daten nicht gezeigt). In diesen Fraktionen ist die Verunreinigung mit Fremdproteinen sehr groß (Abb. 4.23, unten). Aufgrund einer niedermolekularen (~6 kDa, Fraktion 14-17) und höhermolekularen (~9 kDa, Fraktion 18 und 19) Verunreinigung mit geringem Größenunterschied zu nLac s 1, wurden die jeweiligen Fraktionen vereinigt (Pool 1: Fraktion 14-17 und Pool 2: Fraktion 18-19). Mittels Gelchromatographie (3.3.2.2) wurde versucht die Verunreinigungen von nLac s 1 abzutrennen. Eine Superdex 30 HR 16/60-Säule, die eine effektive Trennung der Proteine im niedermolekularen Bereich (5-30 kDa) gewährleistet, wurde mit dem jeweiligen Proteinpool beladen. Die niedermolekulare Verunreinigung aus Pool 1 wurde dadurch von nLac s 1

(Fraktionen 26-34, Abb. 4.24, unten) abgetrennt, während die höhermolekulare Verunreinigung aus Pool 2 nicht entfernt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Aus dem Grund wurde diese Präparation verworfen. Die chromatographische Reinigung von Pool 1 erbrachte eine Gesamtausbeute von 2,16 mg nLac s 1 (4,5 ml, 480 µg/ml, Pool 1) mit einem Reinheitsgrad von über 95% (Abb. 4.25). Die Reinigungsprozedur wurde wiederholt, um größere Mengen von nLac s 1 zu gewinnen. Weitere 2 mg gereinigtes nLac s 1 (Pool 2) von gleicher Qualität wurden somit isoliert (Abb. 4.25).

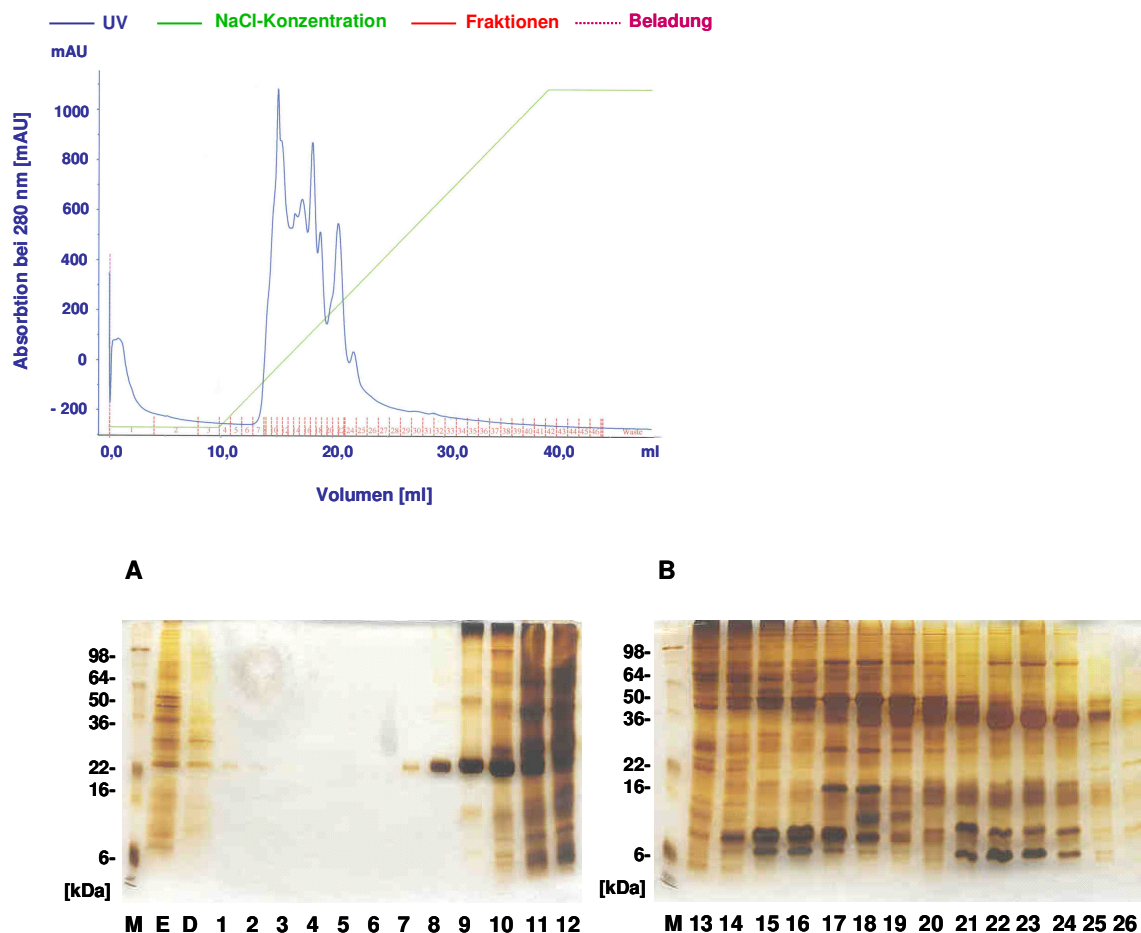


Abb. 4.23: Reinigung von Lac s 1 mittels Kationenaustausch-Chromatographie.

(oben) Chromatogramm des Salatextrakts (Mono S HR 5/5 Säule). Säulenvolumen: 1 ml, Probenvolumen: 900 µl, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Bindungspuffer: 50 mM NaAc, pH 5, Elutionspuffer: 50 mM NaAc, 1 M NaCl, pH 5. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu 1 M (0-100% Elutionspuffer), während das Eluat unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt wurde.

(unten) Die einzelnen Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycinelektrophorese gel getrennt (Silberfärbung). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; E: Extrakt; D: Durchlauf, Spur 1-3: Waschschrift, Spur 4-26: Elution.

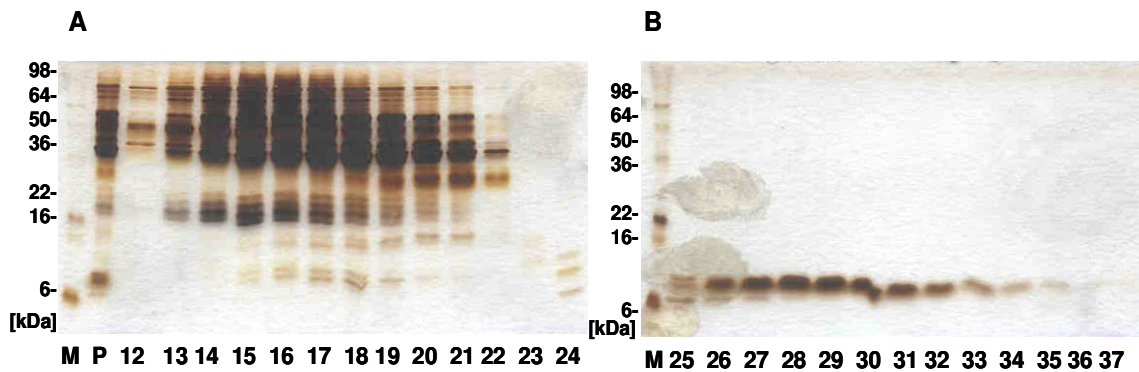
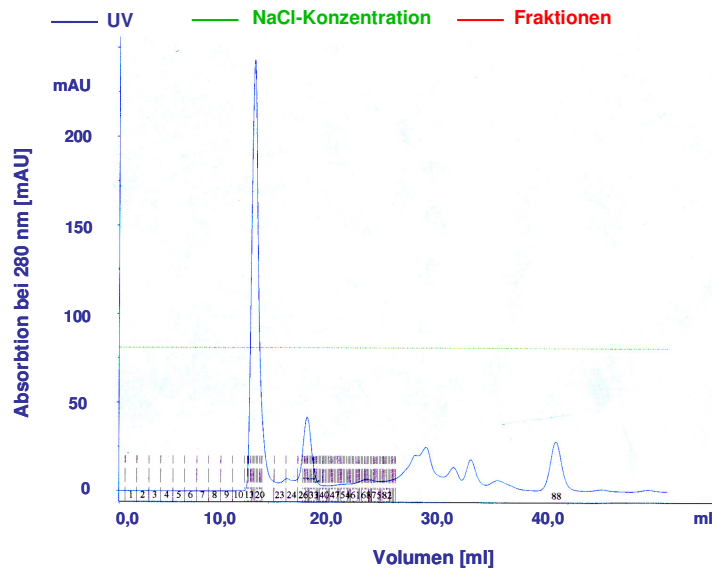


Abb. 4.24: Reinigung des partiell gereinigten Lac s 1 mittels Gelchromatographie.

(oben) Chromatogramm des partiell gereinigtem Lac s 1-Pool 1 (Fraktionen 14-17) (Superdex 30 HR 16/60 Säule). Säulenvolumen: 120 ml, Probenvolumen: 1 ml, Flussrate: 1 ml/min, Wasch- und Elutionspuffer: 20 mM Morpholinopropansulfonsäure, 0,5 M NaCl, pH 7,6. Das Eluat wurde unterhalb von 100 mAU in Fraktionen von 1 ml und oberhalb von 100 mAU von 0,5 ml gesammelt.

(unten) Die einzelnen Fraktionen der Gelchromatographie wurden in einem 15%-igen Tris Glycingel getrennt (Silberfärbung). Die Nummerierung der Gelspuren entspricht den gesammelten Fraktionen des Chromatographielaufs. M: Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2; P: Probe.

4.3 Reinheit und Ausbeute der LTPs

Mittels zweistufiger Chromatographie (3.3.2.1 und 3.3.2.2) wurde natürliches Pfirsich-LTP (nPru p 3, Pool 1 und 2), natürliches Salat-LTP (nLac s 1, Pool 1 und 2), rekombinantes Haselnuss-LTP (rCor a 8) und rekombinantes Kirsch-LTP (rPru av 3) mit einer visuell abgeschätzten Reinheit von über 95% isoliert (Abb. 4.25).

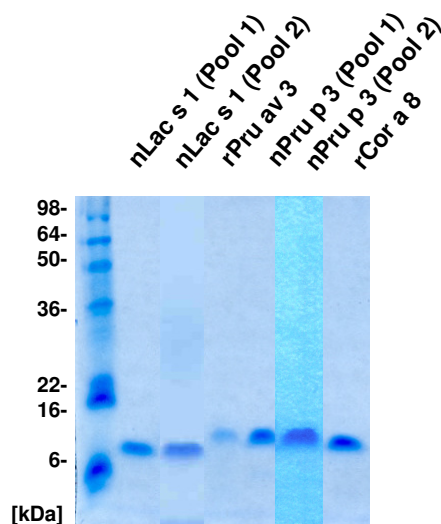


Abb. 4.25: SDS-PAGE der gereinigten Proteine (Coomassie Brilliant Blau).

6 µg/cm LTP wurden in einem 15%-igen Tris-Glycin-Gel unter nicht reduzierten Bedingungen getrennt. Molekulargewichtsstandard SeeBlue Plus 2.

Die erhaltenen Proteinausbeuten sind in der Tabelle 4.1 dargestellt. Ermittelt wurden die jeweiligen Konzentrationen mittels BCA-Methode (3.3.3.2). Überprüft wurde die gemessene Proteinmenge durch einen Vergleich mit einer bekannten Menge von BSA in einem Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gel (Daten nicht gezeigt).

Tab. 4.1: Proteinausbeuten der gereinigten LTPs.

LTP	EXPRESSION	LEBENSMITTEL	PROTEINAUSBEUTE	GESAMTAUSBEUTE
rPru av 3	1 L <i>P. pastoris</i>	-	6 mg	6 mg
rCor a 8	1 L <i>P. pastoris</i>	-	4,3 mg	4,3 mg
rPru p 3	1 L <i>P. pastoris</i>	-	80 µg	80 µg
nPru p 3	-	1,5 kg Pfirsiche	12,5 mg	24,5 mg
„	-	2 kg Pfirsiche	7 mg	
„	-	1,5 kg Pfirsiche	5 mg	
nLac s 1	-	680 g Kopfsalat	2,16 mg	4,16 mg
„	-	680 g Kopfsalat	2 mg	

4.4 Biochemische Charakterisierung der LTPs

4.4.1 Nano ESI-MS Spektrometrie

Das exakte Molekulargewicht der gereinigten Proteine wurde mittels nano Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (nano ESI-MS) mit Unterstützung von Frau Dr. L. Perono-Garoffo (CNR-ISPA, c/o Bioindustry Park, Proteome Lab, Colleretto Giacosa, Italien) und Herrn Dr. A. Conti (CNR-ISPA, c/o Bioindustry Park, Proteome Lab, Colleretto Giacosa, Italien) ermittelt (3.3.11.2). Mit massenspektrometrischen Methoden wird unter anderem die Identität von Proteinen bestimmt. In speziellen Anwendungen können posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Disulfidbrückenbindungen, Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, nachgewiesen werden. Die in *P. pastoris* exprimierte Proteine rPru av 3 und rCor a 8 zeigten eine nahezu identische molekulare Masse mit dem errechneten theoretischen Wert, der die vier zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus berücksichtigte, die aufgrund der Abspaltung des α -Signalpeptides an der Kex2-Schnittstelle übrig blieben (Tab. 4.2). Anhand der bestätigten Proteinmasse konnten unerwünschte Proteinmodifikationen ausgeschlossen werden, die zu größeren Abweichungen des Molekulargewichts geführt hätten. Hier sind vor allem Glykosylierungen und Verkürzungen durch endogene Proteolyse während der Expression zu nennen. Des Weiteren können bei der Expression von Proteinen in Hefen auch Disulfidbrücken gebildet werden. Allerdings konnte aufgrund der Messungenauigkeit und möglichen Auftretens anderer posttranslationaler Modifizierungen, die das Molekulargewicht nur um wenige Dalton verändern, die Zahl der ausgebildeten Disulfidbrückenbindungen nicht bestimmt werden.

Die Molekulargewichte von gereinigten natürlichen Proteinen können nur einen Hinweis auf deren korrekte Identität geben. Es kann hier anders als bei rekombinant exprimierten Proteinen keine theoretische Masse von einer definierten Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Die Proteine aus den nLac s 1- und nPru p 3-Präparationen besitzen ein Molekulargewichte wie sie für LTPs zu erwarten sind. Das experimentell bestimmte Molekulargewicht von nPru p 3 entspricht mit 9137,05 Da recht genau dem ermittelten theoretischen Wert von 9138,56 Da der bekannten Aminosäuresequenz des rekombinanten Pru p 3 (Acc. No. AJ277163). In der Präparation des nLac s 1 wurden 4 Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen. Mit Werten zwischen 8879,05 Da und 9337,83 Da liegen

sie in dem Bereich der Massen der rekombinanten Proteine rLac s 1.1 (8886,36 Da) und rLac 1 s 1.2 (9404,64 Da). Bei den natürlichen Proteinen könnte es sich um Isoformen von Lac s 1 handeln, da LTPs durch eine Multigenfamilie kodiert werden und mehrfach im Genom vorliegen können. Eine eingehende Untersuchung dieser Frage war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

Tab. 4.2: Nano-ESI MS Ergebnisse von rCor a 8, rPru av 3, nPru p 3 und nLac s 1.

PROTEIN	THEORETISCHER WERT MW [DA]	EXPERIMENTELLER WERT MW [DA]	Δ [DA]
rCor a 8 (<i>P. pastoris</i>)	9870,95*	9871,0 +-1,05	+0,05
rPru av 3 (<i>P. pastoris</i>)	9542,72*	9539,64 +-1,21	-3,08
nPru p 3	unbekannt	9137,05 +-2,02	
nLac s 1 Protein 1	unbekannt	9337,83+-1,36	
Protein 2		9214,18 +-2,00	
Protein 3		9082,73 +-2,14	
Protein 4		8879,05 +-1,00	

Mw: molekulare Masse

*: zuzüglich vier Aminosäuren des α -Signalpeptids

Δ : Abweichung des experimentell ermittelten Werts gegenüber dem theoretischen Wert

4.4.2 N-terminale Sequenzierung

Zur weiteren Identifizierung der gereinigten Proteine wurden N-terminale Sequenzierungen mit Unterstützung von Herrn Dr. A. Conti durchgeführt (3.3.11.2). Durch diese Methode wurden bei beiden in *P. pastoris* exprimierten rLac s 1 Isoformen, Lac s 1.1 und Lac s 1.2, eine N-terminale Verkürzung von insgesamt 23 Aminosäuren nachgewiesen. Für Lac s 1.1 begann die Aminosäureabfolge mit A₂₃VPPACC, während für Lac s 1.2 T₂₃PP als erste Aminosäuren am N-terminalen Ende ermittelt wurden (Abb. 4.13). Bei rPru av 3 (*P. pastoris*) wurde mit der Aminosäuresequenz EAEAL₁TXGQV ein N-terminaler Anhang von vier zusätzlichen Aminosäuren, die aus einer Abspaltung des α -Signalpeptids an der Kex2-Schnittstelle resultierten, nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Massenbestimmung von rPru av 3 (*P. pastoris*) überein (4.4.1). Analysen von nPru p 3, nLac s 1, rCor a 8 (*P. pastoris*) und rLac s 1.1 (*E. coli*) lieferten keine auswertbaren Daten.

4.4.3 Untersuchung der Sekundärstruktur

Eine strukturelle Untersuchung der Sekundärstruktur der LTPs wurde mittels CD-Spektroskopie durchgeführt (3.3.11.3). Die mittlere molare Elliptizität und die exakte Proteinkonzentration wurden bei der Auswertung der Spektren einbezogen. Die für rPru av 3 (*P. pastoris*), rCor a 8 (*P. pastoris*), nLac s 1 und nPru p 3 gemessenen Spektren waren nahezu identisch und wiesen durch die charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm auf eine starke α -helikale Sekundärstruktur der Proteine hin. Die CD-Spektren des rPru p 3 und rLac s 1.1, beide in *E. coli* exprimiert, zeigten eine Linksverschiebung der charakteristischen Minima, die auf einen Anteil an ungefaltetem Protein hinweist. Eine Bedingung für weitere Proteinanalysen war eine korrekte Sekundärstruktur der beteiligten Proteine, aus der mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf eine korrekte Faltung geschlossen werden konnte. Aus dem Grund wurde natürlich gereinigtes Lac s 1 und Pru p 3, sowie rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*) für weitere Analysen verwendet.

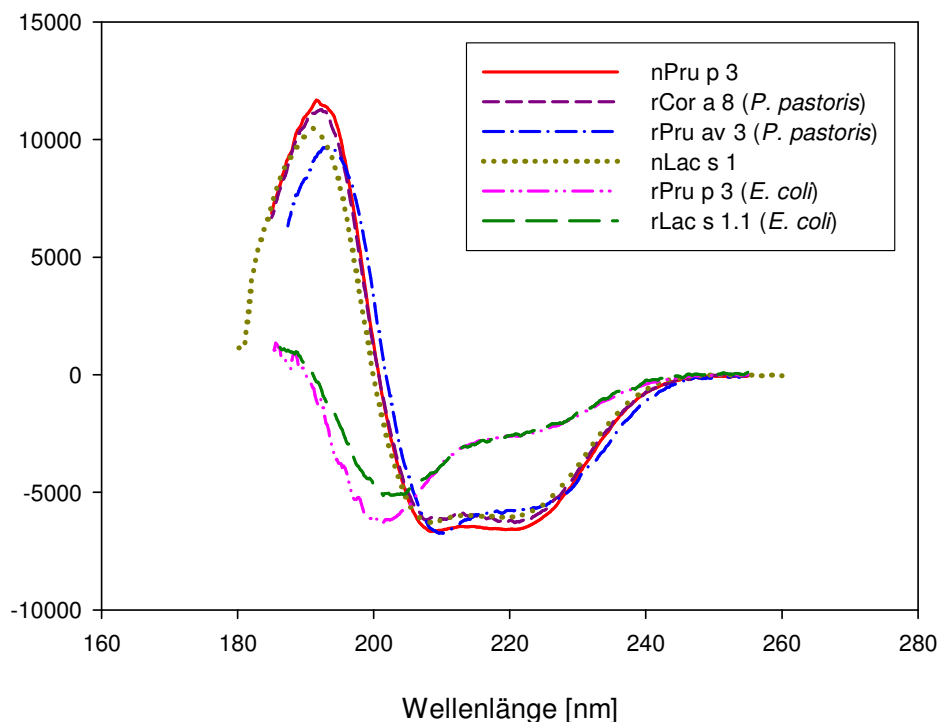


Abb. 4.26: Messung der Sekundärstruktur der gereinigten LTPs mittels CD-Spektroskopie.

4.4.4 Untersuchung des Allergengehalts von Hauttest-Lösungen

Zur Untersuchung des Allergenprofils von kommerziell erhältlichen Hauttest-Lösungen, so genannten Skin-Prick-Test-Lösungen, wurden jeweils von drei unterschiedlichen Firmen Kirsch- (A-C) und Pfirsichextrakte (D-F) analysiert. Von Salat-Skin-Prick-Test-Lösungen wurde keine große Anzahl an unterschiedlichen Herstellern gefunden, während von Haselnuss-Skin-Prick-Test-Lösungen schon bekannte Daten vorlagen [Akkerdaas et al. 2003], so dass ein Vergleich des Allergengehalts dieser Lösungen deshalb nicht in die Studie mit einbezogen wurde.

Die Kirsch- und Pfirsichextrakte wurden gegen 1-fach PBS-Puffer für mindestens 48 h unter Anwendung eines Dialyseschlauchs (Ausschlussgrenze 3,5 kDa, Roth, Spectrum, Karlsruhe) bei 4°C dialysiert und gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE (3.3.6) aufgetrennt. Die Proteine wurden durch eine Silberfärbung (3.3.9.2) oder mittels Westernblot (3.3.7) detektiert. Durch den Einsatz von gleichen Proteinmengen wurde der relative Anteil der Allergene am Gesamtproteinanteil bestimmt.

Die Kirschextrakte von allen drei Firmen zeigten ein ähnliches Proteinmuster (Abb. 4.27 A, Spur A-C). Auffällig war die dominante Bande bei 22 kDa, die neben schwächeren Banden als Hauptproteinbande detektiert wurde. Im Gegensatz dazu waren in zwei von drei Pfirsich-SPT-Lösungen nur sehr schwache Proteinbanden anfärbbar (Abb. 4.27 A, Spur D und F). Lediglich eine Pfirsichextrakt-Lösung zeigte ein vielfältiges Proteinbandenmuster mit einer dominanten Proteinbande bei 24 kDa (Spur E). Das Birkenpollen-homologe Allergen in Kirsche (Pru av 1) oder Pfirsich konnte durch ein Patientenserum, welches spezifisches IgE gegen beide Proteine im Immunblot zeigte (Daten nicht gezeigt), nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.27 B, PEI 165, Spur A-F). Kirsch- (Pru av 3) oder Pfirsich-LTP (Pru p 3) hingegen waren durch ein Patientenserum mit spezifischem IgE gegen die beiden Proteine in fast allen SPT-Lösungen nachweisbar (Abb. 4.27 B, OSN 2932, Spur A-F). Lediglich eine Kirschextrakt-Lösung (Abb. 4.27 B, OSN 2932, Spur B) zeigte eine wesentlich schwächere IgE-Reaktivität im Gegensatz zu den restlichen Lösungen.

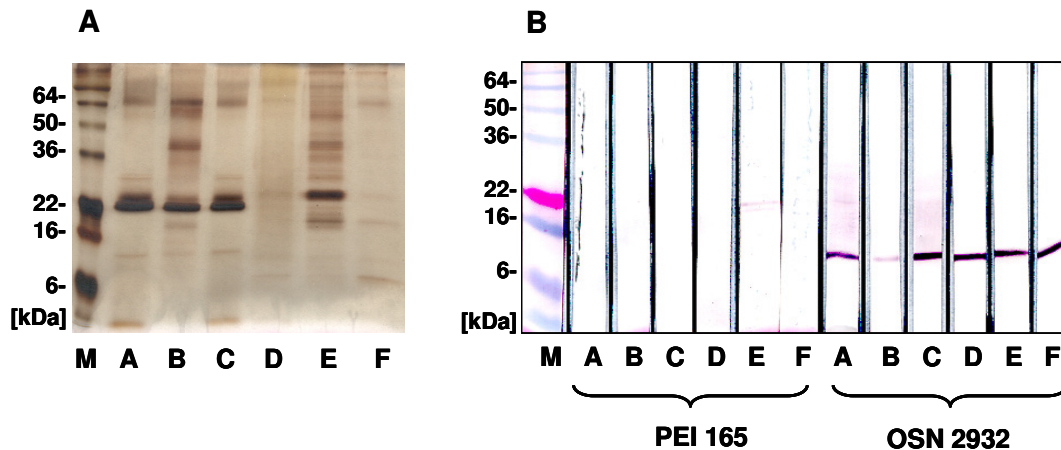


Abb. 4.27: Untersuchungen des Allergehalts von jeweils drei kommerziellen Kirsch- (Spur A-C) und Pfirsich-SPT-Lösungen (Spur D-F).

A: Silberfärbung; B: IgE-Immundetektion.

Patientenserum PEI 165: spezifische IgE-Bindung gegen Pru av 1 und das Bet v 1-homologe Protein des Pfirsichs. Patientenserum OSN 2932: spezifische IgE-Bindung gegen Pru av 3 und Pru p 3.

4.4.5 Stabilitätsuntersuchungen

4.4.5.1 **Strukturanalysen mittels CD-Spektroskopie nach Hitzeeinwirkung**

Zur Untersuchung der Auswirkung von Erhitzung auf die Sekundärstruktur der LTPs wurden am Beispiel von nPru p 3 CD-Spektren (3.3.11.3) gemessen, wodurch die Sekundärstruktur des Proteins unter Verwendung eines 10 mM Phosphatpuffers (pH 7,3) überprüft wurde (Abb. 4.28). Die mittlere molare Elliptizität und die exakte Proteinkonzentration wurden bei der Auswertung der Spektren einbezogen. nPru p 3 zeigte bei 20°C eine typische α -helikale Sekundärstruktur mit den charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm. Bei einer Erhitzung auf 90°C wurde das Minimum von 208 nm auf 206 nm verschoben. Nach der Erhitzung wurde das Protein erneut auf 20°C abgekühlt und die Sekundärstruktur bestimmt, wobei sich das erste Minimum auf ca. 204 nm verschob. Eine Linksverschiebung der Kurven korreliert mit der Zunahme an ungefaltetem Protein. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Hitzeeinwirkung die Sekundärstruktur des Proteins teilweise irreversibel zerstört wurde.

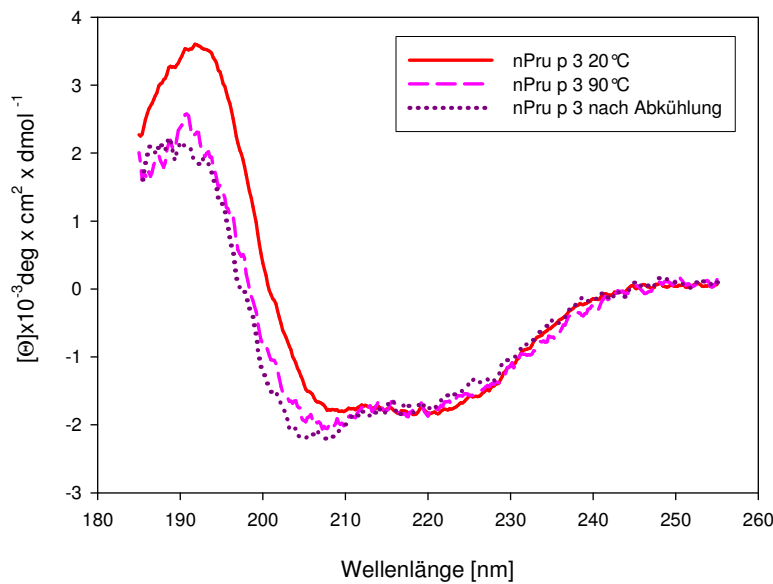


Abb. 4.28: Messung der Sekundärstruktur von nPru p 3 nach Hitzeeinwirkung mittels CD-Spektroskopie.

4.5 Immunologische Charakterisierung der LTPs

4.5.1 Untersuchung der IgE-Reaktivität der LTPs

Zur Überprüfung der IgE-Reaktivität der gereinigten LTPs wurden gleiche Mengen der Proteine mittels SDS-PAGE (3.3.6) aufgetrennt und mittels Immundetektion (3.3.7) analysiert. Zur Detektion wurde das Serum des Allergikers EDP 6491 (Tab. 9.1.1) eingesetzt, das spezifisches IgE gegen alle zu untersuchenden LTPs aufwies. Die gereinigten Proteine zeigten eine starke Reaktion unter Verwendung des Patientenserums (Abb. 4.29, Spur 2, 4, 6 und 8). Alle Proteinbanden zeigten die gleiche Intensität. Die fehlende IgE-Bindung des Nicht-Allergikerserums PEI 231 belegt die Spezifität der Immundetektion (Abb. 4.29, Spur 1, 3, 5 und 7).

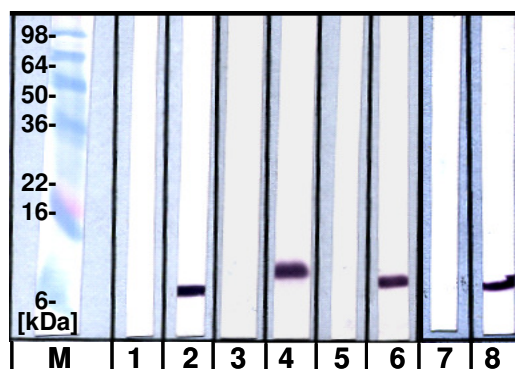


Abb. 4.29: IgE-Reaktivität der gereinigten LTPs mit dem Patientenserum EDP 6491.

1 + 2: Gereinigtes nLac s 1; 3 + 4: rPru av 3 (*P. pastoris*); 5 + 6: rCor a 8 (*P. pastoris*); 7 + 8: nPru p 3. (0,5 µg/cm Protein). 1, 3, 5 und 7: Nicht-Allergikerserum PEI 231.

4.5.2 Bestimmung der spezifischen Konzentration an IgE in Patientensera

4.5.2.1 Vergleich der Sensitivität der beiden Messmethoden EAST und ImmunoCAP-FEIA

Bei diesen beiden Messmethoden handelt es sich um nicht-kompetitive Enzymimmunoassays mit denen das spezifische IgE eines Patientenserums quantitativ ermittelt wurde. Die daraus resultierenden Werte wurden in U/ml angegeben und in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die spezifische IgE-Konzentration von Pfirsich- (n=27) und Haselnussallergikern (n=20) gegen das jeweilige LTP wurde mittels EAST- (3.3.12.2) und ImmunoCAP-FEIA-Messungen (*E. coli*) (3.3.12.3) bestimmt (Tab. 9.1.1). Für diese Auswertung konnten nur Daten (EAST- und ImmunoCAP-FEIA-Messungen (*E. coli*)), die jeweils bei beiden Allergikergruppen vorlagen, einbezogen werden. Aus diesem Grund ergibt sich die Differenz von 15 Patienten hinsichtlich der gesamten Pfirsichallergikergruppe (n=42) sowie von 4 Patienten hinsichtlich der gesamten Haselnussallergikergruppe (n=24). Eine Sensibilisierung gegen nPru p 3 konnte bei 48% (13/27) der Pfirsichallergiker mittels EAST detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten Messungen mittels experimenteller ImmunoCAPs, bei denen rPru p 3 (*E. coli*) an der Festphase gekoppelt vorlag, eine Sensibilisierung von 96% (26/27) der Patientengruppe gegen das LTP. Ähnliche Resultate wurden in der Haselnussallergikergruppe erhalten, in der im EAST lediglich bei 40% (8/20) der Patienten eine Sensibilisierung gegen rCor a 8 (*P. pastoris*) nachweisbar war. Durch die deutlich höhere Sensitivität der experimentellen ImmunoCAP-FEIA Messungen, wurde bei 90% (18/20) der Haselnussallergiker spezifisches IgE gegen rCor a 8 (*E. coli*) detektiert. Der ImmunoCAP erwies sich somit als der deutlich sensitivere Test. Deshalb wurden die ImmunoCAP-Resultate zur Auswertung des Sensibilisierungsspektrums herangezogen.

4.5.2.2 Häufigkeit der Sensibilisierung gegen LTPs in der Lebensmittelallergikergruppe

Eine Gruppe von 51 Lebensmittelallergikern (Salat-, Pfirsich-, Kirsch- und Haselnussallergiker, Tab. 9.1.1) wurde aufgrund ihrer klaren anamnestischer Daten und eines positiven Hauttests und/oder einer positiven serologischen Detektion mittels kommerzieller ImmunoCAPs (> 0,35 U/ml) in die Studie einbezogen. Anhand

der Einschlusskriterien wurden in der Gruppe (n=51), die hinsichtlich der zu untersuchenden Allergien gezielt rekrutiert wurde, 82% Pfirsich-, 57% Salat-, 52% Haselnuss- und 44% Kirschallergiker gefunden (Abb. 4.30). Innerhalb der Allergikergruppen wurde die Prävalenz von spezifischen IgE-Antikörpern gegen das jeweilige LTP (nPru p 3, nLac s 1, rCor a 8 (*P. pastoris*), rPru av 3 (*P. pastoris*)) mittels experimentellen ImmunoCAPs bestimmt (3.3.12.3). Die höchste IgE-bindende Prävalenz zeigte Lac s 1 mit 93% in der Salatallergikergruppe, während Pru p 3 90% in der Pfirsichallergikergruppe, Cor a 8 88% in der Haselnussallergikergruppe und Pru av 3 85% in der Kirschallergikergruppe zeigten. Die untersuchten LTPs konnten somit als Hauptallergene identifiziert werden.

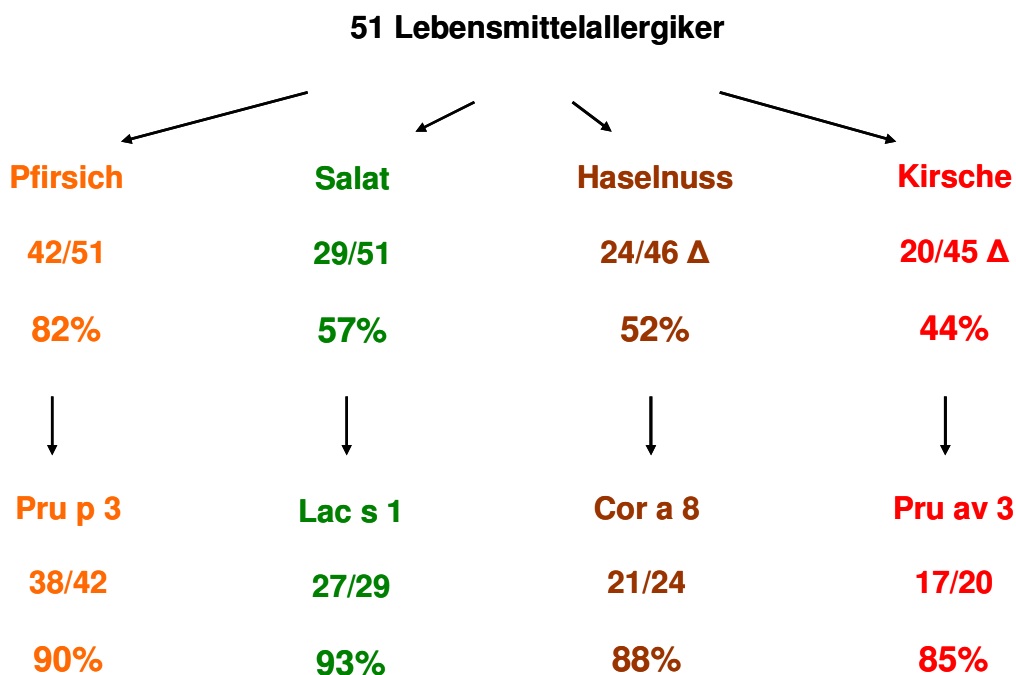


Abb. 4.30: Häufigkeit der Sensibilisierungen in der Lebensmittelallergikergruppe.

Δ: Bei fünf bzw. sechs Lebensmittelallergikern fehlten anamnestische Daten zu einer Haselnuss- bzw. Kirschallergie.

4.5.2.3 Vergleich der IgE-Bindekapazität von LTPs in unterschiedlichen Patientengruppen

Die IgE-Bindekapazität der LTPs wurde durch den Vergleich der ImmunoCAP-FEIA Daten der gereinigten Allergene ermittelt (Tab. 9.1.1). Allergiker wurden aufgrund ihrer klaren klinischen Symptomatik und eines positiven Hauttests oder einer positiven

serologischen Untersuchung (ImmunoCAP-FEIA > 0,35 U/ml auf den jeweiligen Lebensmittelextrakt) für die Auswertung ausgewählt.

Die IgE-Bindekapazität wurde für die folgenden Patientengruppen (Abb. 4.31) bestimmt:

- A1 (n=23): Pfirsichallergiker mit Salatallergie
- A2 (n=18): Pfirsichallergiker ohne Salatallergie
- A3 (n=5): Salatallergiker ohne Pfirsichallergie

- B1 (n=19): Pfirsichallergiker mit Kirschallergie
- B2 (n=15): Pfirsichallergiker ohne Kirschallergie
- B3 (n=1): Kirschallergiker ohne Pfirsichallergie

- C1 (n=17): Pfirsichallergiker mit Haselnussallergie
- C2 (n=19): Pfirsichallergiker ohne Haselnussallergie
- C3 (n=7): Haselnussallergiker ohne Pfirsichallergie

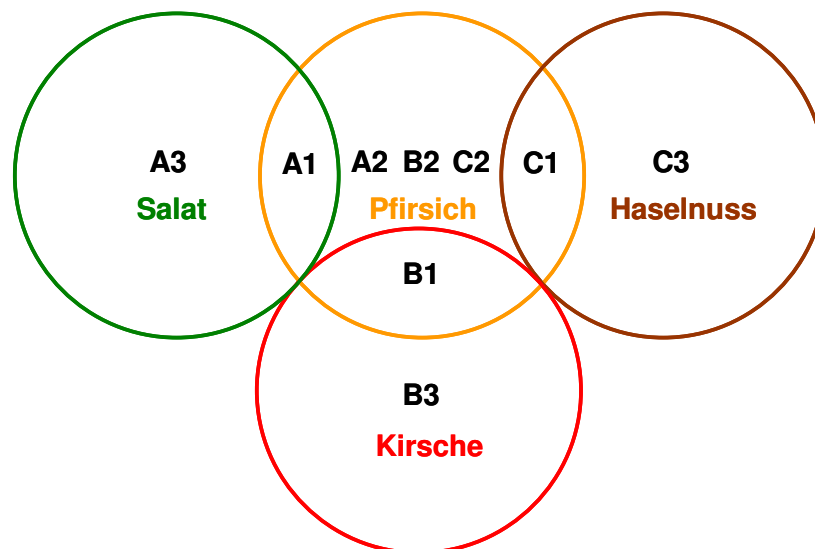


Abb. 4.31: Schematische Darstellung der Patientengruppen, bei denen die IgE-Bindekapazitäten verglichen wurden.

Das Salat-LTP Lac s 1 zeigte in einigen Fällen (NSR 8059 und MMG 4265) eine stärkere IgE-Bindung im Vergleich zu dem Pfirsich-LTP Pru p 3 und umgekehrt (OSN 2932 und GGG 7306) (Abb. 4.32, A 1-3). Mit Ausnahme eines Patienten (MRO 7528) war eine IgE-Sensibilisierung gegen nLac s 1 mit der gegen nPru p 3

assoziiert. Im Gegensatz dazu zeigten acht Patienten eine IgE-Sensibilisierung gegen Pru p 3 jedoch nicht gegen Lac s 1 ($< 0,35$ U/ml).

In der Patientengruppe von Pfirsich- und Kirschallergikern zeigten Pru p 3 und Pru av 3 nahezu identische IgE-Bindekapazitäten (Abb. 4.32, B 1). Der hohe Korrelationskoeffizient von 0,975 und 0,983 in den beiden Gruppen B1 und B2 weist auf eine starke Korrelation der Messdaten hin. Selbst in einer Patientengruppe, die ausschließlich aus Pfirsichallergikern bestand, konnte eine Co-Sensibilisierung gegen das Kirsch-LTP Pru av 3 mit gleicher IgE-Bindekapazität im Vergleich zu Pru p 3 detektiert werden (Abb. 4.32, B 2). Die Gruppe der Kirschallergiker ohne Pfirsichallergie bestand nur aus einem Patienten (JGL 10571). Dieser zeigte weder eine Sensibilisierung gegen Pru p 3 noch gegen Pru av 3 ($< 0,35$ U/ml) (Abb. 4.32, B 3).

Alle Haselnussallergiker mit einer Sensibilisierung gegen Cor a 8 zeigten eine Co-Sensibilisierung gegen das Pfirsich-LTP Pru p 3 (Abb. 4.32, C 1-3). Mit der Ausnahme von einem Patienten (MLR 10560) mit allergischen Reaktionen gegen Pfirsich, aber ohne Haselnussallergie (Abb. 4.32, C 2), zeigten alle Patienten eine stärkere IgE-Bindung an Pru p 3 im Vergleich zu Cor a 8. Diese Korrelation zeigte sich auch in der Gruppe der Haselnussallergiker ohne Pfirsichallergie (Abb. 4.32, C 3). Demnach korreliert eine Sensibilisierung gegen Cor a 8 mit der gegen Pru p 3. Mit Ausnahme der Gruppe A3 und C3, bei denen die Patientenanzahl zu gering war, zeigten alle untersuchten Gruppen eine signifikante Korrelation bei den Messungen der spezifischen IgE-Konzentration ($p < 0,05$).

In einigen Untergruppen war eine LTP-Sensibilisierung nachweisbar, obwohl keine klinischen Symptome gegen das Allergen bei den jeweiligen Patienten vorlag. Auffällig ist, dass die Gruppen der Salat-, Kirsch- und Haselnussallergiker ohne begleitende Pfirsichallergie im Vergleich zu den restlichen Gruppen relativ klein sind.

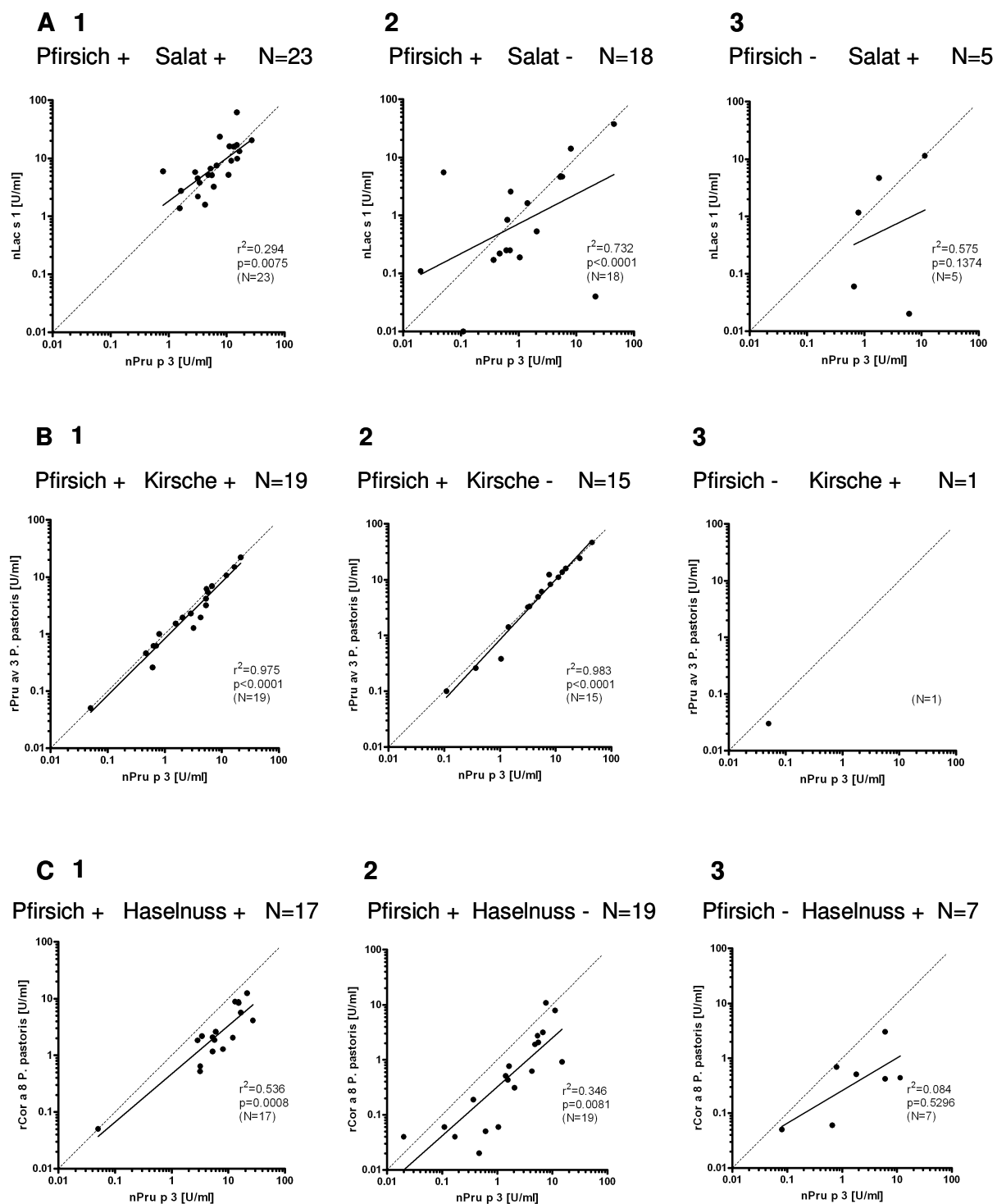


Abb. 4.32: IgE-Bindekapazitäten der LTPs nLac s 1, rPrü av 3 und rCor a 8 in Bezug zu nPrü p 3 mittels experimenteller ImmunoCAP's bestimmt.

A 1: Pflirsich- und Salatallergiker; A 2: Pflirsichallergiker ohne Salatallergie; A 3: Salatallergiker ohne Pflirsichallergie; B 1: Pflirsich- und Kirschallergiker; B 2: Pflirsichallergiker ohne Kirschallergie; B 3: Kirschallergiker ohne Pflirsichallergie; C 1: Pflirsich- und Haselnussallergiker; C 2: Pflirsichallergiker ohne Haselnussallergie; C 3: Haselnussallergiker ohne Pflirsichallergie. r^2 = Korrelationskoeffizient, p = p-Wert.

4.5.3 Kreuzreaktivitäten der humanen IgE-Antikörper

Humane IgE-Antikörperkreuzreaktivitäten wurden durch ELISA-Inhibitionsexperimente (3.3.13) bestimmt. Die gereinigten LTPs (nPru p 3, rCor a 8 (*P. pastoris*), rPru av 3 (*P. pastoris*) und nLac s 1) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen, die in Vorversuchen optimiert wurden (Daten nicht gezeigt), von 0,06-1 µg/ml an die Festphase gekoppelt (Abb. 4.33, 4.34 und 4.35). Je drei Patientenserum von Haselnuss-, Kirsch- und Salatallergikern mit einer zusätzlichen Pfirsichallergie wurden mit dem jeweiligen Inhibitor (nPru p 3, rCor a 8 (*P. pastoris*), rPru av 3 (*P. pastoris*) und nLac s 1) in Konzentrationen von 0,001-10 µg/ml präinkubiert. Die optimale Serumverdünnung wurde ebenfalls in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Kreuzreaktivität von IgE mit Pru p 3 und Pru av 3

Die Kurvenverläufe der Inhibition des spezifischen IgEs gegen nPru p 3 durch nPru p 3 (Selbstinhibition) und rPru av 3 waren bei allen drei Patientenserum (SCP 7535, SGR 7268 und MNF 11539) identisch (Abb. 4.33, A). Diese Beobachtung wurde ebenso bei der Inhibition des spezifischen IgEs gegen rPru av 3 durch nPru p 3 und rPru av 3 (Selbstinhibition) beobachtet (Abb. 4.33, B). Mit Ausnahme des Patientenserums MNF 11539 (Abb. 4.33, B) reichte eine geringe Inhibitor-konzentration von 0,01 µg/ml aus, um eine nahezu komplette Inhibition von über 95% der IgE-Bindung zu erreichen. Eine Steigerung der maximalen Inhibition (95%) konnte mit Ausnahme des Patientenserums MNF 11539 (Abb. 4.33, B) durch die Erhöhung der Inhibitor-konzentration von 1 µg/ml auf 10 µg/ml nicht erzielt werden (Abb. 4.33, A und B).

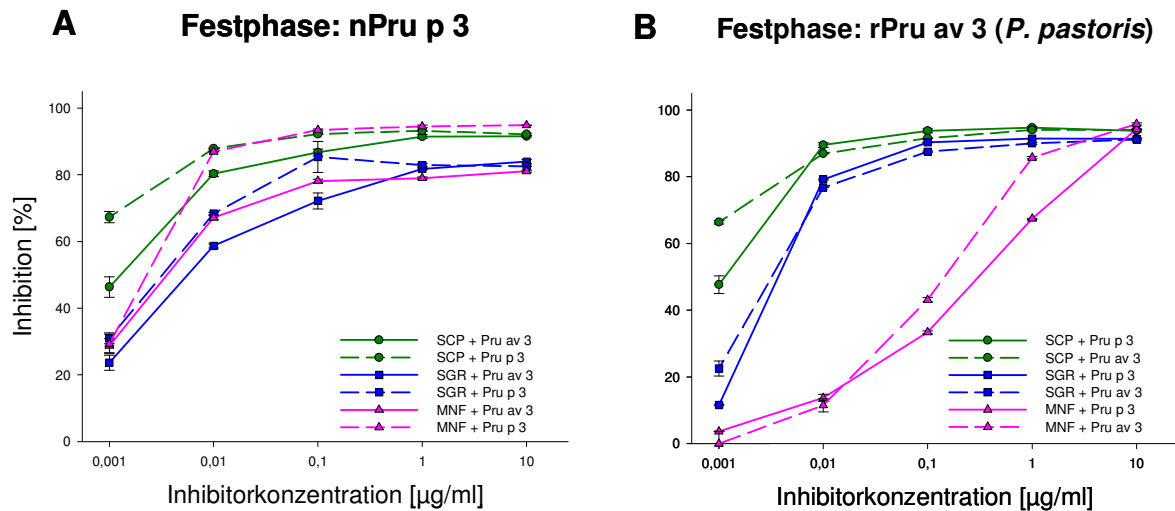


Abb. 4.33: Dosisabhängige Inhibition der IgE-Reaktivität der Patientenseren SCP 7535, SGR 7268 und MNF 11539 mit nPru p 3 und rPru av 3.

Die Seren stammen von Patienten mit einer Pflirsich- und Kirschallergie. nPru p 3 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an die Festphase gekoppelt (Serum, Verdünnung, Antigenkonzentration: SCP 7535; 1:45; 0,06 µg/ml, SGR 7268; 1:18; 0,25 µg/ml und MNF 11539; 1:8; 0,125 µg/ml) (A). rPru av 3 wurde ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen an die Festphase gekoppelt (Serum, Verdünnung, Antigenkonzentration: SCP 7535; 1:32; 0,06 µg/ml, SGR 7268; 1:10; 0,25 µg/ml und MNF 11539; 1:8; 1 µg/ml) (B). Die Seren wurden mit dem jeweiligen Inhibitor in Konzentrationen von 0,001 µg/ml bis 10 µg/ml präinkubiert. Das restliche gebundene IgE wurde mittels ELISA bestimmt.

Kreuzreaktivität von IgE mit Pru p 3 und Lac s 1

Die IgE-Bindung an nPru p 3 der drei untersuchten Patientenseren (MSCH 7443, SGR 7268 und EDP 6491) wurde durch nLac s 1 in der höchsten Konzentration von 10 µg/ml maximal bis zu 60% inhibiert, während nPru p bei gleicher Proteinkonzentration die IgE-Bindung bis zu 80% (I_{max}) inhibierte (Abb. 4.34, A). Eine halbmaximale Inhibition ($I_{max/2}$) wurde bei allen drei Seren bei der homologen Inhibition durch nPru p 3 mit der gleichen Inhibitorkonzentration von etwa 0,005 µg/ml erreicht, während bei der heterologen Inhibition 0,01 µg/ml (SGR 7268 und EDP 6491) bzw. 0,1 µg/ml (MSCH 7443) nLac s 1 eingesetzt werden musste. $I_{max/2}$ wurde demnach bei der homologen Inhibition im Vergleich zur heterologen mit einer 2-10-fach niedrigeren Inhibitorkonzentration erreicht.

Die IgE-Antikörperreaktivität der drei Seren mit nLac s 1 wurde ebenfalls mit nLac s 1 und nPru p 3 inhibiert (Abb. 4.34, B). Für alle drei Seren zeigte sich, dass die homologen und heterologen Inhibitionskurven jeweils identisch waren. Das

Patientenserum SGR 7268 erreichte mit 90% (I_{max}) den höchsten Wert der maximalen Inhibition, während die Seren MSCH 7443 mit 78% (I_{max}) und EDP 6491 mit 60% (I_{max}) niedrigere Werte aufwiesen. $I_{max/2}$ wurde durch das Serum SGR 7268 schon mit einer Inhibitorkonzentration von etwa 0,003 $\mu\text{g/ml}$ erreicht, während die beiden anderen Seren MSCH 7443 und EDP 6491 eine Konzentration von etwa 0,009 $\mu\text{g/ml}$ benötigten. Die maximale Inhibition wurde bei allen drei Seren bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ erreicht.

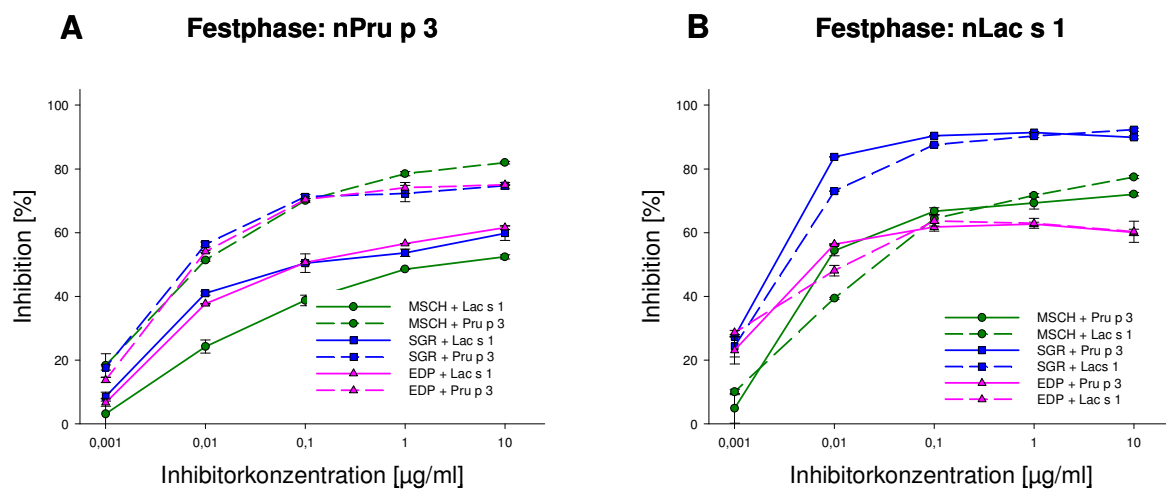


Abb. 4.34: Dosisabhängige Inhibition der IgE-Reaktivität der Patientenserum MSCH 7443, SGR 7268 und EDP 6491 mit nPru p 3 und nLac s 1.

Die Seren stammen von Patienten mit einer Pfirsich- und Salatallergie. nPru p 3 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an die Festphase gekoppelt (Serum, Verdünnung, Antigenkonzentration: MSCH 7443; 1:20; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, SGR 7268; 1:20; 0,25 $\mu\text{g/ml}$ und EDP 6491; 1:10; 0,25 $\mu\text{g/ml}$) (A). nLac s 1 wurde ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen an die Festphase gekoppelt (Serum, Verdünnung, Antigenkonzentration: MSCH 7443; 1:16; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, SGR 7268; 1:16; 0,25 $\mu\text{g/ml}$ und EDP 6491; 1:10; 0,125 $\mu\text{g/ml}$) (B). Die verdünnten Seren wurden mit dem jeweiligen Inhibitor in Konzentrationen von 0,001 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ preinkubiert. Das restliche gebundene IgE wurde mittels ELISA bestimmt.

Kreuzreaktivität von IgE mit Pru p 3 und Cor a 8

Rekombinantes Cor a 8 konnte die IgE-Bindung an nPru p 3 nur partiell inhibieren (Abb. 4.35, A), während nPru p 3 die Bindung komplett inhibierte (Abb. 4.35, B). Die IgE-Bindung an nPru p 3 der zwei Patientenserum MSCH 7443 und SCP 7535 wurde durch die am höchsten eingesetzte Inhibitorkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ rCor a 8 lediglich bis zu 25-35% inhibiert (Abb. 4.35, A), während die IgE-Bindung des

Serums LCGH 9343 über 60% inhibiert wurde. Die homologen Inhibitionen der IgE-Bindung aller Seren durch nPru p 3 als Inhibitor lagen bei über 80%. Eine vollständige Inhibition der Seren MSCH 7443 und SCP 7535 wurde durch eine 10 bis 100-fach niedrigere Inhibitorkonzentration von nPru p 3 im Vergleich zur homologen Inhibition durch rCor a 8 erreicht (Abb. 4.35, B). Im Gegensatz dazu zeigte das Patientenserum LCGH 9343 keine signifikanten Unterschiede im Kurvenverlauf im Vergleich der heterologen und homologen Inhibition. Die Daten deuten darauf hin, dass Pru p 3 die Gesamtheit der Cor a 8 Epitope präsentierte, während Cor a 8 umgekehrt nicht alle Pru p 3 Epitope besaß. Des Weiteren könnte die Bindung von IgE an Pru p 3 mit höherer Affinität erfolgen als bei Cor a 8.

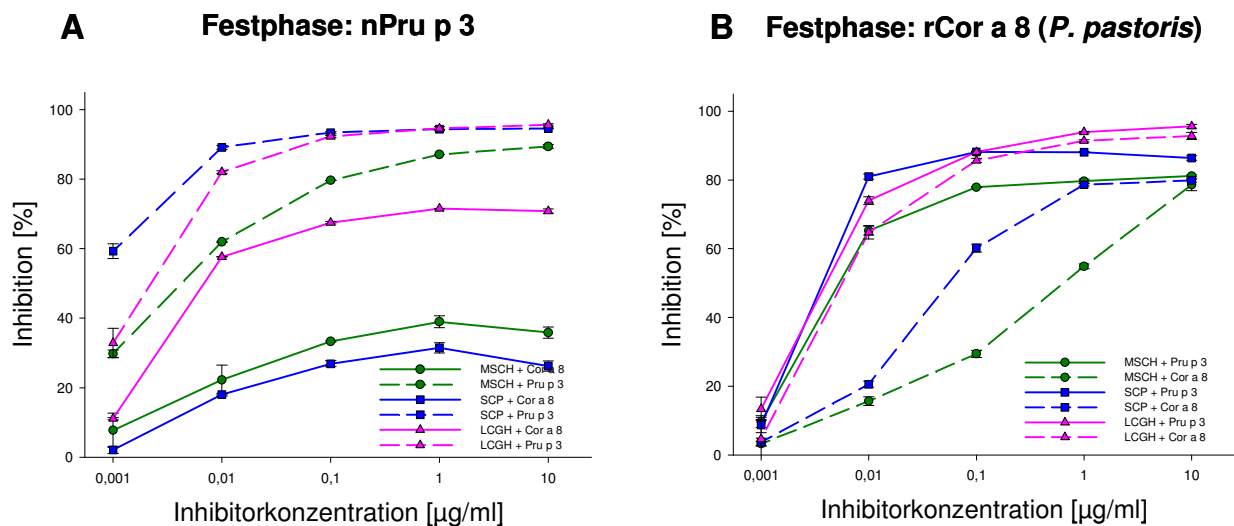


Abb. 4.35: Dosisabhängige Inhibition der IgE-Reaktivität der Patientenserum MSCH 7443, SCP 7535 und LCGH 9343 mit nPru p 3 und rCor a 8.

Die Seren stammen von Patienten mit einer Pfirsich- und Haselnussallergie. nPru p 3 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an die Festphase gekoppelt (Serum, Verdünnung, Antigenkonzentration: MSCH 7443; 1:20; 0,25 µg/ml, SCP 7535; 1:45; 0,06 µg/ml und LCGH 9343; 1:16; 0,125 µg/ml) (A). rCor a 8 wurde ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen an die Festphase gekoppelt (Serum, Verdünnung, Antigenkonzentration: MSCH 7443; 1:16; 0,5 µg/ml, SCP 7535; 1:16; 0,5 µg/ml und LCGH 9343; 1:10; 0,25 µg/ml) (B). Die verdünnten Seren wurden mit dem jeweiligen Inhibitor in Konzentrationen von 0,001 µg/ml bis 10 µg/ml preinkubiert. Das restliche gebundene IgE wurde mittels ELISA bestimmt.

4.5.4 Kreuzreaktivitäten der murinen IgE- und IgG-Antikörper

Neben den humanen IgE-Antikörperkreuzreaktivitäten wurden murine Kreuzreaktionen von LTP-spezifischem IgE und IgG mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest (3.3.16) und ELISA (3.3.12.4) bestimmt. Die Mäuse hatten vor der Immunisierung keinen Kontakt zu dem getesteten Allergenspektrum. Eine primäre Sensibilisierung des Immunsystems durch andere LTPs, deren Kreuzreaktivität untersucht werden sollte, konnte somit im Gegensatz zu der Studie mit den humanen Seren, ausgeschlossen werden.

Die Immunisierung der Mäuse (3.3.14) und die anschließende Detektion der Antikörperkreuzreaktivitäten mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest und ELISA wurde mit Unterstützung der Forschungsgruppe „Zelluläre Allergologie“ unter der Leitung von Dr. G. Reese (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt. In Vorversuchen wurden vier unterschiedliche Maustämme (C57B1/6J, CBA/J, C3H/HeJ und Balb/c) mit unterschiedlichen Allergenkonzentrationen von 0,1/1/10 µg rCor a 8, welches an 500 µg Aluminiumhydroxid (Merck, Darmstadt) pro Maus adsorbiert war, intraperitoneal (i.p.) immunisiert [Albrecht et al. 2007]. Der Mausstamm CBA/J zeigte als einziger bei allen eingesetzten Proteinkonzentrationen eine deutliche IgE-Produktion. Aus diesem Grund wurden naive CBA/J Mäuse nachfolgend mit nPru p 3, denaturiertem nPru p 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8 (*P. pastoris*), nPla a 3, nAmb a 6 und nArt v 3 in einer Konzentration von 1 µg pro Maus immunisiert.

Zur Untersuchung der Immunogenität von denaturierten Allergenen wurde reduziertes und alkyliertes nPru p 3 in die Studie einbezogen. Zusätzlich wurden neben den Lebensmittel-LTPs aus dem Pfirsich (Pru p 3) und der Haselnuss (Cor a 8) ebenfalls Pollen-LTPs aus der Platane (Pla a 3), dem Traubenkraut (Amb a 6) und dem Beifuß (Art v 3) in die Studie einbezogen. Durch diesen Ansatz wurde die Bedeutung der Lebensmittel- und Pollen-LTPs hinsichtlich ihrer Immunogenität und IgE-Antikörperkreuzreaktivität untersucht.

Auf eine Immunisierung der Mäuse mit Pru av 3 wurde aufgrund der hohen Sequenzidentität von 85% zu Pru p 3, und der dadurch zu erwarteten sehr ähnlichen Ergebnisse, verzichtet.

Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest

Zunächst wurde der relative IgE-Gehalt der einzelnen Seren ermittelt. Hierfür wurden die Seren 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 verdünnt und zur Sensibilisierung von RBL-2H3-Zellen verwendet. Die jeweiligen Immunogene wurden in einer Konzentration von 1 µg/ml-1 ng/ml als Stimulanz eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Seren, die bei einer 1:10 Verdünnung eine Freisetzung von mindestens 50% zeigten, wurden vereinigt.

In einem weiteren Versuch wurden RBL-2H3-Zellen mit den gepoolten Antiseren passiv sensibilisiert und mit Allergenen (nPru p 3, denaturiertes nPru p 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8, rPru av 3, nArt v 3, nAmb a 6 und nPla a 3) stimuliert.

In diesem Experiment war mit Ausnahme des denaturierten nPru p 3 (Abb. 4.36, B) eine jeweils hochspezifische IgE-Antwort gegen das Immunogen mit gering ausgeprägten Kreuzreaktivitäten feststellbar (Abb. 4.36, A, C, D, E und F).

Mit Ausnahme des anti-nAmb a 6-Serums konnten keine IgE-Kreuzreaktivitäten der restlichen Antiseren mit dem getesteten LTP-Spektrum (nPru p 3, denaturiertem nPru p 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8 (*P. pastoris*), nPla a 3, nAmb a 6 und nArt v 3 und rPru av 3 (*P. pastoris*)) beobachtet werden. Das anti-nAmb a 6-Serum zeigte schwache Kreuzreaktivitäten mit den LTPs nArt v 3 und nPru p 3 mit einer Freisetzung von ca. 40% bei der höchsten verwendeten Proteinkonzentration von 1 µg/ml (Abb. 4.36, F). Bei einer mehrfachen Wiederholung des Experiments konnte die beobachtete Kreuzreaktivität zwischen dem anti-nAmb a 6-Serum und nPru p 3 nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

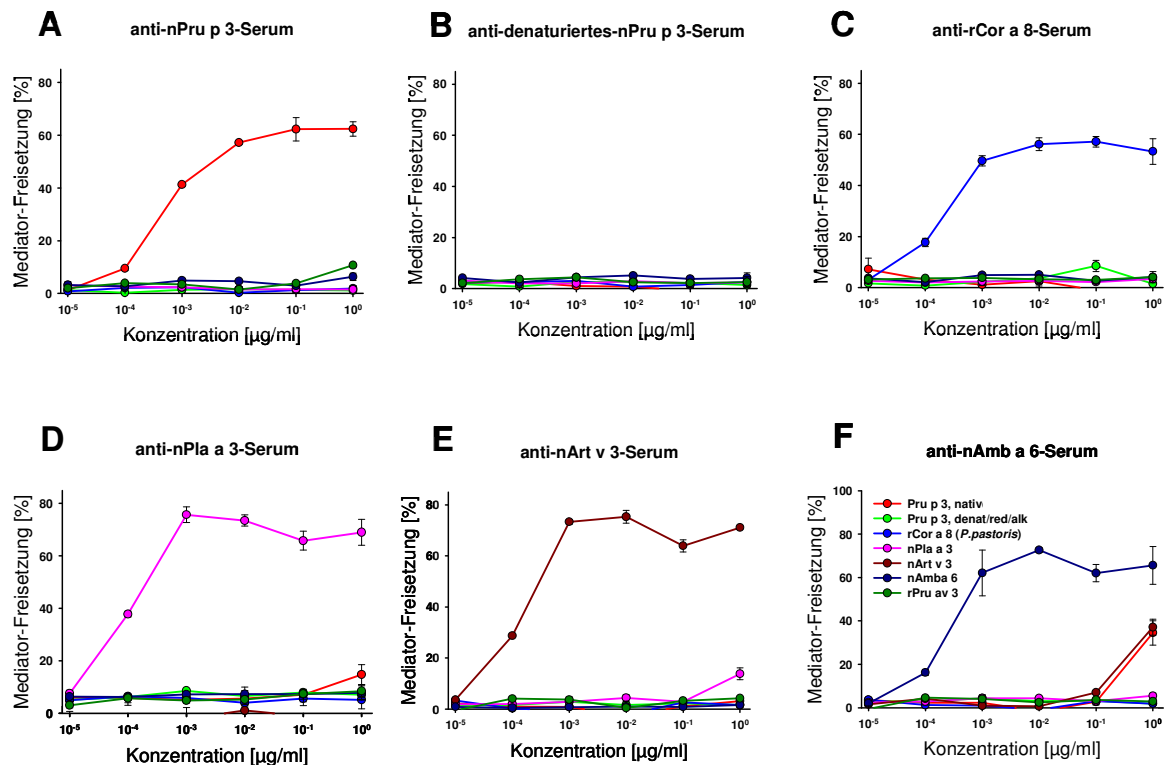


Abb. 4.36: Untersuchung der murinen IgE-Antikörperkreuzreaktivitäten mit verschiedenen LTPs aus Pollen und Lebensmitteln mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest.

Die mit Antisera nach LTP-Immunsierung passiv sensibilisierten RBL-2H3-Zellen wurden mit verschiedenen LTPs, wie in der Abbildung angegeben, in einer Konzentration von 10 µg/ml-10 pg/ml stimuliert. Die Mediatorfreisetzung wurde in Prozent angegeben.

Kreuzreaktivitäten von IgG-Antikörpern mittels ELISA

Das allergenspezifische IgG wurde unter Verwendung der Antisera mittels ELISA-Titration (3.3.12.4) ermittelt. Eine spezifische IgG-Immunantwort gegen das LTP, das zur Immunsierung eingesetzt wurde, konnte mit Ausnahme des denaturierten nPru p 3 (Abb. 4.37, B) bei allen eingesetzten LTPs deutlich bis zu einer OD₄₀₅ von etwa 3 mit einer Serumverdünnung von 10⁻³ detektiert werden (Abb. 4.37, A, C, D, E, F und G). Im Gegensatz zur IgE-Kreuzreaktivität waren Kreuzreaktionen von spezifischem IgG deutlich durch eine OD₄₀₅ zwischen 0,5 und 2,2 mit einer Serumverdünnung von 10⁻³-10⁻² deutlich nachweisbar. Die Kurven der beobachteten IgG-Antikörperkreuzreaktivitäten zeigten im Vergleich zu denen der homologen Antisera erst bei einer 10-100-fach geringeren Serumverdünnung eine deutliche Reaktion.

Natürliches Pru p 3 und rPru av 3 zeigten die stärksten Kreuzreaktivitäten zu dem anti-rCor a 8-Serum mit einer OD₄₀₅ von etwa 2,1 bis 2,2 sowie zum anti-nArt v 3-

Serum mit einer OD_{405} von etwa 1,5 bis 1,8 (Abb. 4.37, A und G). Die Daten beider ELISAs zeigten nahezu identische Ergebnisse der Antiseren-Reaktivitäten, so dass gleiche Antigeneigenschaften der beiden LTPs abgeleitet werden können. Das denaturierte nPru p 3 (reduziert/alkyliert) zeigte mit keinem getesteten Antiserum eine Kreuzreaktivität (Abb. 4.37, B). Rekombinantes Cor a 8 hingegen zeigte eine deutliche Kreuzreaktivität mit dem nArt v 3-Antiserum (OD_{405} von etwa 1,2) (Abb. 4.37, C), während eine schwache Kreuzreaktivität zwischen nPla a 3 und dem anti-rCor a 8-Serum bzw. anti-nArt v 3-Serum auftrat (OD_{405} von etwa 0,5) (Abb. 4.37, D). Desweiteren wurde eine deutliche IgG-Kreuzreaktivität zwischen nArt v 3 und dem anti-nPru p 3-Serum gefunden (Abb. 4.37, E). Natürliches Amb a 6 zeigte als einziges LTP keine IgG-Antikörperkreuzreaktivitäten mit den getesteten Antiseren (Abb. 4.37, F). Das Serum der Mäuse, die mit Ovalbumin immunisiert wurden, diente in diesem Versuch als Positivkontrolle und zeigte lediglich eine spezifische Sensibilisierung gegen Ovalbumin (Daten nicht gezeigt).

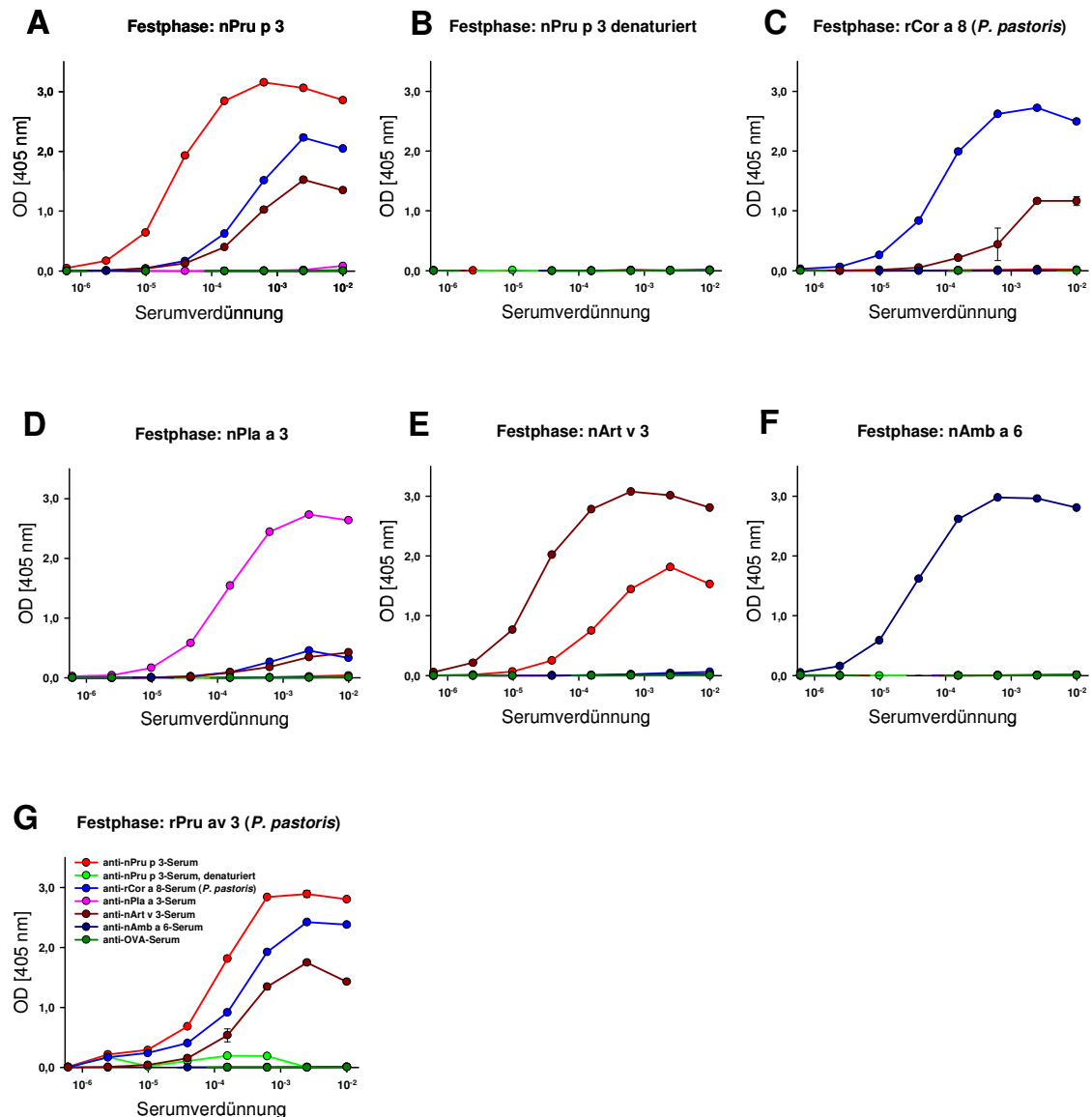


Abb. 4.37: Untersuchung der murinen IgG-Antikörperkreuzreaktivitäten mit verschiedene LTPs aus Pollen und Lebensmitteln mittels ELISA.

LTPs wurden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ an die Festphase gebunden. Der IgG-Titer der einzelnen Antiseren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm angegeben.

4.5.5 Vergleich der biologischen Potenz der LTPs aus Lebensmitteln im humanen System

Ziel dieser Experimente war die Bestimmung der biologischen Potenz der isolierten Lebensmittel-LTPs aus Pfirsich (nPru p 3), Kirsche (rPru av 3 (*P. pastoris*)), Haselnuss (rCor a 8 (*P. pastoris*)) und Salat (nLac s 1). Zusätzlich wurden zwei verschiedene Salatvarietäten (Kopfsalat- und Mini-Romanasalatextrakt) auf Unterschiede in ihrer biologischen Potenz untersucht.

Anhand des basophilen Histamin Freisetzungstests wurden die Allergene bzw. Extrakte hinsichtlich ihrer Fähigkeit, durch Kreuzvernetzung von membran-gebundenem IgE bei basophilen Granulozyten Histamin freizusetzen, untersucht. Eine Histaminfreisetzung deutet auf die Fähigkeit des jeweiligen Allergens bzw. Extraktes hin, eine Auslösung von Symptomen einer Typ I-Allergie bewirken zu können.

Hierfür wurden basophile Granulozyten aus Vollblut eines Nicht-Allergikers angereichert und das membrangebundene IgE entfernt (3.3.15). Durch Inkubation mit Allergikerseren (MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268, SSG 7799 und LMC 11362) wurden die Zellen anschließend sensibilisiert. Vier der fünf Seren (MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268, SSG 7799) wurden aufgrund ihres hohen Gehalts an spezifischem IgE (> 5 kU/ml) gegen nLac s 1, nPru p 3, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*) ausgewählt (Tab. 9.1.1). Zusätzlich sollte bei diesen vier Seren die vorhandene Sensibilisierung möglichst mit einer klinischen Symptomatik korrelieren (Tab. 4.3). Lediglich bei den Patienten MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799 traten keine Symptome nach dem Verzehr von Kirschen auf. Bei allen restlichen LTP-Sensibilisierungen dieser vier Patienten lag eine positive Anamnese vor.

Tab. 4.3: Klinische Symptomatiken der untersuchten Patienten MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268, SSG 7799 und LMC 11362.

PATIENT	PFIRSICH-ALLERGIE	KIRSCH-ALLERGIE	HASELNUSS-ALLERGIE	SALAT-ALLERGIE
MNF 11539	+	+	+	+
MSCH 7443	+	-	+	+
SGR 7268	+	-	+	+
SSG 7799	+	unbekannt	+	+

Das Serum eines Salatallergikers LMC 11362 zeigte im Immunoblot eine Sensibilisierung gegen Kopfsalatextrakt, jedoch nicht gegen Mini-Romanasalatextrakt (Abb. 4.2) und sollte deshalb im Histaminfreisetzungstest auf Unterschiede in der Stimulation durch die beiden Salatvarietäten untersucht werden. Weiterhin besitzt dieser Patient eine Salatallergie ohne begleitende Pfirsichallergie.

Tab. 4.4: Unterschiedliche IgE-Reaktivität gegen Kopf- und Mini-Romanasalatextrakt und klinische Symptomatik des untersuchten Patienten LMC 11362.

PATIENT	IMMUNOBLOT MINI- ROMANASALAT	IMMUNOBLOT KOPFSALAT	PFIRSICH- ALLERGIE	SALAT- ALLERGIE
LMC 11362	-	+	-	+

Die Stimulation mit Allergenen (nLac s 1, nPru p 3, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*)) oder den Salatextrakten (Kopfsalat und Mini-Romanasalat) bewirkte eine Histaminfreisetzung (Abb. 4.38). Auffällig war, dass nPru p 3 und rPru av 3 als einzige Allergene mit einer geringen Konzentration von 10 ng/ml bei vier der fünf Patientenserum (MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268, SSG 7799) eine hohe Histaminausschüttung induzierten (> 30-40%). Die halbmaximale Freisetzung, die als Histamin-Release-(HR)₅₀-Wert definiert wird und ebenfalls die Stärke der biologischen Potenz angibt, liegt für nPru p 3 bei diesen vier der fünf Patienten unter 10⁻¹ ng/ml. Für rPru av 3 liegt der HR₅₀-Wert bei diesen vier Patienten zwischen 10⁻¹–1 ng/ml. Anhand dieser Ergebnisse wiesen das Pfirsich- (Pru p 3) und KirschlTP (Pru av 3) in diesem Testsystem eine starke biologische Potenz auf. Rekombinantes Cor a 8 hingegen setzte erst bei wesentlich höheren Konzentrationen von 10⁴ ng/ml geringe Mengen an Histamin frei (20% bei SSG 7799, 10% bei MNF 11539, MSCH 7443 und SGR 7268). Bei Cor a 8 konnte aufgrund der schwachen Histaminfreisetzung kein HR₅₀-Wert bestimmt werden. Natürliches Lac s 1 zeigte bei drei der fünf Patienten eine maximale Histaminfreisetzung um 20% (SGR 7268 und SSG 7799) und 12% (MSCH 7443), während der Patient MNF 11539 lediglich eine Freisetzung von 8% zeigte. Eine maximale Histaminfreisetzung (12%) durch nLac s 1 wurde bei dem Serum MSCH 7443 mit einer Proteinkonzentration von 10² ng/ml erreicht. Bei den Seren SGR 7268 und SSG 7799 reichte eine Proteinkonzentration von 10 ng/ml aus, um eine maximale Histaminausschüttung (~20%) zu erreichen. Bei diesen vier Patienten war entweder keine dosisabhängige Histaminfreisetzung erkennbar oder die Freisetzung zu schwach, wodurch kein HR₅₀-Wert ermittelt werden konnte. Natürliches Lac s 1 zeigte bei dem Patientenserum LMC 11362 im Gegensatz zu den restlichen vier Seren eine starke maximale Histaminfreisetzung bis zu über 50% bei einer Proteinkonzentration von 10² ng/ml. Der HR₅₀-Wert lag ca. bei 1 ng/ml und wies somit auch auf eine starke biologische

Potenz hin. Bei diesem Patientenserum war auffällig, dass die Histaminfreisetzung durch Stimulation mit nPru p 3 im Gegensatz zu allen anderen getesteten Seren sehr gering war. Eine maximale Freisetzung von lediglich ca. 15% wurde mit einer Konzentration von 1 ng/ml erreicht, obwohl die halbmaximale Freisetzung mit einer geringen Allergenkonzentration von 10^{-1} –1 ng/ml erreicht wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass Pru p 3 bei Patienten, die eine Sensibilisierung ohne klinische Symptomatik gegen das Allergen zeigten, nicht zwangsläufig die stärkste biologische Potenz besaß. Weiterhin wurde kein deutlicher Unterschied in der Histaminfreisetzung bei diesem Serum durch Stimulation mit zwei unterschiedlichen Salatextrakten, Kopfsalat und Mini-Romanasalat, detektiert. Beide Extrakte zeigten mit ansteigender Proteinkonzentration von 10^2 - 10^4 ng/ml einen linearen Anstieg bis eine maximale Freisetzung von ca. 30% mit der höchsten Konzentration erreicht wurde. Die Daten zeigten somit keinen Unterschied in der Allergenität der beiden Salatextrakte.

Die in den Tests eingesetzte Negativkontrolle (BSA) bewirkte keine Histamin-ausschüttung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pru p 3 und Pru av 3 in der Mehrzahl der untersuchten Fälle die stärkste biologische Potenz gezeigt haben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die biologische Potenz der Lebensmittel-LTPs sehr unterschiedlich sein kann.

Weiterhin war auffällig, dass die gemessene spezifische IgE-Konzentration (Tab. 9.1.1) gegen nLac s 1 nicht mit der Höhe der gemessenen Histaminfreisetzung korrelierte. Natürliches Lac s 1 bewirkte trotz ähnlich hoher IgE-Konzentrationen im Vergleich zu nPru p 3 und rPru av 3 bei vier Patientenseren (MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799) eine wesentlich geringere Histaminfreisetzung. Natürliches Pru p 3 bewirkte bei dem Patientenserum LMC 11362 ebenfalls trotz einer sehr hohen IgE-Konzentration eine geringe Histaminfreisetzung von unter 20%, während bei wesentlich niedrigeren spezifischen IgE-Konzentrationen bei den vier Patientenseren MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799 höhere maximale Freisetzungen von über 30% durch die Stimulation mit nPru p 3 erhalten wurden. Eine Stimulation des Patientenserums MNF 11539 mit nPru p 3 oder rPru av 3 bewirkte trotz schwacher klinischer Symptomatiken bei diesem Patienten bezüglich einer Pfirsich- und Kirschallergie, wie das orale Allergie Syndrom (OAS), eine starke Histaminfreisetzung.

Rekombinantes Cor a 8 löste hingegen bei den Patienten starke Symptome, wie Urtikaria, aus und zeigte bei allen untersuchten Patienten lediglich eine geringe Histaminausschüttung. Die Stimulation durch nLac s 1 zeigte bei Patienten mit dem oralen Allergie Syndrom oder Urtikaria (MNF 11539 und MSCH 7443) nur eine geringe Histaminfreisetzung (um 10%), während bei Patienten mit einer starken allergischen Reaktion, wie dem anaphylaktischen Schock (SGR 7268 und SSG 7799), größere Mengen an Histamin freigesetzt wurden (20-50%). Eine generelle Aussage über die Korrelation der Stärke der vorhandenen Symptome mit der gemessenen Histaminfreisetzung kann jedoch aufgrund der niedrigen Anzahl der getesteten Patienten nicht getroffen werden.

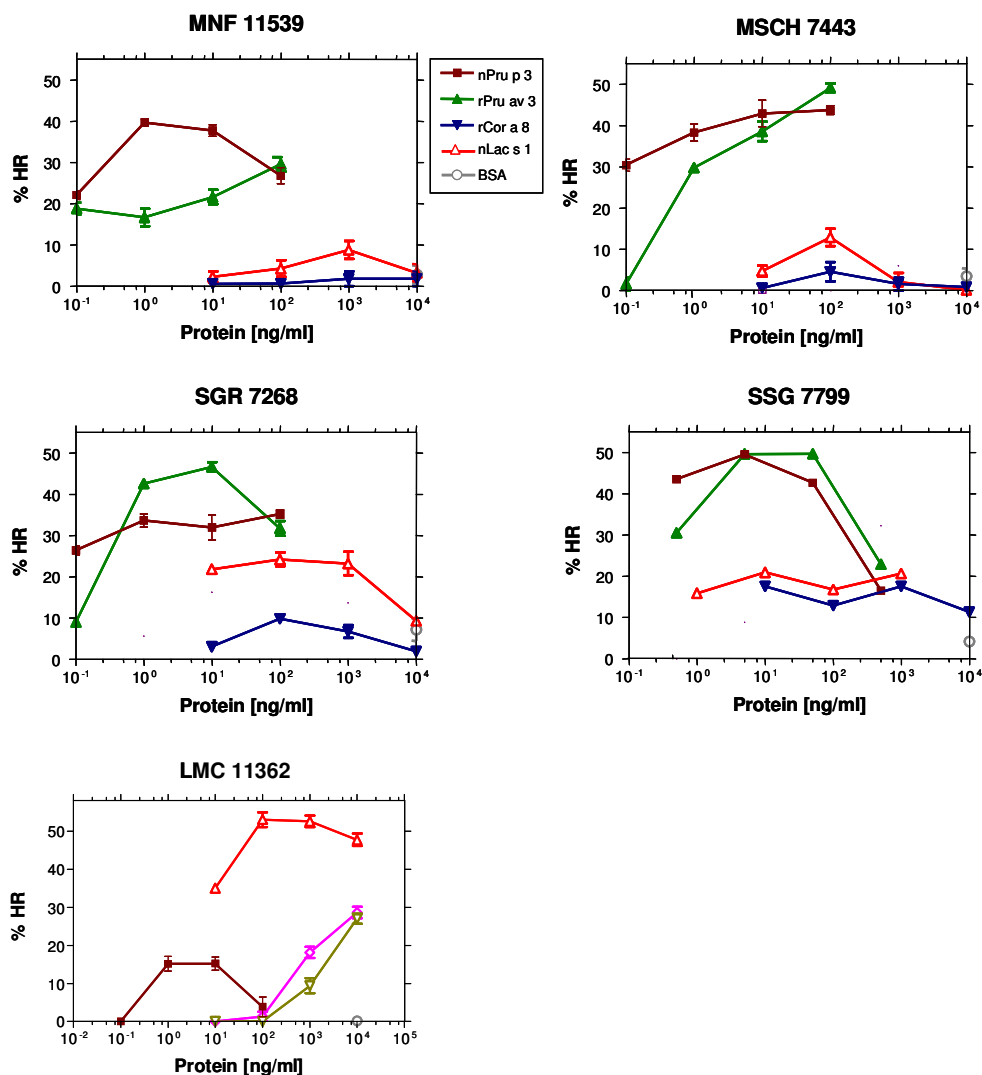


Abb. 4.38: Histaminfreisetzung aus passiv mit Patientenserum MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799 sensibilisierten basophilen Granulozyten.

Die LTPs wurden in einer Konzentration von 10^{-1} - 10^4 ng/ml und Extrakte von 10^1 - 10^4 ng/ml eingesetzt. BSA wurde in einer Konzentration von 10 μ g/ml als Negativkontrolle mitgeführt.

4.5.6 Untersuchungen der Pru p 3 spezifischen T-Zell Proliferation

4.5.6.1 Herstellung der T-Zell-Linien und T-Zell-Klone

Zur Bestimmung der Immunogenität der LTPs wurden die Kreuzreaktivitäten auf T-Zell-Ebene untersucht. Hierzu wurde die Proliferation von Pru p 3 spezifischen T-Zell-Linien (TCL) und Klonen (TCC) durch Stimulation mit dem Kirsch-, Haselnuss- und Salat-LTP untersucht. Die Herstellung der TCLs und TCCs sowie die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung von Frau Prof. Dr. B. Bohle (Medizinische Universität, Wien, Österreich) durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden 10 mg nPru p 3, 1 mg rPru av 3 (*P. pastoris*), 0,5 mg rCor a 8 (*P. pastoris*) und 1 mg rLac s 1 (*E. coli*) produziert. Der Endotoxingehalt wurde mittels LAL-Test (3.3.10) überprüft und lag bei allen Proben unter der Nachweisgrenze von 0,03 Endotoxin-Units pro ml. 57 Pfirsichallergiker (3.1.9), die für diese Studie rekrutiert wurden, wurden im Immunoblot (3.3.7) und EAST (3.3.12.2) auf spezifisches IgE gegen das Pfirsich-LTP Pru p 3 untersucht. 13 der 57 Patienten wurden aufgrund ihrer hohen Menge an spezifischem IgE gegen Pru p 3 (\geq EAST-Klasse 2) für detailliertere Untersuchungen ausgewählt.

Für die Herstellung der TCL und TCC wurden humane mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von Pfirsichallergikern (n=13) isoliert und mit unterschiedlichen Mengen von nPru p 3 stimuliert. Abb. 4.39 zeigt die Proliferation der isolierten PBMCs von den dreizehn Patienten durch Stimulation mit unterschiedlichen nPru p 3 Konzentrationen (0,6-5 μ g/Plattenkavität). Bei sechs Patienten konnte eine deutliche Proliferation der Zellen mit einer Menge von 5 μ g/Plattenkavität nPru p 3 gemessen werden. Gemessen wurde die Aktivität durch den Einbau von radioaktiven 3[H]-Thymidin während der Proliferation der Zellen.

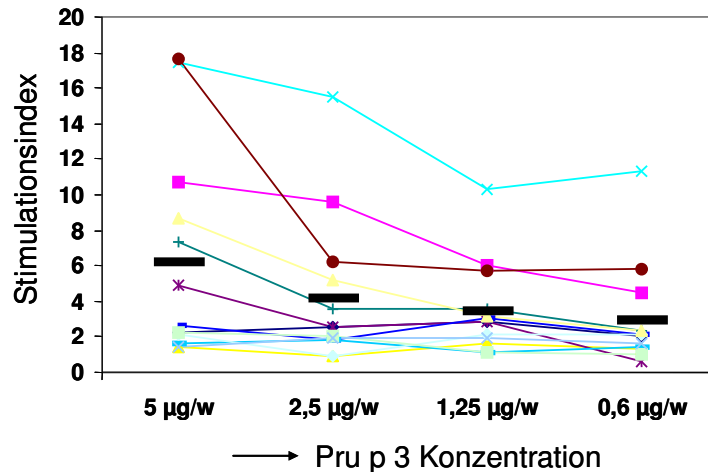


Abb. 4.39: Proliferation isolierter PBMCs durch Stimulation mit nPru p 3.

Stimulationsindex von isolierten PBMCs von dreizehn Patienten durch Stimulation mit unterschiedlichen Mengen an nPru p 3 (0,6-5 µg/Plattenkavität (w)). Mittelwerte sind durch schwarze Balken dargestellt.

4.5.6.2 T-Zell Epitopmapping von Pru p 3

T-Zellen erkennen über den T-Zell-Rezeptor im Gegensatz zu IgE-Antikörpern nur lineare Epitope. Zur Identifizierung dieser linearen Epitope wurden 27 synthetische überlappende Peptide, die die gesamte Pru p 3-Sequenz präsentierten, auf ihre Fähigkeit spezifische T-Zell-Klone zur Proliferation anzuregen, untersucht. Die Peptide mit einer Länge von zwölf Aminosäuren, die jeweils überlappende Sequenzen von neun Aminosäuren besaßen, wurden mit 14 Pru p 3 spezifischen TCL inkubiert, um anschließend die Peptid-induzierte Proliferation zu analysieren. 24 der Peptide erzeugten eine deutliche Proliferation der Zellen. Eine Proliferation der TCL konnte bei 13/14 Linien durch mehrere Peptide (mind. 2, max. 8) induziert werden (Abb. 4.40, x-Achse). Abb. 4.40 zeigt eine Summe von 15 Epitopen von Pru p 3, unter denen kein dominantes, das von allen 14 TCL erkannt wurde, identifiziert werden konnte. Maximal wurden sieben Peptide von einer TCL erkannt (Abb. 4.40, Peptid Nr. 11, 14, 16-20, TCL 10).

Nr.	T-Zell-Linien															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	itcgvssal															2
2	gqvssalap															2
3	ssalapcip															2
4	lapcipyvr															2
5	gvggavp															4
6	yvrvggav															2
7	gggavppac															1
8	avppaccng															0
9	paccngirn															0
10	cngirnvnn															1
11	irnvnnlar															3
12	larttpdrq															5
13	larttpdrqa															2
14	tpdrqaacn															3
15	drqaacnclk															3
16	aacnclkqls															5
17	nclkqlsasv															3
18	kqlsasvpgv															2
19	sasvpgvnpn															2
20	vpgvnpnnaa															2
21	vnnpnaaalp															5
22	nnaaalpgkcg															5
23	aalpgkcgvhi															5
24	pgkcgvhipyk															1
25	cgvhipykisas															0
26	hipykisastnc															1
27	ykisastncatvk															1
		6	6	1	4	3	5	6	5	2	7	2	8	3	3	24 reaktive Peptide

Abb. 4.40: T-Zell Epitope von Pru p 3.

14 Pru p 3 spezifische TCL wurden auf ihre Proliferation durch Zugabe der einzelnen überlappenden Pru p 3 Peptide untersucht. Ein schwarzes Kästchen zeigt die Proliferation der jeweiligen T-Zell-Linie. Ein SI von ≥ 2 wurde als signifikante Proliferation gewertet.

4.5.6.3 *In vitro* Untersuchungen zur T-Zell-Kreuzreaktivität

Um die T-Zell-Kreuzreaktivität der LTPs zu bestimmen wurden zum einen drei unterschiedliche Pru p 3-spezifische TCCs, spezifisch für das Peptid CIPYVRGGGAVP (Peptid Nr. 5, Abb. 4.40), mit nPru p 3, rCor a 8 (*P. pastoris*) und rPru av 3 (*P. pastoris*) stimuliert und ihre Proliferation gemessen (Abb. 4.41, A). Zum anderen wurde ein TCC, der eine Proliferation nach Zugabe des Peptids NNAALPGKCGV (Peptid Nr. 22, Abb. 4.40) zeigte, ebenfalls mit den oben genannten LTPs stimuliert und die nachfolgende Proliferation bestimmt (Abb. 4.42, A). Das Pru p 3-Peptid CIPYVRGGGAVP (Peptid Nr. 5, Abb. 4.40) zeigte eine hohe Sequenzidentität mit Pru av 3 (92%, 11/12 Aminosäuren (AS)) und eine niedrige mit Cor a 8 (42%, 5/12 AS) (Abb. 4.39, B), während das Peptid NNAALPGKCGV (Peptid Nr. 22, Abb. 4.40) neben einer identischen Aminosäuresequenzabfolge von

Pru av 3 auch eine hohe Sequenzidentität mit Cor a 8 von 83% (10/12 AS) zeigte (Abb. 4.42, B).

Die drei TCC 1DBV52, 4PL8 und 5RD135 zeigten eine starke Proliferation durch die Zugabe von nPru p 3 mit einem Stimulationsindex von 6-16 (Abb. 4.41, A). Rekombinantes Pru av 3 erreichte einen Stimulationsindex von 2-9, während rCor a 8 nur eine geringe T-Zell Proliferation mit einem Stimulationsindex unterhalb 1 zeigte. Eine deutliche Kreuzreaktion war somit nur für rPru av 3 nachweisbar. Zwischen Pru p 3 und Lac s 1 war keine T-Zell-Kreuzreaktivität nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Der TCC DBV 162 zeigte im Gegensatz dazu eine stärkere Proliferation durch die Stimulation mit rCor a 8 (SI ~5), während nPru p 3 und rPru av 3 eine niedrige T-Zell-Proliferation bewirkten (SI \leq 2) (Abb. 4.42, A). Bei diesem Klon war ebenfalls keine deutliche T-Zell-Kreuzreaktivität zwischen Pru p 3 und Cor a 8 nachweisbar. Untersuchungen der Kreuzreaktivität mit TCL zeigten die gleichen Ergebnisse. Lediglich die Stärke der Kreuzreaktivität zwischen nPru p 3 und rPru av 3 war geringer (Daten nicht gezeigt).

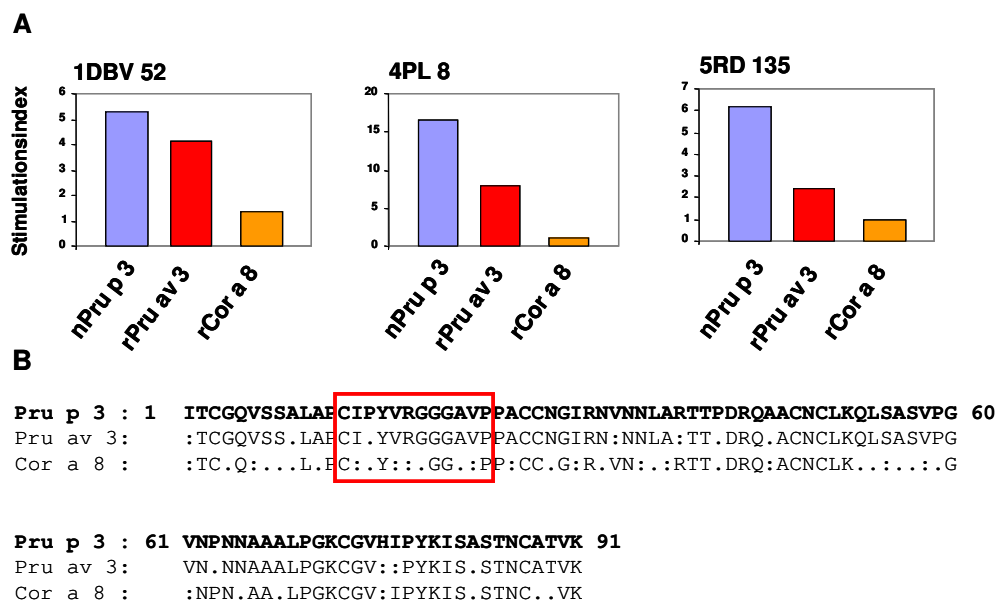


Abb. 4.41: T-Zell-Kreuzreaktivität der LTPs unter Verwendung der T-Zell-Klone 1DBV 52, 4PL 8 und 5RD 135 .

Stimulationsindex von drei Pru p 3 spezifischen TCCs, spezifisch für das Peptid CIPYVRGGGAVP (Peptid Nr. 5, Abb. 4.40), nach Zugabe von nPru p 3 (blauer Balken), rPru av 3 (roter Balken) und rCor a 8 (gelber Balken) (A). Ein SI von \geq 2 wurde als positive Proliferation gewertet. Sequenzvergleiche der untersuchten LTPs bezüglich des spezifischen Peptidbereichs wurden durch einen roten Kasten gekennzeichnet (B). Ähnliche (:) und nicht verwandte (.) Aminosäurereste sind durch das jeweilige Symbol gekennzeichnet.

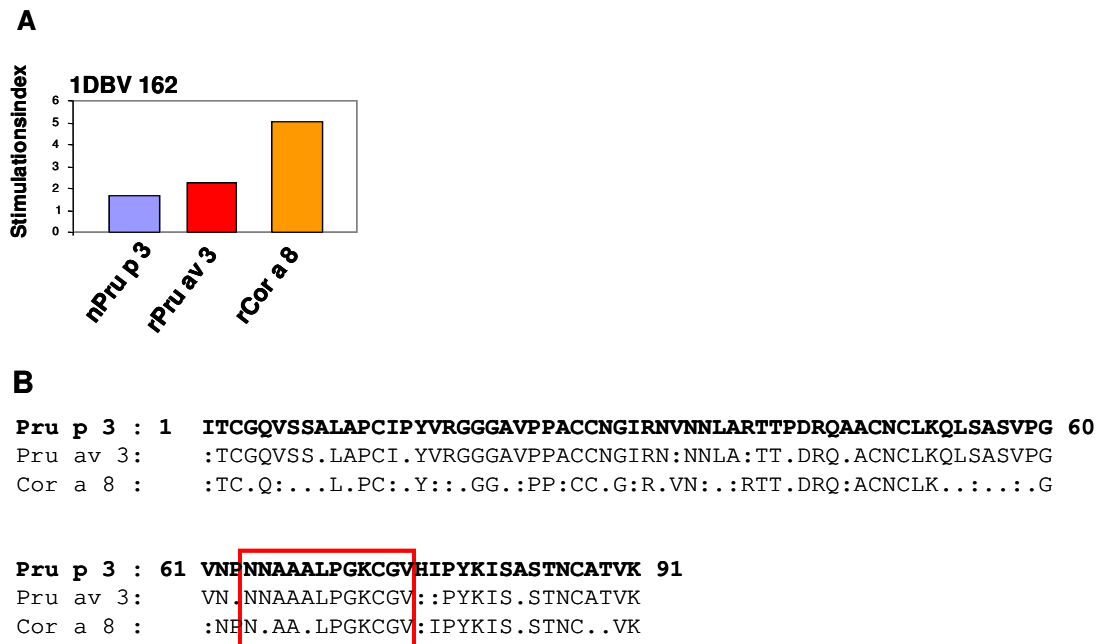


Abb. 4.42: T-Zell-Kreuzreaktivität der LTPs unter Verwendung des T-Zell-Klons 1DBV 162.

Stimulationsindex des TCCs-1DBV 162, spezifisch für das Peptid NNAALPGKCGV (Peptid Nr. 22, Abb. 4.40), nach Zugabe von nPru p 3 (blauer Balken), rPru av 3 (roter Balken) und rCor a 8 (gelber Balken) (A). Ein SI von ≥ 2 wurde als positive Proliferation gewertet. Sequenzvergleiche der untersuchten LTPs bezüglich des spezifischen Peptidbereichs sind durch einen roten Kasten gekennzeichnet (B). Ähnliche (:) und nicht verwandte (.) Aminosäurereste sind durch das jeweilige Symbol gekennzeichnet.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es Allergene aus der Familie der nicht spezifischen Lipid-Transfer-Proteine molekular und immunologisch zu charakterisieren. Dabei sollte untersucht werden, ob jedes Nahrungsmittel-LTP die Fähigkeit besitzt eine IgE-abhängige Sensibilisierung auszulösen oder ob eines der LTPs als primär sensibilisierendes Agens wirkt und nachfolgend immunologische Kreuzreaktionen zu anderen LTPs auftreten. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden die LTPs aus taxonomisch verwandten (Kirsche und Pfirsich) und nicht verwandten (Haselnuss und Salat) Lebensmitteln gereinigt und auf ihre Sensibilisierungs-Häufigkeit, IgE-Bindekapazität, Kreuzreaktivität, biologische Potenz und Immunogenität untersucht. Zusätzlich sollte ein Vergleich zweier LTP-Isoformen aus derselben Spezies (Salat) Aussagen über die klinische Relevanz und biologische Potenz der Isoformen liefern. LTPs gehören einer Multigenfamilie an und können eine große Anzahl von Isoformen umfassen, die jedoch nicht alle zwangsläufig eine Rolle bei der Allergieentwicklung spielen müssen.

5.1 Analyse des Proteinmusters und der Expression von IgE-reaktiven Allergenen aus unterschiedlichen Salatvarietäten

Für die weiteren Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung des Salat-LTPs Lac s 1 und dessen Isoformen wurden zunächst verschiedene Salatvarietäten auf Unterschiede in ihrem Proteinmuster und ihrer IgE-Reaktivität untersucht. Qualitativen Unterschiede im Proteinmuster von fünf verschiedenen Salatvarietäten (Chicoree, Eisbergsalat, Romana, Mini-Romana und Frisee) konnten ausgeschlossen werden (4.1.1.1). Die beobachteten leichten Differenzen im Proteinmuster könnten beispielsweise durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen des Salats entstanden sein. Schwankungen der Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford können ebenfalls zu Differenzen in der aufgetragenen Proteinmenge führen und lassen einzelne Proteinbanden schwächer erscheinen.

Die Gruppe spanischer Salatallergiker (n=29) wurde im Immunoblot auf ihr spezifisches IgE gegen Kopfsalat- und Mini-Romanasalatextrakt untersucht. Diese beiden Salatvarietäten wurden ausgewählt, da spanische Salatallergiker von einer stärkeren allergischen Reaktion gegen Mini-Romanasalat im Vergleich zu Kopfsalat berichteten. Bei fünf Patienten konnte spezifisches IgE gegen das Salat-LTP Lac s 1 nur bei

Kopfsalatextrakt detektiert werden, während lediglich ein Patient eine stärkere Reaktion mit dem Mini-Romanasalatextrakt zeigte (Abb. 4.2). IgE-Inhibitionsstudien unter Verwendung der sechs Salatallergikerseren mit Kopf- und Mini-Romanasalatextrakt zeigten jeweils eine vollständige Aufhebung der IgE-Reaktivität (4.1.1.2). Darüber hinaus konnte kein Unterschied in der Allergenität der beiden Salatextrakte im Mediatorfreisetzungstest gezeigt werden (4.5.4). Obwohl eine Sensibilisierung gegen Lac s 1 aus dem Kopfsalat häufiger gefunden wurde, ergaben sich keine nachweisbaren Unterschiede in der IgE-Reaktivität von Lac s 1 aus beiden Varietäten. Die beobachteten Unterschiede sind durch eine höhere Akkumulation von Lac s 1 in Kopfsalat erklärbar. Aufgrund der identischen IgE-Reaktivität von Lac s 1 aus unterschiedlichen Varietäten wurden die geplanten Versuche einheitlich mit Kopfsalatextrakt durchgeführt.

Im Gegensatz dazu konnte die IgE-Reaktivität gegen Kopfsalat des deutschen Salatallergikers UR durch Präinkubation des Serums mit Endiviensalatextrakt nicht vollständig aufgehoben werden (Abb. 4.3 B). Diese Beobachtung lässt auf das Vorkommen von zwei unterschiedlichen LTP-Isoformen in Kopfsalat und Endiviensalat schließen, die jedoch nur bei diesem Einzelfall beobachtet wurde.

Die spanischen Patienten berichteten von stärkeren allergischen Reaktionen gegen jüngere Salatblätter, insbesondere beim Verzehr von Mini-Romanasalat. Eine Untersuchung von inneren (jüngeren) und äußeren (älteren) Salatblättern des Eisberg- und Romanasalats zeigte keine deutlichen Unterschiede in der Stärke der IgE-Reaktivität gegen das LTP (Abb. 4.4). Möglicherweise führten anderer Faktoren zu einer stärkeren Unverträglichkeit von jüngerem Salat.

5.2 Sensibilisierungsmuster und geographische Unterschiede der Sensibilisierung gegen LTPs

Die spanischen Salatallergiker zeigten ein charakteristisches Sensibilisierungsmuster, bei dem die Patienten entweder auf das 6 kDa große LTP oder auf höhermolekulare Allergene (14 kDa oder >50 kDa) reagierten, deren IgE-Reaktivität durch Kohlenhydratepitope determiniert war (Abb. 4.6). Gemessen an der Anzahl der gefundenen Fälle ergibt sich der Eindruck, dass die Salatallergie in Deutschland sehr viel seltener auftritt als in Spanien. Eine systematische Untersuchung zur Häufigkeit in Deutschland wurde jedoch nicht durchgeführt. Von den insgesamt drei untersuchten deutschen Salatallergikern hatten zwei IgE gegen das Salat-LTP. Diese

Ergebnisse stimmen mit den Daten von Pastorello et al. überein, die Nahrungsmittelallergien gegen die Familie der LTPs hauptsächlich im mediterranen Raum beschrieben haben [Pastorello et al. 1994]. Eine Sensibilisierung gegen LTP kommt in Nord- und Mitteleuropa selten vor, wurde aber in Einzelfällen beschrieben und muss in der klinischen Diagnostik berücksichtigt werden [Scheurer et al. 2001a, Ballmer-Weber 2002, Schad et al. 2005, Reuter et al. 2006]. Die Gründe für die geographisch unterschiedlichen Sensibilisierungsmuster sind bis heute noch unklar. Eine primäre Sensibilisierung gegen das LTP aus Pfirsich in südlichen Ländern könnte durch einen höheren Konsum der Frucht über einen längeren Zeitraum im Jahr oder zu einem früheren Lebensalter und eine nachfolgende Kreuzreaktion mit homologen LTPs aus anderen Lebensmitteln, wie z. B. Salat, eine Erklärung liefern [Breiteneder et al. 2005b]. Asero et al. untersuchten die Essgewohnheiten von Südeuropäern (Spanien/Italien) im Vergleich zu Nord- und Mitteleuropäern (Österreich/Niederlande) und äußerten die Auffassung, dass dies nicht der alleinige Grund für die unterschiedlichen Sensibilisierungsmuster sein kann [Asero et al. 2004]. Die in der jeweiligen Region vorwiegend vorkommenden LTPs aus Pollen, die eine primäre Sensibilisierung über den inhalativen Weg induzieren und somit eine nachfolgende Kreuzreaktion mit Nahrungsmittel-LTPs auslösen, könnten ebenfalls eine Erklärung liefern [Scheurer et al. 2001a, Lombardero et al. 2004, Schocker et al. 2004]. Unterschiede in der genetischen Prädisposition zwischen Süd- und Nordeuropäern, wodurch unterschiedliche MHC-Unterklassen vorliegen könnten, wären ebenfalls denkbar [Ballmer-Weber 2002].

5.3 Häufigkeit der Sensibilisierung gegen Lac s 1

Innerhalb der spanischen Patientengruppe wurde bei 90% (26/29) der Patienten IgE gegen das Salat-LTP mittels IgE-Immunoblotting von Kopfsalatextrakt gefunden. Miguel-Moncin et al. zeigten bei 71% (10/14) einer untersuchten Patientengruppe spezifisches IgE gegen Lac s 1 mittels IgE-Immunoblotting von Kopfsalatextrakt [Miguel-Moncin et al. 2003].

5.4 Identifizierung von Salat-LTP-Isoformen

Zwei Salat-Isoformen, Lac s 1.1 (Acc. No. EF101532) und Lac s 1.2 (Acc. No. EF101531), wurden durch Vorarbeiten isoliert und zeigten eine Aminosäure-

sequenzidentität von 62% (Abb. 4.8). Für Vertreter einer Spezies der gleichen Familie ist dies eine relativ geringe Sequenzähnlichkeit und lässt auf sehr unterschiedliche Proteine schließen, deren Tertiärstruktur wie bei allen anderen untersuchten LTPs hoch konserviert zu sein scheint.

Die Identität der N-terminalen Sequenzen beider Isoformen mit der des natürlichen Lac s 1 [Miguel-Moncin et al. 2003] lag bei max. 58%. Diese unerwartet geringe Sequenzidentität lässt sich aufgrund der angewandten Klonierungsstrategie zur Gewinnung der beiden Lac s 1-Isoformen erklären. Hierbei wurden degenerierte Oligonukleotide verwendet, die von einer konservierten Aminosäuresequenz des Beifuß-LTPs Art v 3 (Acc. No. P0C088) abgeleitet wurden. Zur Identifizierung weiterer Lac s 1-Isoformen, die eine höhere Sequenzähnlichkeit mit dem natürlichen Lac s 1 zeigen, sowie anderer Salatallergene wurde eine cDNA-Expressionsbibliothek von Kopfsalat hergestellt und serologisch gescreent. Obwohl die Qualität der Bibliothek geprüft wurde (Abb. 4.10), konnten keine IgE-reaktiven Proteine identifiziert werden. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.6 nachgewiesenen Kohlenhydratepitope für die höhermolekularen Proteine war es nicht möglich diese Allergene mittels des *E.coli* Expressionssystems, das keine Ausbildung von posttranslationalen Modifikationen ermöglicht, zu detektieren. Die bekannten sowie weitere LTP-Isoformen konnten durch das serologische Screenen der Expressionsbibliothek ebenfalls nicht detektiert werden. Eine Erklärung könnte die bekannte schwache Expression der LTPs in *E. coli* sein. Im Gegensatz dazu konnten zwei Par j 1.0101 Isoformen aus einer λ ZAP cDNA-*Parietaria judaica* Expressionsbibliothek durch serologisches Screening isoliert werden [Duro et al. 1997]. Die Durchführung erfolgte prinzipiell wie in dieser Arbeit. Abweichend davon war die Verwendung einer λ ZAP- anstatt der λ SCREEN-cDNA Expressionsbibliothek. Die beiden bekannten Lac s 1-Isoformen konnten mittels spezifischer PCR in der Expressionsbibliothek detektiert werden, wodurch die Qualität der Bibliothek belegt wurde (Abb. 4.10). Eine Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte eine komplette Übereinstimmung mit den bekannten Sequenzen von Lac s 1.1 und Lac s 1.2 und belegte, dass die eingesetzten Primer Isoform-spezifisch waren.

Aufgrund der schlechten Expression (4.2.5) und dem hohen Anteil an ungefaltetem Protein (4.4.3) nach der Reinigung der rekombinaten Salat-Isoformen wurden keine weiteren Strategien neue Isoformen zu identifizieren verfolgt. Aus dem Grund wurden die geplanten Versuche mit dem isolierten natürlichen Lac s 1 durchgeführt.

5.4.1 Aminosäuresequenzidentitäten der Lac s 1-Isoformen mit anderen LTPs

Hohe Aminosäuresequenzidentitäten wurden zwischen Lac s 1.1 und LTPs aus entfernt verwandten Pflanzen, wie Kirsche und Pfirsich, mit 66% gefunden. Die N-terminale Sequenz von Lac s 1.1 und nPla a 3 [Lauer et al. 2007] zeigte eine sehr hohe Identität von 72%. Lac s 1.2 zeigte hingegen weder zu LTPs aus entfernt verwandten Spezies noch zu nPla a 3 eine Sequenzidentität von über 57%. Sequenzidentitäten beider Salatisoformen mit anderen Pollen-LTPs (Amb a 6 Acc. No. U89793, Par j 1 Acc. No. P43217 und Par j 2 Acc. No. P55958) vielen sehr gering aus (max. 27%), obwohl das Traubenkraut (Amb a 6) und der Salat (Lac s 1) Mitglieder der gleichen Familie (*Asteraceae*) sind. Im Gegensatz dazu zeigten beide Salat-Isoformen mit dem N-Terminus des Beifuss-LTP Art v 3 (n=37) (Acc. No. P0C088), einem weiteren Mitglied der *Asteraceae* Familie, wesentlich höhere Aminosäuresequenzidentitäten (46% und 54%). Die relativ hohe Aminosäuresequenzidentität von Lac s 1.1 mit dem Pfirsich-LTP Pru p 3 (66%) (Acc. No. AJ277163) und dem N-Terminus des Platanen-LTP Pla a 3 (72%) würden kreuzreaktive Eigenschaften homologer LTPs bei Salatallergikern mit einer begleitenden Pfirsich- und Platanenpollenallergie erwarten lassen.

5.5 Klonierung, Expression und Reinigung der LTPs

Das verwendete eukaryotische Hefeexpressionssystem (*Pichia pastoris*) stellt eine interessante Alternative zum Prokaryotensystem (*Escherichia coli*) dar. Diese Mikroorganismen besitzen charakteristische Eigenschaften, die sich von denen der Prokaryoten stark unterscheiden. Sie verfügen über die Möglichkeit der Proteinsekretion und der posttranslationalen Modifikation der Proteine, wie die N- und O-Glykosylierung, sowie die Fähigkeit Disulfidbrückenbindungen besser ausbilden zu können [Eckart et al. 1996]. Durch den Einsatz der Hefe *Pichia pastoris* kommt es im Gegensatz zu der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht zu Hyperglykosilierungen der Proteine [Grinna et al. 1989].

Schocker et al. zeigten eine geringe Proteinausbeute von rCor a 8, das im prokaryotischen Expressionssystem *E. coli* BL21 exprimiert und nativ gereinigt wurde, mit einer Gesamtausbeute von 1,5 mg/L Bakteriensuspension [Schocker et al. 2004]. Aus vorherigen Studien der eigenen Gruppe war ebenfalls bekannt, dass eine Expression der LTPs in *E.coli* relativ geringe Ausbeuten (1-2 mg/L *E. coli*-

Suspension) lieferte. Zudem konnte eine unerwünschte Multimerisierung der Allergene beobachtet werden, die teilweise einen negativen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine hatte (Daten nicht publiziert). Um eine aussagekräftige Vergleichstudie unterschiedlicher LTPs durchführen zu können, müssen die Proteine in ausreichender Menge als Monomere mit korrekter Sekundärstruktur vorliegen. Aus diesem Grund wurde die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* als eukaryotisches Expressionssystem verwendet. Es war bekannt, dass dieses Expressionssystem größere Proteinmengen von LTP produzieren kann und keine Multimerisierung der Proteine beobachtet wurde [Diaz-Perales et al. 2002a]. Unterschiede in der IgE-Bindung oder der biologischen Aktivität zwischen rekombinant und natürlichen gereinigten Proteinen wurden für die LTPs aus Pfirsich und Apfel nicht gefunden [Diaz-Perales et al. 2002a, Diaz-Perales et al. 2003, Zuidmeer et al. 2005]. Aufgrund dieser Daten wurden die LTPs aus Kirsche, Pfirsich, Haselnuss und Salat mit Hilfe des Wildtyp-Hefestammen *P. pastoris* x-33 exprimiert.

Klonierung, Expression, Detektion und Identitätsprüfung der LTPs (*P. pastoris*)

Die Nukleotidsequenzen der LTPs aus Kirsche (Pru av 3), Pfirsich (Pru p 3), Haselnuss (Cor a 8) und Salat (Lac s 1) waren bereits bekannt und konnten nach Isolation der cDNA in den Hefeexpressionsvektor pPICZ α A eingefügt werden. Die kodierende Sequenz des Kirsch- (Acc. No. AF 221501) und Haselnuss-LTPs (Acc. No. AF 329829) lag in dem Expressionsvektor pET16b vor und wurde aus der Plasmidbank des Paul-Ehrlich-Instituts zur Verfügung gestellt, während die LTP-Sequenz von Pfirsich (Acc. No. AJ 277163) und den beiden Isoformen des Salat-LTPs (Lac s 1.1 (Acc. No. EF101532) und Lac s 1.2 (Acc. No. EF101531)) aus cDNA des jeweiligen Lebensmittels isoliert wurde.

Der pPICZ α A Vektor ermöglicht durch einen N-terminalen α -Faktor die Sezernierung des Zielproteins in den Kulturüberstand. Anschließend wurde dieser Faktor an seiner Kex2-Schnittstelle durch hefespezifische Endoproteasen abgespalten, so dass vier zusätzliche Aminosäuren (EAEA) am N-terminalen Ende des Zielproteins übrig blieben. Der Vektor ermöglicht ebenfalls die Expression eines Fusionproteins mit einem C-terminalen c-myc und His-Tag, was zu einem zusätzlichen Anteil von 43 Aminosäuren führt. Die LTPs aus Pfirsich und Haselnuss wurden zu Beginn der Arbeit als Fusionsproteine exprimiert. Aufgrund der Etablierung der Proteinexpression in einem Hefesystem lagen keine eigenen Erfahrungen über die Höhe der

Proteinausbeute vor. Der zusätzliche Tag sollte eine zuverlässige Detektion der Zielproteine gewährleisten. Nach ersten Expressionsergebnissen von Pru av 3 als Fusionsprotein wurde eine deutliche Proteinbande mittels SDS-PAGE beobachtet (Abb. 4.13), die anschließend mittels eines anti-His-Tag-Antikörpers als Zielprotein identifiziert werden konnte. Aufgrund der geringen Größe von durchschnittlich 90 Aminosäuren der LTPs könnte der C-terminale Tag mit zusätzlichen 43 Aminosäuren einen negativen Einfluss auf die Proteinfaltung und Epitopbildung besitzen. Ziel war es deshalb, die LTPs aus Pfirsich, Kirsche, Haselnuss und Salat ohne zusätzlichen Fusionsanteil in Hefen zu exprimieren.

Die pPICZ α A/LTP-Konstrukte wurden nach der Klonierung sequenziert, um sie anschließend im *P. pastoris* x-33 Genom durch homologe Rekombination zu integrieren. Anschließend besaßen die *P. pastoris* Klone durch ein Gen-Replacement der beiden Isoformen des Salat-LTPs, dem Kirsch- und Haselnuss-LTP nur noch das AOX2-Gen zur Bildung der Alkoholoxidase und gehörten somit zu den Mut^s-Phänotypen. Bei der Integration des pPICZ α A-Pru p 3-Konstrukts kam es dagegen nicht zu einer AOX1-Deletion, wodurch der Klon zu den Mut⁺-Phänotypen gehörte und im methanolhaltigem Medium schneller im Vergleich zu den Mut^s-Phänotypen wachsen konnte. Welcher Phänotyp letztendlich größere Proteinausbeuten erzielt ist für jedes Zielprotein unterschiedlich und kann nicht vorausgesagt werden. Einige Studien haben jedoch berichtet, dass ein Mut^s-Phänotyp im Vergleich zu einem entsprechenden Mut⁺-Phänotyp eine höhere Proteinausbeute lieferte [Cregg et al. 1987, Tschopp et al. 1987a, Tschopp et al. 1987b].

Durch ein N-terminales Sekretionssignal (α -Faktor) wurde das Zielprotein nach der Induktion durch Methanol in den Kulturüberstand sezerniert und konnte mit Ausnahme beider Isoformen des Salat-LTPs durch ein kreuzreaktives Kaninchen anti-Pru p 3-Serum detektiert werden. Eine die Identität bestätigende IgG-Reaktivität wurde demnach nur für die Zielproteine Pru av 3, Pru p 3 und Cor a 8 nachgewiesen. Ebenso blieb eine IgE-Reaktivität durch Verwendung eines Salatallergikerserums bei beiden Isoformen des Salat-LTPs nicht detektierbar. Die nachfolgende N-terminale Sequenzierung beider Isoformen des Salat-LTPs zeigte einen Verlust von insgesamt 23 Aminosäuren am N-Terminus (4.4.2). Bei beiden Proteinen erfolgte die Abspaltung nach einer spezifischen Aminosäureabfolge von YLRNGG↓, bei der es sich wahrscheinlich um eine hefespezifische Endoprotease-Schnittstelle handeln muss, die nicht verifiziert werden konnte. Barral et al. berichteten ebenfalls von einer N-

terminalen Abspaltung von sechs Aminosäuren des Olivenpollen Hauptallergens Ole e 10, das in *P. pastoris* KM71 exprimiert wurde [Barral et al. 2005]. Die Spaltung fand zwischen den Aminosäuren Prolin und Leucin statt und unterschied sich somit von der Schnittstelle beider Isoformen des Salat-LTPs. Der Gesamtanteil des Vollängen-Zielproteins, Ole e 10, lag lediglich bei 25%, während die restlichen 75% als gespaltenes Protein vorlagen. Eine Veränderung des pH-Wertes und die Anwendung verschiedener Anzuchtmedien zeigte keine Verbesserung der Proteinexpression. Durch den Einsatz eines Protease-defizienten Hefestamm SMD1168 konnte die N-terminale Proteolyse auf 50% des Gesamtproteinanteils reduziert werden. Eine Umklonierung beider Isoformen des Salat-LTPs in einen Protease-defizienten Hefestamm, ohne Erfolgsgarantie bezüglich einer kompletten Aufhebung der proteolytischen Aktivität, erschien zu zeitaufwendig. Es war jedoch bekannt, dass ein prokaryotisches Proteinexpressionssystem (*E. coli* BL21) für das Haselnuss-LTP Cor a 8 und das Kirsch-LTP Pru av 3 erfolgreich genutzt werden konnte [Scheurer et al. 2001a, Schocker et al. 2004]. Nachteilig bei diesem System war, wie oben bereits erwähnt, die geringere Proteinausbeute und die Multimerisierung der Zielproteine. Diese Strategie erschien jedoch erfolgsversprechender und weniger zeitaufwändiger im Vergleich zur Umklonierung der beiden Isoformen in einen Protease-defizienten Hefestamm. Zur Isolierung größerer Proteinmengen wurden dementsprechend mehrere Liter der Bakteriensuspension induziert und die gebildeten Multimere des Zielproteins anschließend entweder durch ein reduzierendes Milieu, in dem die gebildeten intermolekularen Disulfidbrückenbindungen aufgehoben werden, oder mittels chromatographischer Reinigung entfernt.

Expression von rLac s 1.1 und rLac s 1.2 in *E. coli*

Aufgrund der Probleme in dem Hefeexpressionssystem wurde die DNA beider Isoformen des Salat-LTPs in den prokaryotischen Expressionsvektor pET100/D-TOPO kloniert und in den Proteinexpressionsstamm *E. coli* BL21 eingeschleust. Dieser eukaryotische Expressionsvektor generierte ein Fusionsprotein bestehend aus dem eingefügten LTP mit einem N-terminalem Histidin-Tag, der eine Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglichte. Nach der Reinigung beider Isoformen des Salat-LTPs konnten neben dem Monomer auch Di-, Tri- und Tetramere beobachtet werden (Abb. 4.19 A). Durch die Zugabe des reduzierenden Agens DTT wurden die falsch geknüpften intermolekularen Disulfid-

brücken gelöst, wodurch das Protein anschließend als Monomer vorlag (Abb. 4.19 B). Das reduzierende Milieu beeinflusste jedoch die Fähigkeit der Proteine IgE-Antikörper zu binden (Abb. 4.20). Bei der rLac s 1.1-Isoform trat eine deutliche Reaktivität des Nicht-Allergiker Serums auf, so dass eine unspezifische Bindung der rLac s 1.1-Isoform nach Reduktion durch die zwei getesteten Salatallergikerseren nicht ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die rLac s 1.2-Isoform nach Reduktion einen Verlust der IgE-Reaktivität. Es ist wahrscheinlich, dass durch das reduzierende Milieu nicht nur die falsch geknüpften intermolekularen Disulfidbrückenbindungen gelöst wurden, sondern ebenfalls die intramolekularen Disulfidbrücken aufgehoben wurden. Diese sind für den Erhalt der Immunreaktivität der LTPs essentiell, was durch den Verlust der IgE-Reaktivität der rLac s 1.2-Isoform nach Reduktion gezeigt werden konnte (Abb. 4.20 B). Durch das Aufheben der intramolekularen Disulfidbrücken sollte grundsätzlich keine IgE-Reaktivität nachweisbar sein.

Unter nativen Bedingungen zeigte die rLac s 1.1-Isoform keinen Unterschied in der IgE-Reaktivität zwischen Monomer und Multimer (Abb. 4.20). Die beobachtete Reaktivität korreliert mit der aufgetragenen Proteinmenge der jeweiligen Multimere (Abb. 4.19). Im Gegensatz dazu zeigte das Dimer der rLac s 1.2-Isoform eine wesentlich geringere IgE-Reaktivität im Vergleich zu dem Tri- und Tetramer mit jeweils einer starken IgE-Reaktivität, obwohl alle Multimere durch eine vergleichbare Proteinmenge vertreten waren. Ähnliche Ergebnisse wurden in der eigenen Gruppe bei zwei Isoformen des Tomaten-LTPs beobachtet (Daten nicht veröffentlicht).

Die Proteinmenge von rLac s 1.1-Monomeren reichte aus, um diese Proteinbande von den Multimeren mittels chromatographischer Reinigung zu isolieren, während der Monomeranteil der rLac s 1.2-Isoform zu gering ausfiel (Abb. 4.19). Zur Steigerung der Proteinausbeute der rLac s 1.2-Isoform-Monomere, die anschließend ebenfalls mittels chromatographischer Reinigung isoliert werden sollte, wurden unterschiedliche *E. coli* Expressionsstämme und Induktionsbedingungen ausprobiert (4.2.4). Es wurden *E. coli* Origami (DE)3 pLys und *E. coli* Origami (DE)3 für die Proteinexpression verwendet. Diese Bakterienstämme ermöglichten durch Mutationen in zwei Genen, die für die Thioredoxin Reduktase und die Glutathion Reduktase kodieren, ein oxidatives Zytoplasmamilieu, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigen und die Ausbeute löslicher und aktiver disulfid-verbrückter Proteine deutlich erhöhen sollte. Das zusätzliche Lysomzymgen (Lys)

des *E. coli* Origami (DE)3 pLys-Stammes, dessen Produkt bei der Zerstörung der Zellmembran nach einer Zellyse mitwirkt, sollte die Proteinausbeute weiter erhöhen. Die Verwendung der beiden Bakterienstämme im Vergleich zu dem *E. coli* BL21 Stamm zeigte allerdings keine Verbesserung der erzielten Proteinmenge an Monomeren. Unterschiedliche Induktionsbedingungen zeigten ebenfalls keine Verbesserung der Proteininduktion.

Aufgrund der geringen Proteinmenge des Monomers und des hohen ungefalteten Proteinanteils der rLac s 1.2-Isoform wurden die Expressionsversuche eingestellt. Ein Vergleich der beiden Isoformen des Salat-LTPs konnte somit nicht stattfinden.

Das Monomer der rLac s 1.1-Isoform wurde unter reduzierenden Bedingungen gereinigt und mittels Ionen-Austausch-Chromatographie von den Multimeren getrennt. Eine Reinigung unter reduzierenden Bedingungen wurde aus dem Grund gewählt, da disulfidverbrückte Proteine, wie die LTPs, in dem bakteriellen reduzierenden Zytoplasmamilieu häufig in unlöslichen Einschlusskörperchen, so genannten „inclusion bodies“, vorliegen [Georgiou et al. 1996]. Detergenzien, wie Harnstoff, lösen die Proteine aus den „inclusion bodies“, zerstören jedoch ihre Konformation. Durch die Konformationsänderung wird der Histidin-Tag des Proteins leichter zugänglich und bewirkt eine stärkere Bindung an die Agarose. Diese Eigenschaft kann ebenfalls zur Steigerung der Proteinausbeute beitragen. Nachteilig war, dass die denaturierten Proteine ihre Aktivität verlieren und nachfolgend wieder renaturiert werden mussten, in dem der Harnstoff langsam entfernt wurde.

Die Untersuchung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie zeigte einen großen Anteil an ungefaltetem oder nicht korrekt gefaltetem Protein (Abb. 4.28). Möglicherweise ist dies eine Folge der Reinigung, bei der Harnstoff als denaturierendes Agens zugegeben wurde und eine Rückfaltung des Proteins nicht vollständig oder korrekt verlaufen ist. Unter Anwendung eines weiteren Denaturierungsschrittes durch Zugabe von DTT mit anschließender Dialyse zur Entfernung des reduzierenden Agens, folgte unter Einwirkung eines Redoxsystems (reduziertes/oxidiertes Glutathion) der Versuch eine korrekt ausgebildete Disulfidbrückenbindung zu erzielen. Bezüglich der Sekundärstruktur wurde jedoch kein verbessertes Ergebnis erreicht. Deshalb wurde für die nachfolgenden Experimente natürliches Lac s 1 aus Kopfsalat extrahiert und chromatographisch gereinigt. Das dazu eingesetzte Verfahren wurde von Pastorello et al. für das

Pfirsich-LTP Pru p 3 erfolgreich eingesetzt und mit leichten Veränderungen angewendet [Pastorello et al. 1999a].

Expression von rPru p 3 in *P. pastoris*/*E. coli*

Rekombinantes Pru p 3 zeigte im eukaryotischen Hefeexpressionssystem eine extrem niedrige Ausbeute nach der chromatographischen Reinigung (4.2.3.3). Da die beiden Elektrophoresegele des Hefekulturüberstandes nach der Proteininduktion von rPru p 3 im Vergleich zu rPru av 3 (Abb. 4.13), welches 6 mg/L Ausbeute lieferte, visuell identische Bandenintensitäten zeigten, ist ein Proteinverlust während der Aufreinigung denkbar. Bei rPru p 3 war jedoch stets eine längere Färbung des Gels notwendig, aufgrund dessen es ebenso wahrscheinlich sein könnte, dass der Mut⁺-Phänotyp des rPru p 3 Klons eine deutlich niedrigere Menge des Zielproteins rPru p 3 produzierte. Diese Vermutung korreliert mit Forschungsergebnissen anderer Gruppen [Cregg et al. 1987, Tschopp et al. 1987a, Tschopp et al. 1987b]. Die unterschiedlichen Protokolle zur Induktion der Proteinsynthese in den jeweiligen Mut-Phänotypen, sowie proteinspezifische Unterschiede bei der Expression, könnten den Unterschied in der Gesamtausbeute erklären.

Diaz-Perales et al. exprimierten rPru p 3 in dem Hefestamm *P. pastoris* GS115 [Diaz-Perales et al. 2002a]. Dieser Stamm unterscheidet sich von dem in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp durch eine Mutation im Histidinol-Dehydrogenase-Gen (*his 4*), wodurch es zu einer Hemmung der Histidin-Biosynthese kommt, so dass ein Zusatz von Histidin im Nährmedium für das Wachstum nötig ist. Die Proteininduktion wurde sogar nur 96 h anstatt wie in dieser Arbeit 120 h durchgeführt. Der Kulturüberstand wurde ebenfalls über eine zweistufige Chromatographie gereinigt. Im ersten Schritt wurde eine Gelfiltration und im zweiten eine Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Die Ausbeute des rPru p 3 betrug 20 mg/L, während die Proteinausbeute in dieser Arbeit mit 80 µg/L wesentlich niedriger lag. Hier könnten ebenfalls der Unterschied im Mut-Phänotyp (keine Angaben in der entsprechenden Publikation) der beiden *P. pastoris*-Klone, die Verwendung unterschiedlicher *Pichia*-Stämme oder andere Kultivierungsbedingungen eine wichtige Rolle bei der extrem großen Differenz der Proteinausbeute gespielt haben.

Aufgrund der niedrigen Proteinausbeute des Pfirsich-LTPs wurde Pru p 3 ebenfalls in einem prokaryotischen Expressionssystem (*E. coli* BL21) exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt (4.2.5). Es war bekannt, dass dieses

prokaryotische Standardsystem in der Regel 1-2 mg an Proteinausbeute der LTPs pro Liter Bakteriensuspension lieferte [Scheurer et al. 2001a, Schocker et al. 2004]. Eine Sekundärstrukturanalyse ergab ebenfalls wie für rLac s 1.1 (*E. coli*) die Präsenz von ungefaltetem oder nicht korrekt gefaltetem Protein (Abb. 4.28).

Nach Erhalt dieser Daten wurde das natürliche Pfirsich-LTP aus Pfirsichschalen extrahiert und chromatographisch gereinigt. Hierfür wurde, wie zur Isolierung des natürlichen Salat-LTPs, das von Pastorello et al. beschriebene Verfahren mit leichten Modifikationen angewendet [Pastorello et al. 1999a].

Extraktion von nPru p 3 und nLac s 1

Die Reinigung von natürlichem Pru p 3 aus Pfirsich [Pastorello et al. 1999a] wurde in dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich mit leichten Veränderungen angewendet, um große Mengen LTP aus Pfirsich und Salat zu isolieren. Aufgrund eines bis zu siebenfach höheren LTP-Gehalts in der Pfirsichschale im Vergleich zum Fruchtfleisch [Carnes et al. 2002, Borges et al. 2006], wurde zur Extraktgewinnung lediglich die Fruchtschale des Pfirsichs verwendet.

Reinigung der LTPs

Letztendlich konnten in *P. pastoris* ausschließlich rPru av 3 und rCor a 8 überexprimiert und chromatographisch gereinigt werden. Natürliches Lac s 1 und nPru p 3 wurden aus dem jeweiligen Lebensmittelextrakt, Kopfsalat und Pfirsichschalen, isoliert und chromatographisch gereinigt. Die Reinigung erfolgte jeweils in zwei Schritten. Zuerst wurden die LTPs aus dem Extrakt bzw. Kulturüberstand, der neben dem LTP auch viele Fremdproteine enthielt, mittels Kationenaustausch-Chromatographie gereinigt. Restliche Fremdproteine wurden anschließend mittels Größenausschluß-Chromatographie (Gelfiltration) entfernt.

Ausbeute der gereinigten LTPs

Rekombinantes Pru av 3 und rCor a 8 wurden beide durch Expression im Hefesystem gewonnen. Dabei ergab sich eine finale Ausbeute von 4,3 mg (rCor a 8) und 6 mg (rPru av 3) pro Liter Hefekulturüberstand (Tab. 4.1). Veröffentlichte vergleichbare Ausbeuten von rPru av 3 oder rCor a 8 exprimiert in *P. pastoris* liegen zur Zeit nicht vor. Im Vergleich zu dem prokaryotischen Expressionssystem mit *E. coli* BL21 wurde durch die Expression in *P. pastoris*, neben der weitaus besseren

Proteinqualität, ebenfalls eine Steigerung der Proteinausbeute für rPru av 3 von 2-3 mg/L (*E. coli*) auf 6 mg/L (*P. pastoris*) und für rCor a 8 von 1,5 mg/L (*E. coli*) auf 4,3 mg/L (*P. pastoris*) erzielt [Scheurer et al. 1997, Schocker et al. 2004]. nPru p 3 wurde aufgrund des höheren LTP-Gehalts in der Fruchtschale aus der Schale von 1,5-2 kg Pfirsichen (ca. 400 g Schale) isoliert. Nach dreimaliger Durchführung der Reinigung konnten 5 mg, 7 mg und 12,5 mg gereinigtes nPru p 3 gewonnen werden (Tab. 4.1). Pastorello et al. isolierten durch eine identische Aufreinigungsstrategie nur 1,5 mg pro 300 g Pfirsichschalen [Pastorello et al. 1999a]. Der Unterschied in der Proteinausbeute könnte auf der Verwendung einer anderen Pfirsichvarietät, die einen geringeren LTP-Gehalt aufwies, beruhen. Brenna et al. zeigten zum Beispiel deutliche Unterschiede im LTP-Gehalt unterschiedlicher Pfirsichvarietäten in Abhängigkeit ihres Reifegrads [Brenna et al. 2004]. Von vier unterschiedlichen Varietäten zeigten zwei im reifen Zustand einen hohen LTP-Gehalt, während die beiden anderen Varietäten einen höheren LTP-Gehalt im unreifen Stadium aufwiesen. Aus 680 g Kopfsalatblättern wurden in zwei Aufreinigungsverfahren jeweils 2 mg nLac s 1 isoliert (Tab. 4.1). Diese geringe Ausbeute in Bezug auf die Ausgangsmenge von 680 g Salatblättern kann durch den hohen Wassergehalt des Salats erklärt werden.

Reinheit der LTPs und Auftrennung mittels SDS-PAGE

Mittels zweistufiger Chromatographie (3.3.2.1 und 3.3.2.2) konnte das natürliche Pfirsich-LTP, das natürliche Salat-LTP, das rekombinante Haselnuss-LTP und das rekombinante Kirsch-LTP mit einer visuell abgeschätzten Reinheit von über 95% isoliert werden (Abb. 4.25). Obwohl die gereinigten LTPs rPru av 3 (*P. pastoris*), rCor a 8 (*P. pastoris*), nPru p 3 und nLac s 1 nahezu die gleiche Anzahl an Aminosäuren (91-93) aufweisen, zeigt nLac s 1 nach einer Auftrennung mittels SDS-PAGE eine niedrigere molekulare Masse von ca. 8 kDa, während rPru av 3, rCor a 8 und nPru p 3 bei einer molekularen Masse von ca. 10 kDa detektiert wurden (Abb. 4.25). Proteine sollten zwar aufgrund ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt werden, können dieses jedoch schneller durchwandern je negativer ihre Ladung ist. Die SDS-Anionen binden an die Proteinhauptkette, wodurch ein Komplex aus denaturiertem Protein und SDS-Molekülen entsteht. Aufgrund der negativ geladenen Sulfatgruppen der SDS-Moleküle sollte die ursprüngliche Ladung der Proteine vernachlässigbar sein, wodurch diese über ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis vergleichbar sein sollten. Das unterschiedliche Laufverhalten der LTPs,

die noch intakte Disulfidbrückenbindungen enthielten, kann durch die unterschiedliche Beladung der Proteine mit SDS-Anionen erklärt werden. Eine posttranslationale Modifikation der Proteine konnte durch eine Bestimmung der Molmasse mittels nano ESI-MS ausgeschlossen werden. Scheurer et al. fanden ebenfalls Unterschiede im Migrationsverhalten bei der Auftrennung von Profilinen aus der Birne, Kirsche und Sellerie [Scheurer et al. 2001b]. Das rekombinante Sellerieprofilin Api g 4 zeigte im Vergleich zu den beiden anderen Profilinen, rPyr c 4 aus der Birne und rPru av 4 aus der Kirsche, ein anderes Laufverhalten mittels SDS-PAGE, obwohl eine ähnliche Anzahl von Aminosäuren (131-134) vorhanden und die theoretische Molmasse mit 14,4-14,7 kDa sehr ähnlich waren.

5.6 Biochemische Charakterisierung der LTPs

Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten oder aus Lebensmittel isolierten Allergene, die für weitere Analysen eingesetzt wurden, wurden auf ihre Fähigkeit IgE zu binden untersucht. Die IgE-Reaktivität scheint von einer intakten Proteinkonformation abzuhängen. Dies weist auf Konformationsepitope hin [Bonura et al. 2001]. Das konnte auch in dieser Arbeit durch den Verlust der IgE-Reaktivität beider Isoformen des Salat-LTPs (4.2.2), die rekombinant in *P. pastoris* hergestellt wurden, bestätigt werden. Beide Isoformen wiesen nach proteolytischer Spaltung den Verlust von zwei Cysteinen an der Position 4 und 14 auf, die für die Ausbildung von zwei Disulfidbrückenbindungen verantwortlich sind. Als Folge dessen wurde die korrekte Konformation zerstört und es konnte keine IgE-Reaktivität mehr nachgewiesen werden. Somit scheint auch bei den Lebensmittel-LTPs die IgE-Reaktivität von einer intakten Konformation der allergenen Proteine abzuhängen.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen erklärte Pastorello et al. die beobachtete starke IgE-Reaktivität des durch Hitze denaturierten Mais-LTPs aufgrund linearer Epitope [Pastorello et al. 2003b]. Garcia-Casado et al. beschrieben nach einer Untersuchung mit synthetischen Peptiden drei lineare Epitope für das Pflirsich-LTP Pru p 3 [Garcia-Casado et al. 2003]. Der Nachweis von linearen Epitopen bei Pru av 3 konnte in der eigenen Gruppe nicht reproduziert werden (Daten nicht veröffentlicht). Vermutlich handelt es sich bei den Ergebnissen von Garcia-Casado et al. um unspezifische Bindungen, aufgrund dessen lineare Epitope von Pru p 3 postuliert wurden. Adäquate Negativkontrollen wurden in dieser Arbeit nicht

durchgeführt. Entsprechende Kontrollen bei der Untersuchung der Epitope von Pru av 3 belegten diese Vermutung (Daten nicht veröffentlicht).

Alle isolierten LTPs, die für weitere Analysen eingesetzt wurden, zeigten bei einer Testung mit Allergikerserum eine deutliche IgE-Reaktivität (Abb. 4.29). Das verwendete Serum wurde aufgrund der hohen Konzentrationen an spezifischem IgE gegen die jeweiligen LTPs ausgewählt.

Zur weiteren Strukturuntersuchung wurden die Allergene einer massenspektrometrischen Analyse, N-terminaler Sequenzierung und CD-Spektroskopie unterzogen. Mit massenspektrometrischen Methoden wird unter anderem die Identität von Proteinen bestimmt. Natürliches Pru p 3, nLac s 1, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*) wurden mittels nano ESI-MS Spektrometrie auf ihre Proteinmasse untersucht (4.4.1). Die in *P. pastoris* exprimierten Proteine rPru av 3 und rCor a 8 zeigten eine nahezu identische molekulare Masse mit dem errechneten theoretischen Wert. Für beide Proteine wurde die Abspaltung des α -Faktors, der für die Proteinsekretion in den Kulturüberstand verantwortlich ist, an der Kex2-Signalschnittstelle bestätigt. Der zusätzliche N-terminale Anhang von vier Aminosäuren (EAEA), nach einer korrekten Abspaltung, wurde bei der Berechnung des theoretischen Werts berücksichtigt.

Des Weiteren wurden anhand der Massenbestimmungen Proteinmodifikationen, wie N- und O-Glykosylierungen, Proteinverkürzungen durch endogene Proteolyse während der Expression oder Phosphorylierungen, ausgeschlossen. N-Glykosylierungen treten an der Aminosäureabfolge N-X-[S/T] auf, während O-Glykosylierungen sowohl an S oder T häufiger auftreten können. Die untersuchten Allergene wiesen jedoch keine potenziellen N-Glykosylierungstellen auf, während O-Glykosylierungen durch die Proteinmassenbestimmung ausgeschlossen wurden.

Des Weiteren können bei der Expression von Proteinen in Hefen auch Disulfidbrücken gebildet werden. Die genaue Zahl der ausgebildeten Disulfidbrückenbindungen konnte jedoch nicht bestimmt werden. Während aufgrund des Abspaltens von 2 Wasserstoffatomen je Disulfidbindung die Gesamtmasse um je 2 Dalton reduziert wird, führt zum Beispiel eine Deamidierung von Asparagin zu einer Zunahme der Masse um 1 Dalton. Eine experimentelle Masse von rPru av 3 die um annähernd 4 Dalton niedriger ist als die theoretisch zu erwartende, lässt daher nicht eindeutig auf 2 Disulfidbrücken schließen. Dass das theoretische und experimentell

ermittelte Molekulargewicht von rCor a 8 nahezu identisch ist, lässt allerdings ebenso wenig auf die Abwesenheit von Disulfidbrücken schließen.

Die Molekulargewichte von gereinigten natürlichen Proteinen können nur einen Hinweis auf deren korrekte Identität geben. Es kann hier anders als bei rekombinant exprimierten Proteinen keine theoretische Masse von einer definierten Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Die Proteine aus den nLac s 1- und nPru p 3-Präparationen besitzen ein Molekulargewichte wie sie für LTPs zu erwarten sind. Das Vorkommen von Isoformen des Pfirsich-LTPs Pru p 3 in der untersuchten Präparation konnte aufgrund des detektierten homogenen Peaks ausgeschlossen werden. Die Präparation des LTPs aus Salat enthält jedoch sehr wahrscheinlich 4 Lac s 1 Isoformen.

Durch die N-terminale Sequenzierung wurde die Identität der Allergene zusätzlich abgesichert (4.4.2). Diese Methode konnte jedoch nur bei rPru av 3 (*P. pastoris*) erfolgreich angewendet werden, während keine auswertbaren Daten für nPru p 3, rCor a 8 (*P. pastoris*) und nLac s 1 erhalten werden konnten. Weshalb die Sequenzierung fehl schlug konnte nicht nachvollzogen werden. Die korrekte Abspaltung des α -Faktors bei rPru av 3 wurde mittels dieser Methode ebenfalls durch die Detektion des N-terminalen Anhangs der vier zusätzlichen Aminosäuren (EAEA) bestätigt.

Natürliches Pru p 3, nLac s 1, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*) zeigten eine intakte α -helikale Sekundärstruktur, die mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Abb. 4.26). Aus den charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm konnte geschlossen werden, dass die vier untersuchten Proteine eine α -helikale Sekundärstruktur aufwiesen. Es traten keine Abweichungen der CD-Spektren auf, die auf ungefaltetes Material hinweisen würden.

5.6.1 Untersuchung der Qualität von Hauttest-Lösungen hinsichtlich des Allergengehaltes

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils drei kommerziell erhältliche Skin-Prick-Test-Lösungen von Kirsch- und Pfirsichextrakten qualitativ auf ihren Allergengehalt untersucht (4.4.4). Zwei der drei Pfirsichextrakte (Abb. 4.27, D und F) zeigten nach der Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und Silberfärbung eine geringe Qualität. Unter Verwendung eines Patientenserums, das spezifisches IgE gegen das Pfirsich- und Kirsch-LTP, sowie gegen das Bet v 1-homologe Allergen aus beiden Früchten enthielt, konnte mittels Immunoblot bei keinem der sechs Extrakte das Bet v 1-

homologe Allergene der Kirsche (Pru av 1) oder des Pfirsichs nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte an dem rasanten Proteinabbau der wenig stabilen Birkenpollen-homologen Allergene durch die Polyphenoloxidase erklärt werden [Gruber et al. 2004]. Die Polyphenoloxidase ist für die enzymatische Bräunungsreaktion verantwortlich und katalysiert die Hydroxylierung von Phenolen, die reaktivsten Inhaltsstoffe der Pflanzen, zu Katecholen und deren Dehydratation zu sehr reaktiven *ortho*-Chinonen, welche mit der Aminogruppe (NH₂-R) von Proteinen reagieren und diese dadurch irreversibel zerstören.

Aufgrund der hohen Stabilität der LTPs [Asero et al. 2000, Duffort et al. 2002, Scheurer et al. 2004] konnten diese Allergene in allen SPT-Lösungen der Kirsche (Pru av 3) und des Pfirsichs (Pru p 3) detektiert werden (Abb. 4.27 B). Lediglich in einer Lösung eines Kirschextrakts wurde eine deutlich schwächere IgE-reaktive Bande beobachtet (Abb. 4.27 B, Spur B). Diese Beobachtung könnte sich eventuell durch unterschiedliche Extraktionsbedingungen erklären lassen, die jedoch vom Hersteller nicht angegeben wurden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Extraktionspuffern bei der Isolierung von LTP aus Salatextrakt unter Verwendung eines Kalium-Phosphatpuffers pH 7,0 im Vergleich zu einem PBS-Puffer pH 7,4, der ein wesentlich besseres Resultat lieferte, untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung zeigte, dass die Extraktionsbedingungen, insbesondere der Extraktionspuffer, eine entscheidende Rolle bei der Isolierung von LTPs spielen. Akkerdaas et al. publizierten ähnliche Befunde bei der qualitativen Untersuchung von Haselnuss-SPT-Lösungen [Akkerdaas et al. 2003].

Die Untersuchungen zur Extraktqualität verdeutlichen, dass eine allgemeine Nutzung einer optimierten Extrakterstellung wünschenswert wäre, um eine optimale Isolierung aller Allergene zu gewährleisten. Durch den Einsatz von SPT-Lösungen von geringer Qualität, die nicht alle Hauptallergene enthalten, könnten falsch negative Resultate die Diagnose verfälschen.

5.6.2 Strukturuntersuchungen nach Hitzeinwirkung

Neben der hohen Stabilität der LTPs gegenüber Proteasen weisen diese Allergene zusätzlich eine hohe Resistenz gegenüber Hitzeinwirkung auf. Diese Eigenschaft begünstigt das Vorkommen von intakten Allergenen in prozessierten Lebensmitteln, die trotz thermischer Behandlungen starke allergische Reaktionen auslösen können.

Natürliches Pru p 3 zeigte bei einer Temperatur von 90 °C eine hohe Stabilität und nur einen geringen Proteinanteil, der keine intakte Sekundärstruktur aufwies (Abb. 4.28). Eine Messung der Sekundärstruktur nach einer Abkühlung des Proteinmaterials auf 20 °C zeigte keine größeren Veränderungen des CD-Spektrums im Vergleich zu der Messung bei 90 °C. Sancho et al. zeigten ähnliche Ergebnisse bei der Erhitzung von nMal d 3, welches nach einer Hitzeeinwirkung von 90 °C und einer nachfolgenden Abkühlung auf 20 °C vollständig in einer intakten Sekundärstruktur vorlag [Sancho et al. 2005]. Das CD-Spektrum bei 90 °C zeigte jedoch einen deutlichen Verlust der Sekundärstruktur, die nach einer Temperaturreduzierung auf 20 °C reversibel war. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte für das rekombinante Kirsch-LTP und für das natürliche Mais-LTP keine reversible Rückfaltung nach einer Erhitzung auf 100 °C detektiert werden [Pastorello et al. 2003b, Scheurer et al. 2004]. Ein Charakteristikum der LTP-Familie ist die hohe Anzahl der Disulfidbrückenbindungen, die für die Stabilität der Sekundärstruktur verantwortlich sind. Natürliches Pru p 3 und nMal d 3 wurden direkt aus dem Lebensmittel extrahiert und mittels nativer Aufreinigungsstrategie isoliert. Aufgrund dieser Behandlung lagen die Disulfidbrückenbindungen intakt vor und konnten die Proteine während der Hitzeeinwirkung vor einer irreversiblen Denaturierung schützen. Eine irreversible Zerstörung des natürlichen Mais-LTPs könnte darauf beruhen, dass die Hitzeeinwirkung von 100 °C eine stärkere Zerstörung verursachte als die Behandlung bei 90 °C (nPru p 3) oder 95 °C (nMal d 3). Weiterhin könnten die Bedingungen und der Zeitraum der Erhitzung eine Rolle gespielt haben [Pastorello et al. 2003b]. Ein Einfluss des pH-Werts der verwendeten Puffer konnte ausgeschlossen werden, da dieser bei allen Untersuchungen in einem ähnlichen Bereich von 7,0-7,8 lag. Das natürliche Mais-LTP wurde jedoch nicht wie nPru p 3 oder nMal d 3 mit einer Steigerung von 1 °C pro Minute, sondern unkontrolliert in einem Kochverfahren für 160 min auf 100 °C erhitzt. Dadurch war das Mais-LTP einem wesentlich längeren Zeitraum der Hitze ausgesetzt, wodurch eine irreversible Zerstörung der Sekundärstruktur im Vergleich zu nPru p 3 und nMal d 3 erklärbar wäre. Scheurer et al. verwendeten für die Studie rekombinant hergestelltes Pru av 3, welches in *E. coli* BL21 (DE)3 exprimiert wurde. Im bakteriellen reduzierenden Zytoplasma ist eine korrekte Ausbildung der Disulfidbrückenbindungen nicht gewährleistet, wodurch sich die Stabilität des Proteins verringern kann. Dadurch könnte die irreversible Zerstörung der Sekundärstruktur nach der Erhitzung erklärt werden.

5.7 Immunologische Charakterisierung der Allergene

Die Allergenität der gereinigten LTPs (nPrü p 3, nLac s 1, rPrü av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*)) wurde mittels Immunoblot, EAST, ImmunoCAP-FEIA, ELISA-Inhibitionsexperimenten und im zellulären Mediatorfreisetzungstest untersucht.

5.7.1 Bestimmung der IgE-Reaktivität und der spezifischen IgE-Konzentration

Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass alle gereinigten LTPs die Fähigkeit besitzen spezifisches IgE von Allergikern zu binden (Abb. 4.29). Mit Hilfe eines EAST wurde das allergenspezifische IgE in Patientensera quantitativ bestimmt. Zunächst wurde diese Methode bei einem Teil der spanischen Pfirsich- (n=27) und Haselnussallergikern (n=20) zur Bestimmung der Konzentration des spezifischen IgEs gegen nPrü p 3 und rCor a 8 (*P. pastoris*) angewendet. Für Cor a 8 konnte jedoch nur bei 40% (8/20) der haselnuss-allergischen Patienten spezifisches IgE detektiert werden. Schocker et al. beschrieben Cor a 8 hingegen als ein Hauptallergen der Haselnuss im mediterranen Raum [Schocker et al. 2004]. Für diese Untersuchungen wurde gezielt eine Haselnussallergikergruppe (n=26) rekrutiert, deren spezifisches IgE unter Verwendung der gleichen Methode mit nahezu identischer Durchführung, bestimmt wurde. Lediglich die gekoppelte Proteinmenge an die Bromcyan aktivierten Filterpapierscheiben lag 0,2 µg pro Scheibe niedriger als in dieser Arbeit. Die höhere Sensitivität des Tests könnte eventuell durch qualitative Unterschiede der Bromcyan aktivierten Filterpapierscheiben erklärt werden.

Eine Untersuchung des spezifischen IgEs mittels experimenteller ImmunoCAPs (rCor a 8, *E. coli*) zeigte eine IgE-Sensibilisierung gegen rCor a 8 von 90% (18/20) der Haselnussallergiker und ergab somit eine erheblich höhere Sensitivität als der EAST. Pastorello et al. beschrieben Prü p 3 ebenfalls als ein Hauptallergen des Pfirsichs im mediterranen Raum [Pastorello et al. 1999a]. Alle in dieser Studie untersuchten Pfirsichallergiker (n=15) hatten spezifisches IgE gegen Pfirsich, welches mittels ImmunoCAP-FEIA quantitativ bestimmt wurde.

Die gefundene Häufigkeit der IgE-Bindung der Pfirsichallergiker aus der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls von 48% (13/27) mittels EAST auf 96% (26/27) mittels ImmunoCAP-FEIA (rPrü p 3, *E. coli*) deutlich gesteigert (4.5.2.1). Die wesentlich höhere Sensitivität des ImmunoCAP-FEIA Testsystems lässt sich aufgrund der höheren allergenbindenden Kapazität erklären. Der Hersteller gibt an, dass durch die

hohe gekoppelte Antigenmenge niedrigaffine IgE-Antikörper gut detektiert werden können. Weiterhin wird die Sensitivität durch eine Fluoreszenzmessung gesteigert. Nach Erhalt dieser Daten wurde das spezifische IgE der gesamten 51 spanischen Lebensmittelallergiker mittels experimentellem ImmunoCAP-FEIA (nPru p 3, rCor a 8 (*P. pastoris*), rPru av 3 (*P. pastoris*) und nLac s 1) quantitativ bestimmt (4.5.2.2).

Die spanischen Lebensmittelallergiker, die hinsichtlich der zu untersuchenden Allergien gezielt rekrutiert wurden, wurden aufgrund ihrer Allergie in Gruppen (Pfirsich-, Salat-, Haselnuss- und Kirschallergiker) eingeteilt (Abb. 4.30). Mit 82% war die Gruppe der Pfirsichallergiker im Gegensatz zu den restlichen Lebensmittelallergikergruppen (Salat: 57%, Haselnuss: 52% und Kirsche: 44%) stark repräsentiert. Es ist bekannt, dass Allergiker im mediterranen Raum hauptsächlich unter einer Pfirsichallergie leiden [Pastorello et al. 1998]. Diese Dominanz der Pfirsichallergiker läßt eine primäre Sensibilisierung durch das Allergen Pru p 3 vermuten.

Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde das jeweilige LTP als Hauptallergen detektiert (Abb. 4.30). Lac s 1 zeigte die höchste IgE-Prävalenz von 93%. Eine Pru p 3 Sensibilisierung wurde bei 90%, Cor a 8 bei 88% und Pru av 3 bei 85% nachgewiesen.

5.7.2 Bestimmung der IgE-Bindekapazität von Pru p 3 im Vergleich zu Lac s 1, Pru av 3 und Cor a 8

Anhand der ImmunoCAP-FEIA Daten konnte die IgE-Bindekapazität der einzelnen LTPs ermittelt werden (4.5.2.3). Die Bindekapazität der LTPs Cor a 8, Pru av 3 und Lac s 1 wurde mit der von Pru p 3 verglichen, da eine Pfirsichallergie zu den häufigsten Nahrungsmittelallergien im mediterranen Raum zählt und Pru p 3 offensichtlich das klinisch relevanteste LTP darstellt.

Das Salat-LTP Lac s 1 zeigte in einigen Fällen eine stärkere IgE-Bindung im Vergleich zu Pru p 3 und umgekehrt (Abb. 4.32 A). Bei 8/45 untersuchten Patienten, die entweder eine Pfirsich- und/oder Salatallergie hatten und eine Sensibilisierung gegen Pru p 3 zeigten, konnte keine IgE-Bindung gegen Lac s 1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu existierte in dieser Gruppe nur ein Patient (MRO 7528, siehe Tab. 9.1.1), der eine IgE-Bindung gegen Lac s 1 ohne Sensibilisierung gegen Pru p 3 zeigte. Mit Ausnahme dieses Patienten war eine Lac s 1-Sensibilisierung immer mit einer gegen Pru p 3 assoziiert. In der Patientengruppe von Pfirsich- und/oder Kirschallergikern (Abb. 4.32 B) zeigten Pru p 3 und Pru av 3 nahezu identische IgE-

Bindekapazitäten, was durch die hohe Sequenzidentität beider LTPs von 87% sowie der hohen taxonomischen Verwandtschaft der Pflanzen erklärbar ist [Scheurer et al. 2001a]. Alle Haselnussallergiker mit einer Sensibilisierung gegen Cor a 8 zeigten hingegen mit Ausnahme eines Patienten (MLR 10560, siehe Tab. 9.1.1) eine stärkere IgE-Bindung an das Pfirsich-LTP Pru p 3 (Abb. 4.32 C). Kein Patient war gegen Cor a 8 sensibilisiert ohne gleichzeitig IgE gegen Pru p 3 aufzuweisen. Offensichtlich ist eine Sensibilisierung gegen Cor a 8 von einer Sensibilisierung gegen Pru p 3 abhängig.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich nur in Einzelfällen um Spezies-spezifische Epitope handelt und dass eine IgE-Reaktivität gegen LTPs, die nicht der Familie der Rosengewächse angehören, in seltenen Fällen ohne eine begleitende Pru p 3-Sensibilisierung auftreten.

Auffällig war, dass bei allen untersuchten Patientengruppen, die ausschließlich klinische Symptomatiken gegen ein Lebensmittel besaßen, eine Co-Sensibilisierung gegen andere Lebensmittel-LTPs gefunden wurde. Wie bei anderen Nahrungsmittelallergien ist auch eine LTP-Sensibilisierung kein zuverlässiger prädiktiver Marker für die klinische Manifestation einer entsprechenden Nahrungsmittelallergie. Weiterhin lässt diese Beobachtung eine Kreuzreaktion der LTPs untereinander vermuten. In der Gruppe der Pfirsichallergiker ohne begleitende Salat-, Kirsch- oder Haselnussallergie zeigten die Mehrzahl der Patienten eine Co-Sensibilisierung auf Lac s 1, Pru av 3 oder Cor a 8 (Abb. 4.32 A-C, 2). Diese IgE-Reaktivitäten könnten in Folge einer Pru p 3-Sensibilisierung aufgetreten sein. Pastorello et al. berichteten von ähnlichen Beobachtungen in Bezug auf eine Beifußpollen-Sensibilisierung als Folge einer Pru p 3-Sensibilisierung [Pastorello et al. 2002]. Die Beobachtung der geringen Gruppengröße von Salat-, Kirsch- und Haselnussallergikern ohne begleitende Pfirsichallergie unterstreicht die bedeutende Rolle der Pfirsichallergie hinsichtlich der Sensibilisierung gegen LTPs.

5.7.3 Untersuchung zur biologischen Potenz der LTPs

Bei dem verwendeten Testverfahren wurden passiv sensibilisierte basophile Granulozyten mit verschiedenen Konzentrationen der LTPs stimuliert. Im Anschluss daran wurde die resultierende dosisabhängige Freisetzung von Histamin ermittelt, die über die Stärke der allergischen Reaktion Auskunft gibt. Ausschlaggebend für die

biologische Potenz eines Allergens sind zwei voneinander unabhängige Parameter. Dies ist zum einen die basophile Reaktivität, die durch die maximale Freisetzung der Mediatoren bestimmt wird, und die basophile Sensitivität, die durch die Konzentration des Allergens mit der eine deutliche Freisetzung (halbmaximale Freisetzung, HR₅₀-Wert) bewirkt wird, bestimmt wird.

Die hergestellten Allergene nPru p 3, nLac s 1, rPru av 3 (*P. pastoris*) und rCor a 8 (*P. pastoris*) besaßen die Fähigkeit bei passiv sensibilisierten basophilen Granulozyten durch Kreuzvernetzung von membrangebundenem IgE eine Histaminfreisetzung zu induzieren (4.5.5). Diese Fähigkeit legt nahe, dass die Proteine eine Auslösung von Symptomen einer Typ I-Allergie bewirken können.

Bei den vier im Histaminfreisetzungstest eingesetzten Patientenseren MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799 (Abb. 4.38) wurde vorher mittels ImmunoCAP-FEIA eine Sensibilisierung gegen nLac s 1, nPru p 3, rPru av 3 und rCor a 8 nachgewiesen (Tab. 9.1.1). Lediglich bei dem Serum MNF 11539 korrelierte eine Pru av 3-Sensibilisierung ebenfalls mit einer klinischen Symptomatik. Bei den Patienten MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799 lagen keine klinischen Symptome einer Kirschallergie vor, obwohl eine Sensibilisierung gegen das Kirsch-LTP nachgewiesen wurde. Patienten können eine Sensibilisierung ohne klinische Symptomatik aufweisen, die dadurch zustande kommt, dass das Allergen nur über ein Epitop verfügt bzw. das spezifische IgE nur ein Epitop erkennt und somit keine Kreuzvernetzung der membranständigen Antikörper und eine damit verbundene Histaminfreisetzung induziert werden kann. Rekombinantes Pru av 3 war jedoch bei allen vier Patienten in der Lage eine starke Histaminfreisetzung zu induzieren. Dies bedeutet, dass mehr als ein Epitop erkannt wurde. Eine Aussage über die klinische Relevanz dieses Allergens bleibt somit schwer zu treffen, da aufgrund einer positiven Reaktion im Mediatorfreisetzungstest ohne vorliegende Symptome des Patienten keine eindeutigen Rückschlüsse auf die klinische Relevanz gezogen werden können. Dieses Phänomen ist bis heute noch unerklärbar und wurde auch in einer anderen Studie beobachtet, die von positiven Hauttestungen ohne klinische Symptome der Patienten berichtete [Ballmer-Weber et al. 2002].

Natürliches Pru p 3 und rPru av 3 zeigten bei vier Patienten (MNF 11539, MSCH 7443, SGR 7268 und SSG 7799) die stärkste basophile Reaktivität (maximale Freisetzung) und Sensitivität (halbmaximale Freisetzung) (Abb. 4.36). Die restlichen Allergene rCor a 8 und nLac s 1 zeigten nur eine geringe Induktion der

Histaminfreisetzung. Eine halbmaximale Histaminfreisetzung konnte teilweise aufgrund der niedrigen Induktion nicht bestimmt werden.

Interessanterweise bewirkte lediglich nLac s 1 bei dem Salatallergiker LMC 11362 ohne Pfirsichallergie eine starke maximale Histaminfreisetzung (Abb. 4.38). Natürliches Pru p 3 hingegen zeigte eine vergleichsweise extrem schwache maximale Freisetzung, obwohl eine hohe spezifische IgE-Konzentration von 60,4 KU/ml vorlag. Natürliches Lac s 1 bewirkte mit einer vergleichbar hohen IgE-Konzentration von 66,4 KU/ml eine deutlich höhere Histaminfreisetzung. Obwohl nPru p 3 mit einer niedrigeren Allergenkonzentration die halbmaximale Freisetzung erreicht, zeigt die vorherige Beobachtung, dass Pru p 3 bei Patienten ohne klinische Symptomatik gegen das Allergen nicht zwangsläufig die stärkste biologische Potenz besitzen muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pru p 3 und Pru av 3, mit einer Ausnahme, die stärkste biologische Potenz gezeigt haben. Ebenso ließ sich erkennen, dass die biologische Potenz der Lebensmittel LTPs sehr unterschiedlich sein kann.

Weiterhin war auffällig, dass die gemessene spezifische IgE-Konzentration gegen die untersuchten Allergene, wie nLac s 1 und nPru p 3, nicht unbedingt mit der Höhe der gemessenen Histaminfreisetzung korrelierte. Ebenso korrelierten leichte Symptome nicht mit einer geringen biologischen Potenz der Allergene und umgekehrt. Auffällig war diese Beobachtung bei rCor a 8, welches bei einer geringen IgE-Bindekapazität und schwacher biologischer Potenz in der Lage war schwere lebensbedrohliche Symptome auszulösen. Möglicherweise wird die Freisetzung der Mediatoren bei Haselnussallergikern durch einen geringeren Stimulus induziert. Eine weitere Erklärung wäre eine größere Anzahl an membrangebundenen IgE-Molekülen auf der Oberfläche der Mastzellen, wodurch eine stärkere Reaktion der Zelle hervorgerufen werden könnte. Um dieses Phänomen zu untersuchen, müssten intakte Mastzellen eines Haselnussallergikers isoliert und mit den in dieser Arbeit eingesetzten Allergenmengen stimuliert werden, um die freigesetzte Histaminmenge zu bestimmen und vergleichen zu können.

Um eine generelle Aussage zur Korrelation der biologischen Potenz mit den aufgetretenen Symptomen zu treffen, müsste eine größere Gruppe von Patienten untersucht werden.

5.7.4 Kreuzreaktivitäten LTP-spezifischer IgE- und IgG-Antikörper

Kreuzreaktivitäten von humanen IgE-Antikörpern

Zu Beginn dieser Arbeit war keine quantitative Analyse der Antikörper-Kreuzreaktivitäten von gereinigten LTPs beschrieben. Humane Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern wurden zumeist ohne eine Untersuchung der Dosisabhängigkeit lediglich mittels Immunoblot-Inhibition ermittelt, wodurch keine quantitative Aussage über die Stärke der Inhibition getroffen werden konnte [Asero 1999, Asero et al. 2000, Pastorello et al. 2000b, Asero et al. 2002, Pastorello et al. 2003a, Pastorello et al. 2004a]. Die Untersuchungen wurden mit Extrakten an der Festphase und Inhibition mit gereinigtem Protein durchgeführt oder umgekehrt. Die humoralen Kreuzreaktivitäten wurden in dieser Arbeit mittels ELISA-Inhibitionsexperimenten quantitativ ermittelt (4.5.3).

Kreuzreaktivitäten von humanen IgE-Antikörpern mittels Inhibitions-ELISA

Rekombinantes Pru av 3 und nPru p 3 zeigten nahezu identische immunologische Eigenschaften, die durch eine hohe Sequenzidentität von 85% und der hohen taxonomischen Verwandtschaft beider Pflanzen erklärt werden können (Abb. 4.33). Im Gegensatz dazu konnten rCor a 8 (Abb. 4.34) und nLac s 1 (Abb. 4.35) lediglich eine partielle Inhibition der IgE-Bindung an nPru p 3 bewirken (max. 60%), während nPru p 3 hingegen eine komplette Inhibition der IgE-Bindung an rCor a 8 und nLac s 1 erreichte. Natürliches Pru p 3 besitzt demnach die komplette Anzahl der Cor a 8 und Lac s 1 IgE-bindenden Epitope, während Cor a 8 und Lac s 1 nicht alle IgE-reaktiven Epitope von Pru p 3 aufwiesen. Andererseits könnte die Affinität der Pru p 3-Epitope IgE zu binden, bei identischer Epitopenanzahl der Allergene, wesentlich höher im Vergleich zu Cor a 8 oder Lac s 1 sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pru p 3 bezüglich der Kreuzreaktivität eine hohe Relevanz besitzt.

Ähnliche Kreuzreaktionen wurden durch Versuche von anderen Forschungsgruppen zwischen Pru p 3 und dem Orangen- (*Citrus sinensis*)-LTP Cit s 3, Zitronen- (*Citrus limon*)-LTP Cit l 3 und dem Weißkohl-LTP Bra o 3 gefunden [Ahrazem et al. 2005, Palacin et al. 2006]. Bei der Inhibition der IgE-Antikörper gegen Weißkohl mit dem Pfirsich-LTP Pru p 3 und dem Weißkohl-LTP Bra o 3 wurde eine IgE-Inhibition von 50% ($I_{\max/2}$) durch Pru p 3 bei einer wesentlich niedrigeren Proteinkonzentration im Vergleich zur Inhibition durch Bra o 3 erreicht. Beide Proteine erreichten jedoch eine maximale Inhibition von 70-73%. Bei einer ELISA-Inhibition zeigte eine Präinkubation

der Seren mit Pru p 3 eine vollständige Inhibition der IgE-Bindung an Cit s 3 und Cit l 3, während im Gegensatz dazu Cit s 3 und Cit l 3 nach Präinkubation der Seren lediglich eine partielle Inhibition der IgE-Bindung an Pru p 3 (max. 21%) erzielten.

Kreuzreaktivität von murinen IgE- und IgG-Antikörpern

Zusätzlich wurden Kreuzreaktionen von murinen LTP-spezifischem IgE und IgG mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest und ELISA analysiert. Zur Untersuchung der Auswirkung von denaturierten Allergenen bezüglich ihrer Immunogenität, wurde reduziertes und alkyliertes nPru p 3 in die Studie einbezogen. Weiterhin wurden neben den Lebensmittel-LTPs aus Pfirsich (Pru p 3) und Haselnuss (Cor a 8) auch Pollen-LTPs aus der Platane (Pla a 3), dem Traubenkraut (Amb a 6) und dem Beifuß (Art v 3) in diese Modelluntersuchung einbezogen. Anhand dieses Ansatzes wurde die Bedeutung der Lebensmittel- und Pollen-LTPs hinsichtlich ihrer Immunogenität und Kreuzreaktivität von IgE-Antikörpern untersucht. Auf eine Immunisierung der Mäuse mit Pru av 3 wurde, aufgrund der hohen Sequenz- und Strukturähnlichkeit zu Pru p 3 und die dadurch zu erwarteten nahezu identischen Ergebnisse, verzichtet. Dementsprechend wurden in dieser Studie Mäuse des Mausstamms CBA/J jeweils mit nPru p 3, denaturiertem nPru p 3 (reduziert/alkyliert), rCor a 8 (*P. pastoris*), nPla a 3, nAmb a 6 und nArt v 3 immunisiert.

Ein Vorteil dieser kontrollierten Mausstudie ist die Tatsache, dass die Mäuse vor der Immunisierung keinen Kontakt zu dem getesteten Allergenspektrum hatten. Eine primäre Sensibilisierung des Immunsystems durch andere LTPs, deren Kreuzreaktivität untersucht werden sollte, konnte im Gegensatz zu der Studie mit den humanen Seren, ausgeschlossen werden. Außerdem konnte die Häufigkeit und Dosis der Immunisierung kontrolliert werden.

Kreuzreaktivität von murinen IgE-Antikörpern mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest

Alle untersuchten LTPs, mit Ausnahme des denaturierten nPru p 3, induzierten spezifische IgE-Antikörper (Abb. 4.36). Kreuzreaktivitäten der IgE-Antikörper wurden nur zwischen dem anti-nAmb a 6-Serum und den Pollen-LTPs nAmb a 6 und nArt v 3 beobachtet. Diese Kreuzreaktivität lässt sich aufgrund der Angehörigkeit der gleichen Familie (*Asteraceae* = Korbblütler, veraltet *Compositae*) erklären und weist auf eine hohe Strukturähnlichkeit der IgE-bindenden Strukturen hin.

Eine Kreuzreaktivität mit murinen IgE-Antikörpern mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest konnte demnach im Gegensatz zu den ELISA-Inhibitionsstudien mit humanen Seren nicht zwischen nPru p 3/rPru av 3 und nPru p 3/Cor a 8 gezeigt werden. Ein primär sensibilisierendes Agens setzt jedoch voraus, dass es sehr breite Kreuzreaktivitäten zu allen restlichen LTPs aufweist. In dieser gut kontrollierbaren Mausstudie trifft die Voraussetzung im RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest auf kein untersuchtes LTP zu. Diese Ergebnisse könnten den Anschein erwecken, dass jedes LTP in der Lage ist kausal eine Allergie auszulösen. Die Ergebnisse der ELISA-Inhibitionsstudien der humanen Seren würden hingegen vermuten lassen, dass Pru p 3 bezüglich der Sensibilisierung und Auslösung der Kreuzreaktivität eine hohe Relevanz besitzt (4.5.3). Die Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern der humanen Seren (Inhibitions-ELISA) wurden bei Allergikern beobachtet, die eine Sensibilisierung gegen mindestens zwei LTPs aufwiesen (Tab. 9.1.1). In der Mausstudie wurden Seren von Mäusen getestet, die nur gegen ein LTP exponiert waren. Bei den Patienten könnte eine multivalente oder parallele Sensibilisierung, bei der mehrere LTPs gleichzeitig oder nacheinander das Immunsystem angeregt haben, bewirken, dass andere Epitope erkannt und dadurch vermehrt kreuzreaktives spezifisches IgE gebildet wurde. Dieses Phänomen wird häufig auch als „epitope spreading“ bezeichnet [Powell et al. 2001] und wäre eine Erklärung für die beobachteten Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern der humanen Seren. Interessant wäre die Untersuchung der Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern im murinen System nach einer parallelen oder sequentiellen Immunisierung mit unterschiedlichen LTPs, um die humane Situation nachzustellen und vergleichen zu können. Zeigt das murine System nach dieser Immunisierungsstrategie ebenfalls Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern, die durch das humane System detektiert werden konnten, könnte der Einfluss von Antigenen auf das Immunsystem während der Sensibilisierungsphase bestätigt werden.

Eine IgE-abhängige Sensibilisierung und mögliche nachfolgende Kreuzreaktivitäten von IgE-Antikörpern wurden im murinen System nur durch einen funktionellen RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest analysiert, während die Bewertung der IgE-Antwort bei den Humansenen mittels Inhibitions-ELISA durchgeführt wurde. Aufgrund der geringen murinen Serummenge und der hohen Sensitivität des RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest wurden die Kreuzreaktivitäten der murinen Antikörper nicht mittels ELISA-Inhibition untersucht. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus dem

RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest und dem Inhibitions-ELISA ist aufgrund der Unterschiede im Versuchsprinzip nicht möglich. Durch einen Inhibitions-ELISA könnte die Bindung von nur einem Epitop inhibiert und somit nachgewiesen werden, während bei einem RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest mindestens zwei Epitope eines Allergens zur Quervernetzung benötigt würden. Dementsprechend hätte nur ein identisches Epitop der LTPs nicht im RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest detektiert werden können. Um eine generelle Aussage zur IgE-Kreuzreaktivität im murinen System treffen zu können, müssten die Seren der immunisierten Mäuse mittels ELISA-Inhibition auf ihre Kreuzreaktivität untersucht werden. Dies ist jedoch aufgrund der geringen murinen Serummenge nicht möglich gewesen.

Kreuzreaktivität von murinen IgG-Antikörpern mittels ELISA

Mit Ausnahme des denaturierten nPru p 3 induzierten alle untersuchten LTPs spezifische IgG-Antikörper (Abb. 4.37). Kreuzreaktivitäten von IgG-Antikörpern wurden mit dem anti-nArt v 3 Serum, mit Ausnahme von nAmb a 6 und denaturiertem nPru p 3, bei allen restlichen getesteten LTPs gezeigt. Das anti-nPru p 3-Serum zeigte lediglich deutliche Kreuzreaktivitäten zu rPru av 3 und nArt v 3, während das anti-rCor a 8-Serum eine IgG-Kreuzreaktivität zu rPru av 3/nPru p 3 und schwach zu nPla a 3 zeigte. IgG-Kreuzreaktivitäten konnten mittels ELISA, der aufgrund des Versuchsprinzips im Gegensatz zu dem RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest nicht nur polyvalente Epitope, sondern auch gemeinsame monovalente Epitope der Allergene detektieren konnte, beobachtet werden.

Natürliches Pru p 3 und rPru av 3 erzielten wie erwartet im ELISA zur IgG-Detektion nahezu identische Ergebnisse der Kreuzreaktivitäten der einzelnen Antiseren, wodurch gleiche Antigeneigenschaften abgeleitet werden können. Denaturiertes nPru p 3 induzierte weder eine IgE- noch eine IgG-Antikörperproduktion. Diese Beobachtung resultierte wahrscheinlich daraus, dass das denaturierte Allergen frühzeitig von Proteasen abgebaut wurde, bevor eine B-Zell-Antwort durch dieses Allergen ausgelöst werden konnte.

5.7.5 T-Zell-Kreuzreaktivität

Zur Bestimmung der Immunogenität der LTPs wurden die Kreuzreaktivitäten auf T-Zell-Ebene untersucht. Hierzu wurde die Proliferation von Pru p 3 spezifischen T-Zell-

Linien und Klonen durch Stimulation mit dem Kirsch-, Haselnuss- und Salat-LTP analysiert.

T-Zellen erkennen über den T-Zell-Rezeptor im Gegensatz zu IgE-Antikörpern nur lineare Epitope. Zur Identifizierung dieser linearen Epitope wurden synthetische überlappende Peptide, die die gesamte Pru p 3-Sequenz präsentierten, auf ihre Fähigkeit spezifische T-Zell-Linien (TCL) zur Proliferation anzuregen, untersucht (4.5.6.2). Es wurden insgesamt 24/27 reaktive Peptide identifiziert. Eine Proliferation der T-Zell-Linien (TCL) konnte bei 13/14 Linien durch mehrere Peptide (mind. 2, max. 8) induziert werden (Abb. 4.40, x-Achse). Es wurde eine Summe von 15 Epitopen von Pru p 3, unter denen kein dominantes, das von allen 14 TCL erkannt wurde, identifiziert (Abb. 4.40).

Spezifische T-Zell-Klone für das Peptid CIPYVRGGGAVP (Peptid Nr. 5, Abb.4.40), das eine hohe Sequenzidentität mit Pru av 3 (92%) und eine niedrige mit Cor a 8 (42%) aufwies, zeigten eine deutliche Stimulation durch das homologe LTP Pru p 3. Eine Kreuzreaktivität zu rPru av 3 wurde bei einem deutlich schwächeren Stimulationsindex gefunden, während keine deutliche Kreuzreaktion mit rCor a 8 (Abb. 4.41) oder rLac s 1 (Daten nicht gezeigt) nachweisbar war ($SI \leq 2$). Ein weiterer T-Zell-Klon spezifisch für das Peptid NNAALPGKCGL (Peptid Nr. 22, Abb.4.40), das eine Sequenzidentität von 100% mit Pru av 3 und ebenfalls eine hohe Identität von 83% mit Cor a 8 aufwies, zeigte lediglich eine geringe Stimulation durch das LTP Pru p 3 oder Pru av 3, während eine Stimulation durch Cor a 8 einen deutlich höheren Stimulationsindex erreichte. Starke Unterschiede durch die Stimulation der verschiedenen LTPs konnten auch bei diesem Klon gezeigt werden, was auf eine geringe T-Zell-Kreuzreaktivität hindeutet. Untersuchungen zu Kreuzreaktivitäten mit einer T-Zell-Linie, die durch Pru p 3 generiert wurde, wodurch die komplette Anzahl der Pru p 3-Epitope präsentiert wurde, haben ähnliche Ergebnisse geliefert (Daten nicht gezeigt).

Die gefundene T-Zell-Kreuzreaktivität zwischen Pru p 3 und Pru av 3 beruht wahrscheinlich auf ihrer hohen Sequenzidentität und der hohen taxonomischen Verwandtschaft beider Pflanzen. Die fehlende deutliche T-Zell-Kreuzreaktivität bei Pru p 3/Cor a 8 und Pru p 3/Lac s 1 deutet darauf hin, dass die T-Zell-Epitope der LTPs aus nicht verwandten Spezies unterschiedlich sind. Um eine generelle Aussage über die T-Zell-Kreuzreaktivität treffen zu können, müssen eventuelle Kreuz-

reaktivitäten der restlichen synthetischen Peptide, die in dieser Studie nicht getestet wurden, untersucht werden.

5.8 Fazit und Ausblick

Die Untersuchungen dieser Arbeit fokussierten sich auf die Lebensmittelallergene aus der Familie der Lipidtransfer Proteine des Pfirsichs, der Kirsche, der Haselnuss und des Salats und sollten ihre klinische Bedeutung analysieren und anschließend Aufschluss über die Fähigkeit dieser Allergene eine Allergie kausal auszulösen bringen.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse der IgE-Prävalenz, der IgE-Bindekapazität, der humanen Kreuzreaktivität von IgE-Antikörpern und der biologischen Potenz kann dem Pfirsich LTP Pru p 3 die bedeutendste Rolle unter den untersuchten LTPs zugeschrieben werden. Andererseits zeigen Einzelfälle jedoch auch, dass Pru p 3 wahrscheinlich nicht ausschließlich das primär sensibilisierende Agens darstellt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Gruppe der Pfirsichallergiker mit 82% der gesamten untersuchten Lebensmittelallergiker stark repräsentiert war. Eine Sensibilisierung gegen Pru p 3 wurde bei 90% der Pfirsichallergiker gefunden. Die gefundenen IgE-Bindekapazitäten zeigten, dass eine Sensibilisierung gegen Cor a 8 offensichtlich von einer Sensibilisierung gegen Pru p 3 abhängig ist. In Einzelfällen konnten spezie-spezifische Epitope nachgewiesen werden, während eine IgE-Reaktivität gegen LTPs, die nicht zu der Familie der Rosengewächse gehören, in seltenen Fällen ohne eine begleitende Sensibilisierung gegen Pru p 3 auftrat.

Die Untersuchungen zur biologischen Potenz der Lebensmittel LTPs fielen für die einzelnen Allergene teilweise sehr unterschiedlich aus, zeigten aber in den meisten Fälle die stärkste biologische Potenz für Pru p 3 und Pru av 3. Der Einzelfall, bei dem Pru p 3 nur eine sehr geringe Histaminfreisetzung bewirkte, könnte die Vermutung, dass Pru p 3 als alleiniges primäres sensibilisierendes Agens fungieren könnte, in Frage stellen. Bei Untersuchungen der Kreuzreaktivitäten von humanen IgE-Antikörpern wies Pru p 3 die komplette Anzahl der Epitope von Cor a 8 und Lac s 1 auf oder zeichnete sich durch eine wesentlich höhere Bindungskapazität der Epitope bezüglich der Bindung von IgE-Antikörpern im Vergleich zu Cor a 8 und Lac s 1 aus. Die Tatsache, dass jedes untersuchte LTP im murinen System als Immunogen wirkte, lässt vermuten, dass die Allergene unabhängig voneinander eine Sensibilisierung auslösen können. Die fehlenden Kreuzreaktivitäten der murinen IgE-Antikörper unterstützen diese Vermutung. Um eine eindeutige Aussage diesbezüglich treffen zu können, müssten die murinen und humanen Kreuz-

reaktivitäten von IgE-Antikörpern mit der gleichen Methode analysiert werden. Blieben die beobachteten Unterschiede zwischen dem humanen und murinen System dennoch bestehen, stünde ebenfalls eine weitere Untersuchung der Reaktivitäten nach einer sequenziellen oder parallelen Immunisierung der Mäuse mit unterschiedlichen LTPs an, um die Expositionssituation beim Menschen besser zu simulieren. Weitere systematische T-Zell-Proliferationsstudien, in denen synthetische Peptide aus der Sequenz von Pru p 3-, Cor a 8- und Lac s 1 hinsichtlich ihrer Rolle als T-Zell-Epitope sowie einer nachfolgenden Kreuzreaktivität dieser Epitope bei Stimulation mit anderen LTPs untersucht werden sollen, stehen aus. Untersuchungen zur Möglichkeit, dass LTPs wie Cor a 8, Lac s 1 oder Pru av 3 primär einen T-Zell-Stimulus auslösen, der die IgE-Sensibilisierung gegen Pru p 3 begünstigt, wären ebenfalls interessant ebenso wie Daten über den zeitlichen Verlauf der Sensibilisierung.

6. Zusammenfassung

Starke allergische Reaktionen gegen nicht spezifische Lipidtransfer Proteine sind im mediterranen Raum weit verbreitet. LTPs besitzen als Klasse 1 Nahrungsmittelallergene vermutlich die Fähigkeit über den oralen Weg, durch den Verzehr von Nahrung, eine Sensibilisierung auszulösen. Zu Beginn dieser Arbeit wurde jedoch in der Literatur die Möglichkeit diskutiert, ob auch bei einer LTP-Sensibilisierung eine Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie vorliegen könnte. Untersuchungen zur IgE-Bindungskapazität von Lebensmittel- und Pollen-LTPs zeigten partielle Kreuzreaktivitäten. Eine Aussage über eine einheitliche Tendenz zur stärkeren IgE-Bindungskapazität konnte anhand der derzeitigen Ergebnisse weder für die Lebensmittel- noch für die Pollen-LTP-Gruppe getroffen werden. Dementsprechend lag kein eindeutiger Hinweis zur Korrelation zwischen der Sensibilisierung gegen Pollen- und Nahrungsmittel-LTPs vor, wodurch die Frage zur Fähigkeit der einzelnen LTPs kausal eine Allergie auszulösen weiterhin offen bleibt. Die Untersuchungen dieser Arbeit fokussierten sich auf die Lebensmittelallergene und sollten ihre klinische Bedeutung analysieren und Aufschluss über die Fähigkeit dieser Allergene eine Allergie kausal auszulösen bringen. Hierbei sollte untersucht werden, ob jedes Nahrungsmittel-LTP die Fähigkeit besitzt eine IgE-Sensibilisierung auszulösen oder ob ein LTP als primär sensibilisierendes Agens wirkt und nachfolgend immunologische Kreuzreaktionen zu anderen LTPs auftreten. Aufgrund der großen Häufigkeit von Patienten mit einer Pfirsichallergie im mediterranen Raum mit einer Sensibilisierung gegen das Pfirsich-LTP (Pru p 3), sowie einer schweren Symptomatik, wird vermutet, dass dieses Allergen eine wichtige Rolle spielt und eventuell als primär sensibilisierendes Agens fungieren könnte. Zur Identifizierung eines primär sensibilisierenden Agens sollte das Ausmaß der Antikörper-Kreuzreaktivität, die Aufschluss über die Affinität und Vorkommen gemeinsamer Epitope liefern soll, untersucht werden. Weiterhin sollte die IgE-Prävalenz der einzelnen Allergene, ihre Immunogenität (T-Zell-Kreuzreaktivität und *in vivo* Antikörperinduktion) und die biologische Potenz untersucht werden.

Um der Fragestellung nachzugehen wurden die LTPs aus taxonomisch verwandten (Kirsche, Pru av 3 und Pfirsich, Pru p 3) und nicht verwandten (Haselnuss, Cor a 8 und Salat, Lac s 1) Lebensmitteln in die Studie einbezogen. Für die Untersuchungen standen 51 Seren von spanischen Lebensmittelallergikern zur Verfügung, deren

Allergien gegen Pfirsich, Salat, Haselnuss und Kirsche anamnestisch und serologisch erfasst wurden. Die Relevanz der LTPs wurde durch die Schwere der klinischen Symptomatik deutlich. LTPs besitzen eine hohe Stabilität gegenüber thermischer und proteolytischer Prozessierung. Natürliches Pru p 3 zeigte bei einer Erhitzung auf 90°C zum größten Teil eine intakte Sekundärstruktur. Diese Eigenschaften könnten die Aufnahme von intakten Allergenen im gastrointestinalen Trakt begünstigen, wodurch die teilweise starken allergischen Reaktionen erklärt werden können.

Bei der Untersuchung zur Relevanz von Pru p 3 im Vergleich zu Lac s 1, Cor a 8 und Pru av 3 wurde die IgE-Prävalenz, IgE-Bindekapazität, IgE-Kreuzreaktivität und biologische Potenz untersucht. Spezifisches IgE gegen Lac s 1 (93%), Pru p 3 (90%), Cor a 8 (88%) und Pru av 3 (85%) wurde mittels ImmunoCAP-FEIA in der jeweiligen Lebensmittelallergikergruppe gefunden und quantitativ bestimmt. Alle untersuchten Lebensmittel-LTPs erwiesen sich als Hauptallergene in der jeweiligen Patientengruppe. Bei Untersuchungen der IgE-Bindekapazität zeigten alle untersuchten Patienten, mit Ausnahme von einem, eine stärkere IgE-Bindungen gegen Pru p 3 im Vergleich zu Cor a 8. Demnach korreliert eine IgE-Sensibilisierung gegen Cor a 8 mit der gegen Pru p 3. Lac s 1 zeigte in einigen Fällen eine stärkere IgE-Bindung im Vergleich zu Pru p 3 und umgekehrt. Mit Ausnahme eines Patienten war eine IgE-Sensibilisierung gegen Lac s 1 immer mit der gegen Pru p 3 assoziiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Einzelfällen spezies-spezifische Epitope beobachtet wurden, während IgE-Reaktivitäten gegen LTPs, die nicht zu der Familie der Rosengewächse gehören, in seltenen Fällen ohne eine begleitende Sensibilisierung gegen Pru p 3 auftraten.

Die IgE-Bindung an Pru p 3 konnte durch Cor a 8 und Lac s 1 maximal bis 60% inhibiert werden, während Pru p 3 eine komplette Inhibition der Cor a 8 und Lac s 1 IgE-Bindung bewirkte. Demnach besitzt Pru p 3 alle IgE-Epitope von Lac s 1 und Cor a 8 und/oder eine stärkere Affinität zu den IgE-Antikörpern. Cor a 8 zeigte, trotz der Fähigkeit schwere Symptome auszulösen, eine relativ geringe biologische Potenz. Lediglich bei einem von fünf untersuchten Patienten zeigte Lac s 1 eine starke maximale Histaminfreisetzung. Pru p 3 und Pru av 3 zeigten die stärkste biologische Potenz bei allen untersuchten Pfirsichallergikern. Ein Salatallergiker ohne Pfirsichallergie zeigte durch die Stimulation mit Pru p 3 eine geringe Mediatorfreisetzung, wodurch dem Allergen Pru p 3 in Einzelfällen ohne klinische

Symptomatik gegen das Allergen nicht zwangsläufig die stärkste biologische Potenz zugeschrieben werden kann. Pru p 3 und Pru av 3 zeigten aufgrund einer hohen Sequenzidentität von 85% nahezu identische IgE-Bindekapazitäten, IgE-Kreuzreaktivitäten, sowie eine ähnliche biologische Potenz. Eine Kreuzreaktivität auf T-Zell-Ebene wurde ebenfalls zwischen Pru p 3 und Pru av 3 detektiert, während im murinen System mittels RBL-2H3-Mediatorfreisetzungstest keine Kreuzreaktivität unter allen untersuchten Lebensmittel-LTPs nachweisbar war. Fehlende T-Zell-Kreuzreaktivitäten zwischen Pru p 3/Cor a 8 und Pru p 3/Lac s 1 deuten auf unterschiedliche T-Zell-Epitope der untersuchten Proteine hin. Um eine generelle Aussage über die T-Zell-Kreuzreaktivität treffen zu können, wären weitere systematische T-Zell-Proliferationsstudien erforderlich..

Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass dem Allergen Pru p 3 hinsichtlich IgE-Prävalenz, IgE-Bindekapazität, IgE-Kreuzreaktivität im Inhibitions-ELISA und der biologischen Potenz im Mediatorfreisetzungstest die bedeutendste Rolle unter den untersuchten LTPs zukommt. In Einzelfällen konnten jedoch spezies-spezifische Epitope nachgewiesen werden, wodurch die Annahme verstärkt wird, dass Pru p 3 nicht das alleinige Immunogen sein kann. Weiterhin waren alle untersuchten LTPs im murinen System immunogen, wodurch die Annahme verstärkt wird, dass jedes untersuchte LTP eine Allergie kausal auslösen kann. Unterstützt wird diese Vermutung durch die fehlende Kreuzreaktivität der murinen IgE-Antikörper. Eine eindeutige Aussage kann aufgrund der erhaltenen Ergebnisse derzeit noch nicht getroffen werden, da weitere systematische T-Zell-Proliferationsstudien und Inhibitions-ELISA der Maus-Immunsere in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

7. Literaturverzeichnis

Ahrazem O, Ibanez MD, Lopez-Torrejon G, Sanchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M et al. (2005) Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **137**, 201-210.

Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, Krebitz M, Breiteneder H, de Vries S et al. (2003) How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents? *Int.Arch.Allergy Immunol.* **132**, 132-140.

Albrecht M, Lidholm J, Reese G, Vieths S. (2007) Establishment of a murine model of hazelnut allergy to investigate the effects of immunotherapy. *Allergo Journal* **1**, 42.

Amlot PL, Kemeny DM, Zachary C, Parkes P, Lessof MH. (1987) Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clin.Allergy* **17**, 33-42.

Asero R. (1999) Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* **83**, 377-383.

Asero R, Ballmer-Weber B, Beyer K, Conti A, Dubakiene R, Fernandez-Rivas M et al. (2007) IgE-Mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Mol.Nutr.Food Res.* **51**, 135-147.

Asero R., Bolhaar, S., Gonzalez-Mancebo, E., Fernandez-Rivas, M., Knulst, A., Hoffmann-Sommergruber, K. et al. (2004) Are the different prevalences of sensitization to lipid transfer protein throughout Europe related to food consumption habits? XXIII EAACI Congress 2004, Amsterdam, Poster Session-Food Allergy.

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F et al. (2002) Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* **57**, 900-906.

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**, 20-32.

Bacharier LB und Geha RS. (2000) Molecular mechanisms of IgE regulation. *J.Allergy Clin.Immunol.* **105**, S547-S558.

Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. (2000) Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N.Engl.J.Med.* **343**, 538-543.

Ballmer-Weber BK. (2002) Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy* **57**, 873-875.

- Ballmer-Weber BK, Scheurer S, Fritsche 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**, 167-173.
- Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodriguez R.** (2004) A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecie] cross-reactivity. *J.Immunol.* **172**, 3644-3651.
- Barral P, Batanero E, Villalba M, Rodriguez R.** (2005) Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: evidence of post-translational modifications. *Protein Expr.Purif.* **44**, 147-154.
- Bjorksten F, Halmepuro L, Hannuksela M, Lahti A.** (1980) Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* **35**, 671-677.
- Blanco C.** (2003) Latex-fruit syndrome. *Curr.Allergy Asthma Rep.* **3**, 47-53.
- Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, Ponchet M.** (2002) From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci.* **7**, 293-296.
- Bodner C, Godden D, Seaton A.** (1998) Family size, childhood infections and atopic diseases. The Aberdeen WHEASE Group. *Thorax* **53**, 28-32.
- Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Hoffmann-Sommergruber K, Fischer GF, Ebner C.** (2003) Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur.J.Immunol.* **33**, 3303-3310.
- 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**, 32-40.
- Borges JP, Jauneau A, Brule C, Culerrier R, Barre A, Didier A et al.** (2006) The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol Biochem.* **44**, 535-542.
- Bredehorst R und David K.** (2001) What establishes a protein as an allergen? *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **756**, 33-40.
- Breiteneder H und Clare Mills EN.** (2005a) Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol.Adv.* **23**, 395-399.
- Breiteneder H und Ebner C.** (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J.Allergy Clin.Immunol.* **106**, 27-36.
- Breiteneder H und Mills C.** (2005b) Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **5**, 275-279.

- Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA.** (2000) Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J.Agric.Food Chem.* **48**, 493-497.
- Brenna OV, Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Pompei C.** (2004) Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. *J.Agric.Food Chem.* **52**, 7997-8000.
- Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindselev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D et al.** (1995) Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy* **50**, 623-635.
- Carnes J, Fernandez-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A, Cuesta-Herranz J.** (2002) Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy* **57**, 1071-1075.
- Ceska M und Lundkvist U.** (1972) A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry.* **9**, 1021-1030.
- Clements RL.** (1965) Fruit proteins: extraction and electrophoresis. *Anal.Biochem.* **13**, 390-401.
- Coleman R, Trembath RC, Harper JI.** (1997) Genetic studies of atopy and atopic dermatitis. *Br.J.Dermatol.* **136**, 1-5.
- Coombs R.R.A. und Gell P.G.H.** (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical aspects of immunology* 317.
- Cregg JM, Tschopp JF, Stillman CA, Siegel R, Akong M, Craig WS et al.** (1987) High-Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 479-485.
- Daser A, Gerstner B, Hansen R, Bulfone-Paus S, Renz H.** (1998) Impaired NK1.1+ T cells do not prevent the development of an IgE-dependent allergic phenotype. *Clin.Exp.Allergy* **28**, 950-955.
- Davies RJ, Rusznak C, Devalia JL.** (1998) Why is allergy increasing?-- environmental factors. *Clin.Exp.Allergy* **28 Suppl 6**, 8-14.
- DGAKI.** (2004) Weißbuch Allergie in Deutschland 2004. DGAKI (Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie), Ring, J., and Wenning, J. Urban und Vogel Medien- und Medizin-Verl.-Ges., München.
- Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G.** (2002a) cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clin.Exp.Allergy* **32**, 87-92.
- Diaz-Perales A, Sanz ML, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Lombardero M et al.** (2003) Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* **111**, 628-633.

- Diaz-Perales A, Tabar AI, Sanchez-Monge R, Garcia BE, Gomez B, Barber D et al.** (2002b) Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J.Allergy Clin.Immunol.* **110**, 790-796.
- Duffort OA, Polo F, Lombardero 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.* **50**, 7738-7741.
- Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W et al.** (1999) Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N.Engl.J.Med.* **341**, 468-475.
- Duro G, Colombo P, Assunta CM, Izzo V, Porcasi R, Di Fiore R et al.** (1997) Isolation and characterization of two cDNA clones coding for isoforms of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1.0101. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **112**, 348-355.
- Duro G, Colombo P, Costa MA, Izzo V, Porcasi R, Di Fiore R et al.** (1996) cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett.* **399**, 295-298.
- Eckart MR und Bussineau CM.** (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr.Opin.Biotechnol.* **7**, 525-530.
- Enrique E, Cistero-Bahima A, Bartolome B, Alonso R, Miguel-Moncin MM, Bartra J et al.** (2002) *Platanus acerifolia* pollinosis and food allergy. *Allergy* **57**, 351-356.
- 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**, 1073-1079.
- Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B et al.** (2006) Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J.Allergy Clin.Immunol.* **118**, 481-488.
- 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**, 789-795.
- Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M.** (1997) Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J.Allergy Clin.Immunol.* **100**, 728-733.
- 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**, 889-896.

- Gao, Z. S., Schaart, J. G., van de Weg, W. E., Kodde, L., van der Meer, I. M., und Gilissen, L. J.** (2004) Map positions and diversity of lipid transfer protein genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). International symposium on immunological, chemical and clinical problems of food allergy, Poster-Session, Budapest, Ungarn.
- 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**, 647-649.
- Garcia-Casado G, Pacios LF, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Lombardero 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**, 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**, 72-74.
- Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D et al.** (2002) Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **128**, 115-122.
- Georgiou G und Valax P.** (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Biotechnol.* **7**, 190-197.
- Grinna LS und Tschopp JF.** (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**, 107-115.
- Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hofmann T.** (2004) Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J.Agric.Food Chem.* **52**, 4002-4007.
- Guiderdoni E, Cordero MJ, Vignols F, Garcia-Garrido JM, Lescot M, Tharreau D et al.** (2002) Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice Ltp1 gene. *Plant Mol.Biol.* **49**, 683-699.
- Hiller KM, Lubahn BC, Klapper DG.** (1998) Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. *Scand.J.Immunol.* **48**, 26-36.
- Hoffmann A, Haustein D, Vieths S.** (1999a) Assays for the determination of the biological activity of allergen extracts. *Arb.Paul Ehrlich Inst.Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M.* 101-107.
- Hoffmann A, Jamin A, Foetisch K, May S, Aulepp H, Haustein D et al.** (1999b) Determination of the allergenic activity of birch pollen and apple prick test solutions by measurement of beta-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Comparison with classical methods in allergen standardization. *Allergy* **54**, 446-454.
- Hoffmann-Sommergruber K, Demoly P, Cramer R, Breiteneder H, Ebner C, Laimer Da Camara MM et al.** (1999a) IgE reactivity to Api g 1, a major celery allergen, in a Central European population is based on primary sensitization by Bet v 1. *J.Allergy Clin.Immunol.* **104**, 478-484.

- Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara MM, Puhringer H et al.** (1999b) Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin.Exp.Allergy* **29**, 840-847.
- Holgate ST.** (1999) The epidemic of allergy and asthma. *Nature* **402**, B2-B4.
- Holt PG.** (1996) Infections and the development of allergy. *Toxicol.Lett.* **86**, 205-210.
- Jäger, L. und Wüthrich, B.** (2002) Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen. Gustav Fischer Verlag, Ulm.
- Jahn-Schmid B, Kelemen P, Himly M, Bohle B, Fischer G, Ferreira F et al.** (2002) The T cell response to Art v 1, the major mugwort pollen allergen, is dominated by one epitope. *J.Immunol.* **169**, 6005-6011.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., und Shlomchik, M.** (2002) Die Entstehung von Lymphocyten-Antigenrezeptoren. Spektrum, Akad. Verl., Berlin.
- Kader JC.** (1996) LIPID-TRANSFER PROTEINS IN PLANTS. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **47**, 627-654.
- Karamloo F, Scheurer S, Wangorsch A, May S, Haustein D, Vieths S.** (2001) Pyr c 1, the major allergen from pear (*Pyrus communis*), is a new member of the Bet v 1 allergen family. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **756**, 281-293.
- Kay AB.** (2001) Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* **344**, 30-37.
- King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W.** (1995) Allergen nomenclature. *Allergy* **50**, 765-774.
- Kleine B, I, de Heer PG, van der Zee JS, Aalberse RC.** (2001) The stripped basophil histamine release bioassay as a tool for the detection of allergen-specific IgE in serum. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **126**, 277-285.
- Kleine-Tebbe J, Fuchs T, Lepp U, Niggemann B, Saloga J, Vieluf I et al.** (2001) In-vitro-Diagnostik von Nahrungsmittel-Allergien. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) und des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA). *Allergo Journal* **10**, 333-339.
- Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, Haustein UF, Vieths S.** (2002) Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J.Allergy Clin.Immunol.* **110**, 797-804.
- Kraemer MH, Donadi EA, Tambascia MA, Magna LA, Prigenzi LS.** (1998) Relationship between HLA antigens and infectious agents in contributing towards the development of Graves' disease. *Immunol.Invest* **27**, 17-29.
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Larsen FS, Holm NV, Henningsen K. (1986) Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J.Am.Acad.Dermatol.* **15**, 487-494.

Larsen JN und Lowenstein H. (1996) Allergen nomenclature. *J.Allergy Clin.Immunol.* **97**, 577-578.

Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D et al. (2007) Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. *Clin.Exp.Allergy* **37**, 261-269.

Le LQ, Lorenz Y, Scheurer S, Fotisch K, Enrique E, Bartra J et al. (2006) Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnol.J.* **4**, 231-242.

Lidholm J, Ballmer-Weber BK, Mari A, Vieths S. (2006) Component-resolved diagnostics in food allergy. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **6**, 234-240.

Lindorff-Larsen K und Winther JR. (2001) Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett.* **488**, 145-148.

Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, Garcia-Casado G et al. (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**, 1415-1421.

Luttkopf D, Muller U, Skov PS, Ballmer-Weber BK, Wuthrich B, Skamstrup HK 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**, 515-525.

Marknell DA, Niederberger V, Lehtonen P, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P et al. (2002) Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11. *Clin.Exp.Allergy* **32**, 1329-1340.

Marsh DG, Meyers DA, Bias WB. (1981) The epidemiology and genetics of atopic allergy. *N.Engl.J.Med.* **305**, 1551-1559.

Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P et al. (1997) Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* **314**, 999-1003.

Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M et al. (2000) Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* **320**, 412-417.

Matsudaira P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J.Biol.Chem.* **262**, 10035-10038.

- Messer M, Griffiths M, Rismiller PD, Shaw DC.** (1997) Lactose synthesis in a monotreme, the echidna (*Tachyglossus aculeatus*): isolation and amino acid sequence of echidna alpha-lactalbumin. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* **118**, 403-410.
- 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**, 511-517.
- Moingeon P.** (2006) Sublingual immunotherapy: from biological extracts to recombinant allergens. *Allergy* **61 Suppl 81**, 15-19.
- Mygind, N., Dahl, R., Pedersen, S., und Thestrup-Pedersen, K.** (2000) *Allergologie: Textbuch und Farbatlas*. Bechtermünz Verlag, Augsburg.
- Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D.** (1997) Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 744-751.
- Nettis E, Colanardi MC, Ferrannini A, Tursi A.** (2002) Latex hypersensitivity: personal data and review of the literature. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **24**, 315-334.
- Niggemann B, Erdmann S, Fuchs T, Henzgen M, Jäger L, Kleine-Tebbe J et al.** (2006) Standardisierung von oralen Provokationstests bei Nahrungsmittelallergien. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) sowie der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA). *Allergo Journal* **15**, 262-270.
- Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F, Leung DY.** (1992) Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 256-262.
- Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R.** (1988) The oral allergy syndrome. *Ann. Allergy* **61**, 47-52.
- 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**, 1423-1429.
- Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida G, Monza M et al.** (2000a) Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 371-377.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D et al.** (2001) Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **756**, 95-103.

- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C et al.** (2000b) The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J.Allergy Clin.Immunol.* **106**, 744-751.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG et al.** (2003a) Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J.Allergy Clin.Immunol.* **111**, 350-359.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M et al.** (1999a) The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J.Allergy Clin.Immunol.* **103**, 520-526.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Robino AM, Scibilia J, Fortunato D et al.** (2004a) Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *J.Allergy Clin.Immunol.* **114**, 908-914.
- Pastorello EA, Incorvaia C, Pravettoni V, Farioli L, Conti A, Vigano G et al.** (1998) New allergens in fruits and vegetables. *Allergy* **53**, 48-51.
- 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**, 699-707.
- Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J et al.** (2003b) 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**, 775-783.
- Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Ispano M, Fortunato D, Monza M et al.** (1999b) Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J.Allergy Clin.Immunol.* **104**, 1099-1106.
- Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Conti A, Ispano M et al.** (2002) Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression. *J.Allergy Clin.Immunol.* **110**, 310-317.
- Pastorello EA und Robino AM.** (2004b) Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol.Nutr.Food Res.* **48**, 356-362.
- Perrocheau L, Bakan B, Boivin P, Marion D.** (2006) Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process. *J.Agric.Food Chem.* **54**, 3108-3113.
- Poo WJ, Conrad L, Janeway CA, Jr.** (1988) Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* **332**, 378-380.
- Powell AM und Black MM.** (2001) Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin.Exp.Dermatol.* **26**, 427-433.

- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G et al.** (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 3730-3734.
- Punnonen J, Yssel H, de Vries JE.** (1997) The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* **100**, 792-801.
- 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**, 815-823.
- Ring, J.** (1988) *Angewandte Allergologie*.MMV Medizin Verlag, München.
- Ring J, Brockow K, Behrendt H.** (2001) Adverse reactions to foods. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **756**, 3-10.
- Roitt I, Brostoff J, Male D.** (2000) *Immunology*. Harcourt Publishers Limited
- Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D.** (2004) Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin.Exp.Allergy* **34**, 1336-1341.
- Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G.** (1999) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* **103**, 514-519.
- 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**, 1262-1268.
- Schad SG, Trcka J, Vieths S, Scheurer S, Conti A, Brocker EB et al.** (2005) Wine anaphylaxis in a German patient: IgE-mediated allergy against a lipid transfer protein of grapes. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **136**, 159-164.
- Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel MM, 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**, 900-907.
- 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**, 619-629.
- 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**, 724-731.
- Scheurer S, Son DY, Boehm M, Karamloo F, Franke S, Hoffmann A et al.** (1999) Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol.Immunol.* **36**, 155-167.

- Scheurer S, Wangorsch A, Haustein D, Vieths S.** (2000) Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clin.Exp.Allergy* **30**, 962-971.
- Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wuthrich B et al.** (2001b) Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **756**, 315-325.
- Schmidt M.** (2006) [Bronchial asthma. Update 2006]. *Internist (Berl)* **47**, 835-850.
- 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**, 141-147.
- Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN.** (2002) Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 906-910.
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P et al.** (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**, 687-706.
- Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR.** (1987a) Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3859-3876.
- Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig WS, Grinna LS.** (1987b) High Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 1305-1308.
- van Ree R.** (2002) Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 910-913.
- Vercelli D.** (1995) Molecular regulation of the IgE immune response. *Clin.Exp.Allergy* **25 Suppl 2**, 43-45.
- Vieths S.** (1999) Allergenic cross-reactivity: food allergy and pollen. *Env Allergy* **29**, 1158-60.
- Vieths S, Brockmann S, Schöning B.** (1992a) Nahrungsmittelallergie gegen Obst und Gemüse: Eine aktuelle serologische Untersuchung zur Sensibilisierung von Pollenallergikern. *Allergologie* **15**, 367-379.
- Vieths S, Hoffmann A, Holzhauser T, Muller U, Reindl J, Haustein D.** (1998) Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy* **53**, 65-71.

Vieths S, Reindl J, Müller U, Hoffmann A, Hausstein D. (1999) Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. *Eur Food Res Technol* **209**, 379-388.

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.

Vieths, S., Schöning, B., Brockmann, S., und Aulepp, H. (1992b) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch Lebensm Rundsch*,

Vieths S, Schoning B, Petersen A. (1994) Characterization of the 18-kDa apple allergen by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **104**, 399-404.

von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **149**, 358-364.

Wahn, U. und Wichmann, HE. (2000) *Spezialbericht Allergien.* Metzler-Poeschel Verlag, Statistisches Bundesamt, Stuttgart.

Wahn V. (2000) Immunologische Therapien bei allergischen Erkrankungen. *Allergologie* **23**, 371-395.

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**, 1327-1337.

Wuthrich B. (1989) Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **90 Suppl 1**, 3-10.

Yagami T, Sato M, Nakamura A, Komiyama T, Kitagawa K, Akasawa A et al. (1998) Plant defense-related enzymes as latex antigens. *J.Allergy Clin.Immunol.* **101**, 379-385.

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**, 666-675.

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**, 273-281.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCi	Microcurie
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
AA	Aminosäure
AAAAAI	American Academy of Allergy, Asthma and Immunology
Abb.	Abbildung
Acc	„Accession number“
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AOX	Alkoholoxidase
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
as	antisense
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cirkulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d	Küvettschichtdicke
Da	Dalton
DBPCFC	doppelt-blinde Placebo-kontrollierte Nahrungsmittel-Provokationstest
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGAKI	Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
DIECA	Natriumdiethyl-dithiocarbaminat-Trihydrat
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAACI	European Academy of Allergology and Clinical Immunology
EAST	Enzym Allergosorbent Test
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Enterokinaseschnittstelle
ELISA	enzymgekoppelter Immunosorbent Test
ESI-MS	Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
EU	Endotoxin-Units
FEIA	Fluoreszenz-Enzyme-Immuno-Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
GTC	Guanidiniumthiocyanat
HRP	Horseradish Peroxidase
HR ₅₀ -Wert	Histamin-Release ₅₀ -Wert
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
I _{max/2}	halbmaximale Inhibition
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
IUIS	International Union of Immunological Societies
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kU	Kilounit
kV	Kilovolt
L	Liter
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat Test
LB	Luria Bertani
LTP	Lipidtransfer Proteine
M	Molar
mAU	Milli Absorption Unit

Me	Mercaptoethanol
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Mut ⁺	Methanol utilization plus
Mut ^s	Methanol utilization slow
MUXF	Man α 1-6(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc
MW	molecular weight
N	Absolute Anzahl
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMA	Nahrungsmittelallergie
NMI	Nahrungsmittelintoleranz
NSB	Nicht spezifische Bindung
N-terminal	Aminoterminal
OAS	Orales Allergie Syndrom
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophores
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat buffered saline
PBS-T	Phosphat buffered saline/ Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
Pfu	Plaques forming units
PRP	“pathogenesis related protein”
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“

RBL	Ratten Basophile Leukämie
rCor a 8	rekombinantes Cor a 8
rLac s 1.1	rekombinantes rLac s 1.1
rLac s 1.2	rekombinantes rLac s 1.2
rpm	Umdrehung pro Minute
rPru av 3	rekombinantes rPru av 3
rPru p 3	rekombinantes rPru p 3
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
S	Sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Stimulationsindex
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
SPT	Skin Prick Test
Tab.	Tabelle
TAP	Tabacco Pyrophosphatase
TBS	Tris-buffered saline
TCC	T-Zell-Klone
TCL	T-Zell-Linien
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	T-Helferzellen
TMB	Tetramethyl-Benzidine
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
YPDS	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium mit Sorbitol

ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
Ω	Ohm

9. Anhang

9.1 Patientendaten und serologische Ergebnisse

9.1.1 Spanische Lebensmittelallergiker Teil 1

Nr.	Serum	Alter/ Geschlecht	Salat				Pflirsich					Kirsche				Haselnuss				Platane					
			Symptome	SPT	Extrakt CAP	nLac s 1 CAP	Symptome	SPT	Extrakt CAP	nPrü p 3 CAP	rPrü p 3 (E. coli) CAP	nPrü p 3 EAST	Symptome	SPT	Extrakt CAP	rPrü av 3 (P. pastoris) CAP	Symptome	SPT	Extrakt CAP	rCor a 8 (P. pastoris) CAP	rCor a 8 (E. coli) CAP	rCor a 8 (P. pastoris) EAST	Symptome	SPT	Extrakt CAP
1	MLR 10560	33/F	A	+	1 (0,65)	4 (23,4)	A	+	3 (4,19)	3 (7,64)	ND	2 (1,79)	-	-	ND	3 (12,3)	-	-	3 (8,46)	3 (10,8)	3 (12,9)	3 (9,4)	RK	+	4 (46,4)
2	MAE 8608	34/F	A	+	2 (0,97)	3 (5,12)	A	+	3 (4,5)	3 (5,57)	3 (5,97)	0	-	ND	ND	3 (6,14)	-	ND	2 (2,06)	2 (2,45)	ND	R	+	4 (25,8)	
3	LMC 11362	38/F	A	+	0 (0,27)	5 (66,4)	-	-	4 (20,2)	5 (66,4)	ND	3 (11,86)	-	ND	ND	5 (76,5)	unbekannt	ND	4 (25)	4 (36,6)	ND	R	+	6 (>100)	
4	LCGH 9343	25/F	G	+	2 (2,72)	3 (16,1)	OAS	+	3 (16,40)	3 (11,2)	ND	3 (8,63)	-	ND	ND	3 (11)	-	ND	3 (10,3)	3 (7,87)	ND	Rk	+	3 (4,37)	
5	YSF 8695	36/F	G	ND*	2 (1,68)	2 (1,17)	-	ND*	ND	2 (0,79)	ND	0	-	ND*	ND	2 (0,79)	+	ND*	3 (6,89)	1 (0,69)	ND	0	unbekannt	ND	3 (3,68)
6	STV 1035	30/F	A	+	0 (0,29)	3 (5,95)	U	+	2 (0,89)	2 (0,9)	2 (0,97)	0	OAS	ND	2 (0,75)	2 (1)	unbekannt	-	ND	0 (0,17)	ND	ND	R	+	2 (1,83)
7	2218 11539	28/F	OAS	+	2 (2,18)	3 (15,2)	OAS	+	4 (18,5)	3 (15,6)	ND	3 (6,71)	OAS	+	3 (6,1)	3 (15)	OAS	+	2 (3,16)	3 (5,64)	3 (5,98)	2 (1,1)	R	+	3 (14,3)
8	AMA 7334	27/F	A	+	2 (1,3)	4 (20,4)	U	+	4 (19)	4 (27,2)	4 (19)	3 (14,1)	-	ND	ND	4 (24)	A	+	2 (3,5)	3 (4,09)	3 (3,86)	2 (0,8)	R	+	6 (>100)
9	SGR 7268	33/F	A	ND	2 (2,96)	3 (15,9)	U	+	3 (11,3)	3 (13,1)	3 (15,2)	3 (5,94)	-	-	0	3 (13,6)	R	+	4 (22,2)	3 (8,78)	3 (8,59)	2 (1,2)	R	+	3 (13,32)
10	SSG 7799	28/F	A	+	2 (2,72)	3 (16,8)	OAS / U	+	4 (19,6)	3 (15,1)	3 (12,9)	3 (5,16)	unbekannt	ND	ND	3 (14,4)	U	+	3 (5,69)	3 (6,7)	3 (7,04)	2 (2,2)	-	-	3 (4,42)
11	EDP 6491	25/F	OAS	+	2 (0,71)	3 (7,48)	AE	+	3 (5)	3 (6,68)	3 (5,92)	2 (1,06)	AE	+	3 (4,14)	3 (6,9)	-	-	ND	2 (3,16)	ND	ND	RK	+	6 (>100)
12	AFC 7241	34/M	A	+	2 (0,79)	3 (5,77)	OAS	+	2 (2,5)	2 (2,87)	2 (2,43)	0	OAS	+	2 (1,09)	2 (2,82)	OAS	+	2 (1,76)	2 (1,83)	2 (1,82)	0	AS/RK	+	3 (8,14)
13	MMC 4265	24/F	A	+	0 (0,09)	3 (4,69)	-	-	ND	2 (1,8)	1 (0,65)	0	-	ND	ND	2 (2,66)	A	+	2 (0,88)	1 (0,51)	1 (0,86)	0	R	+	3 (13,3)
14	GGG 7306	37/F	OAS	+	0 (0,13)	0 (0,22)	-	-	ND	3 (6,08)	2 (1,38)	0	-	ND	ND	2 (1,77)	A	+	2 (0,88)	1 (0,42)	1 (0,63)	0	RK	+	6 (>100)
15	NSR 8059	31/F	A	+	0 (0,08)	5 (61,9)	OAS	+	3 (13,4)	3 (15)	4 (23,9)	3 (5,22)	unbekannt	+	ND	3 (13,6)	-	-	0	2 (0,51)	3 (3,73)	ND	RK	+	5 (63,6)
16	EBO 7957	30/F	A	+	1 (0,42)	3 (3,78)	U	+	3 (4,5)	2 (3,44)	3 (3,59)	2 (1,30)	-	ND	ND	2 (3,29)	OAS	+	2 (0,97)	2 (2,18)	2 (2,43)	0	-	-	2 (1,41)
17	EMB 8798	35/F	A	+	1 (0,52)	2 (2,73)	OAS	+	2 (2,32)	2 (1,63)	2 (2,16)	0	unbekannt	ND	ND	2 (1,47)	-	-	ND	2 (0,77)	2 (0,98)	ND	R	+	4 (18,1)
18	MSCH 7443	27/F	U	+	2 (1,34)	3 (9,84)	U	+	3 (10,5)	3 (15,3)	3 (13,4)	3 (7,35)	-	ND	ND	3 (15,8)	U	+	3 (4,98)	3 (8,39)	3 (7,81)	2 (2,4)	R	+	2 (2,89)
19	OSN 2932	22/F	-	+	ND	0 (0,04)	U	+	3 (13,5)	4 (21,5)	3 (13,5)	3 (7,42)	OAS, AE, A, D, U	-	2 (1,53)	4 (22,1)	OAS	+	3 (4,4)	3 (12,5)	3 (13,2)	2 (3,1)	R	+	3 (10,1)
20	MLM 7427	34/M	-	-	ND	3 (4,77)	U	+	2 (1,1)	3 (5,38)	2 (2,16)	2 (0,98)	AE, D, R, A	+	1 (0,48)	3 (6,16)	-	-	ND	2 (2,73)	ND	ND	AS/R	+	2 (3,37)
21	MMI 3986	32/F	OAS	+	1 (0,65)	3 (4,51)	U	+	2 (3,2)	2 (3,17)	3 (4,23)	0	-	ND	ND	2 (3,2)	A	+	1 (0,4)	1 (0,52)	2 (0,74)	0	RK	+	3 (5,34)
22	FGT 7322	26/M	-	-	ND	3 (14,1)	U	+	2 (1,95)	3 (8,05)	ND	2 (2,57)	-	ND	ND	3 (8,22)	A	+	2 (1,37)	2 (1,28)	2 (1,57)	0	RK	+	3 (11,1)
23	EMC 4359	8/M	-	-	ND	3 (7,19)	-	-	ND	3 (6,07)	3 (6,06)	2 (2,75)	-	ND	ND	3 (5,48)	OAS	ND	2 (1,85)	2 (3,02)	2 (3,45)	2 (1)	-	-	2 (2,06)
24	JSM 8547	33/M	-	ND	ND	0 (0,16)	-	-	ND	0 (0,08)	0	0	-	ND	ND	0 (0,06)	U	+	2 (2,14)	0 (0,05)	0	0	R/AS	+	6 (>100)
25	RFJ 1360	42/F	-	ND	ND	2 (2,56)	OAS	+	2 (1,24)	2 (0,73)	2 (1,77)	0	unbekannt	ND	ND	1 (0,7)	unbekannt	ND	ND	0 (0,21)	1 (0,58)	ND	RK	+	3
26	PAL 7944	6/F	A,U	+	1 (0,46)	3 (5,14)	AE	+	3 (16)	3 (10,8)	3 (4,1)	2 (1,2)	unbekannt	ND	ND	3 (10,4)	ND*	ND	0	3 (6,37)	3 (6,92)	2 (1,8)	R/AS	+	1 (3,87)
27	PGR 10636	24/F	OAS	+	1 (0,36)	2 (1,38)	U/R	+	2 (1,37)	2 (1,56)	2 (1,06)	0	OAS	+	2 (0,79)	2 (1,52)	U/AE	-	0	1 (0,43)	0	0	RK	+	0
28	EMG 10949	30/F	A	+	2 (2)	3 (9,07)	U	+	3 (12,1)	3 (12)	3 (13,8)	2 (1,1)	A	+	3 (8,13)	3 (10,7)	U	+	2 (1,1)	2 (2,04)	2 (2,72)	0	R	+	2 (2,75)
29	ABR 11714	36/F	OAS	+	2 (0,94)	3 (5,15)	U	+	3 (3,7)	3 (4,83)	3 (5,93)	2 (0,8)	-	+	2 (1,47)	3 (4,91)	-	ND	2 (1,9)	ND	ND	AS/RK	+	2 (1,8)	
30	MPC 9994	26/F	-	ND	0 (0,32)	0 (0,1)	OAS	+	0	0 (0,11)	1 (0,42)	0	-	+	ND	0 (0,1)	-	ND	ND	0 (0,06)	ND	ND	RK	+	2 (0,88)
31	RRM 8838	38/M	AE,U	+	2 (0,73)	3 (6,64)	U	+	3 (6,77)	3 (5,28)	3 (6,35)	0	-	+	2 (2,06)	2 (3,17)	A	+	2 (1,23)	2 (1,17)	2 (1,59)	0	-	-	2 (1,62)
32	NPT 6212	28/F	OAS	+	2 (0,75)	0 (0,06)	-	-	ND	1 (0,66)	0	0	-	ND	ND	0 (0,05)	A	+	1 (0,5)	0 (0,06)	0	0	R	+	6 (>100)
33	DPM 1252	26/F	AE	+	1 (0,67)	2 (2,19)	AE	+	3 (5,82)	2 (3,19)	ND	ND	AE	+	2 (2,79)	2 (1,27)	AE	+	1 (0,55)	1 (0,64)	ND	ND	-	-	1 (0,55)
34	EMM 11369	43/F	-	+	ND	0 (0,25)	U	+	2 (0,79)	2 (0,71)	ND	0	OAS	+	1 (0,57)	1 (0,62)	OAS	+	1 (0,5)	0 (0,10)	ND	ND	-	-	0
35	GVC 6391	23/F	A	+	2 (2,1)	3 (11,4)	-	-	ND	3 (11,4)	3 (10,7)	2 (3)	-	-	ND	3 (8,35)	A	+	2 (0,75)	1 (0,44)	2 (0,8)	0	R	+	2 (1,66)
36	MMM 1365	15/F	OAS	+	0 (0,34)	2 (3,22)	OAS	+	3 (4)	3 (6,02)	3 (5,34)	1 (0,5)	unbekannt	ND	ND	3 (6,03)	OAS	+	2 (1,08)	2 (2,59)	2 (2,47)	1 (0,5)	R	+	5 (99,08)
37	ME 8673	31/F	-	-	ND	0 (0,22)	OAS	+	4 (37,5)	1 (4,67)	1 (0,59)	ND	AE, R, A	+	1 (0,54)	1 (0,46)	-	ND	0 (0,02)	ND	ND	RK	+	3 (9,2)	
38	MJBC 3549	24/F	-	-	ND	2 (0,84)	AE	+	2 (1,12)	1 (0,64)	2 (0,87)	0	AE, R, A	-	1 (0,38)	1 (0,62)	unbekannt	-	ND	1 (0,49)	ND	ND	R	+	0
39	OPN 4203	24/M	-	-	ND	0 (0,25)	U/AE	+	2 (1,39)	1 (0,61)	2 (1,27)	ND	OAS, U	+	0 (0,32)	0 (0,26)	-	-	ND	0 (0,05)	ND	ND	R	+	1 (0,51)
40	OMS 8181	19/M	-	+	ND	3 (4,6)	U/AE	+	3 (4,05)	3 (5,3)	3 (5,52)	ND	OAS, U	+	2 (2,76)	3 (4,16)	AE	+	1 (0,6)	2 (2,08)	2 (2,45)	ND	-	-	0
41	MDC 2473	17/F	-	-	ND	1 (0,53)	OAS/AE	+	2 (2,05)	2 (2,05)	ND	ND	OAS, U	+	2 (1,19)	2 (1,93)	-	-	ND	0 (0,31)	ND	ND	RK	+	4 (21,5)
42	IGB 7881	30/F	-	+	ND	0 (0,11)	U/AE	+	0	0 (0,02)	0	0	OAS, AE	-	0	0 (0,11)	-	-	0	0 (0,04)	ND	ND	RK	+	3 (3,8)
43	AGG 8086	7/F	AE	+	0 (0,06)	2 (1,58)	AE	+	3 (5,32)	3 (4,25)	3 (3,81)	ND	AE	+	2 (1,21)	2 (1,95)	-	+	1 (0,4)	1 (0,62)	2 (1,33)	0	-	-	0
44	ICF 7535	26/F	-	-	ND	4 (37,4)	AE	+	4 (37,5)	1 (4,67)	1 (0,59)	ND	AE, R, A	+	3 (9,99)	4 (46,5)	-	-	3 (15,1)	3 (13,9)	3 (15,1)	3 (7,3)	R	+	1 (0,66)
45	MRO 7528	38/F	-	ND	ND	0 (0,47)	OAS	+	1 (0,38)	0 (0,05)	ND	ND	OAS	+	0	0 (0,05)	OAS	+	2 (2,0)	0 (0,05)	ND	0	R/AS	+	3 (4,44)
46	RGP 8074	20/F	-	-	ND	3 (4,64)	U	+	3 (3,9)	3 (5,7)	3 (5,09)	ND	OAS	+	2 (0,84)	3 (5,4)	OAS	+	2 (0,71)	2 (1,86)	2 (2,09)	0	RK	+	ND
47	RMJ 10440	10/F	-	-	ND	0 (0,19)	U	+	2 (1,28)	2 (1,05)	2 (1,93)	0	-	ND	1 (0,38)	-	-	ND	0 (0,06)	ND	ND	ND	-	-	0
48	JGL 10571	12/M	-	-	ND	3 (16,4)	A	-	0	0 (0,05)	0	0	OAS	+	0 (0,14)	0 (0,03)	-	-	ND	0 (0,04)	ND	ND	R	+	3
49	CMC 10585	34/M	-	-	ND	0 (0,17)	U	+	2 (0,79)	1 (0,37)	1 (0,68)	0	-	ND	ND	0 (0,26)	-	-	0	0 (0,19)	0	0	-	-	ND
50	LGB 10005	14/F	-	+	ND	2 (1,63)	U/OAS	+	2 (1)	2 (1,43)	2 (1,56)	0	-	ND	ND	2 (1,41)	-	+	1 (0,56)	1 (0,51)	1 (0,54)	0	RK	+	2
51	ELC 9318	30/F	A	-	0 (0,03)	0 (0,06)	OAS	+	0	0 (0,17)	0	0	AE	-	0 (0,28)	0 (0,19)	-	-	ND	0 (0,04)	ND	ND	RK	+	2

F: Frau; M: Mann; OAS: Orales Allergie Syndrom; U: Urtikaria; A: Anaphylaktischer Schock; G: Gastrointestinale Erkrankung; AE: Angioedema; R: Rhinitis; RK: Rhinokonjunktivitis; D: Dermatitis; AS: Asthma; -: negativ; +: positiv; ND: Nicht bestimmt; ND*: Nicht bestimmt wegen schwerer atopischer Dermatitis oder wegen Aversion gegen das Lebensmittel. Der Skin Prick Test (SPT) wurde ab einer Quaddelgröße von 3 mm als positiv gewertet. ImmunoCAP-Ergebnisse wurden in Klasse (U/ml) angegeben.

9.1.2 Spanische Lebensmittelallergiker Teil 2

Nr.	Serum	Alter/ Geschlecht	zusätzliche Lebensmittelallergien
1	MLR 10560	33/F	Spargel
2	MAE 8608	34/F	Erdnuss, Walnuss, Mais
3	LMC 11362	38/F	Walnuss, Apfel
4	LCGH 9343	25/F	Erdnuss, Pfirsichschale, Apfel, Birnenschale
5	YSF 8695	36/F	Tomate, Banane
6	STV 1035	30/F	grüne Bohnen
7	MNF 11539	28/F	Erdnuss, Walnuss
8	AMA 7334	27/F	Erdnuss, Sonnenblumenkerne, Mais
9	SGR 7268	33/F	Erdnuss, Walnuss, Sonnenblumenkerne, Apfel
10	SSG 7799	28/F	Walnuss, grüne Bohnen
11	EDP 6491	25/F	Erdnuss, Melone
12	AFC 7241	34/M	Erdnuss, Tomate, Apfel, Zwiebel
13	MMG 4265	24/F	Erdnuss, Mais, Apfel
14	GGG 7306	24/F	Erdnuss, grüne Bohnen
15	NSR 8059	31/F	Granatapfel, Apfel
16	EBO 7957	30/F	Erdnuss, Tomate
17	EMB 8798	35/F	Walnuss
18	MSCH 7443	27/F	-
19	OSN 2932	22/F	Marone
20	MLM 7427	34/M	Weintraube, Soyabohne
21	NMM 3986	32/F	-
22	FGT 7322	26/M	Erdnuss, Walnuss
23	EMC 4359	8/M	Ananas, Melone
24	JSM 8547	33/M	Erdnuss
25	RFJ 1360	42/F	-
26	PAL 7944	6/F	Walnuss, Apfel
27	PGR 10656	24/F	Erdnuss, Walnuss, Apfel, Birne, Aprikose, Nektarine, Kiwi, Mandel, Sellerie
28	EMG 10949	30/F	Erdnuss, Walnuss, Mais
29	ABR 11714	35/F	Grapefruit, Tomate, Mais, Walnuss, Sonnenblumenkerne, grüne Bohnen
30	MPC 9994	26/F	Erdnuss
31	RRM 8838	38/M	Erdnuss, Walnuss, Getreide, Pistazien
32	NPT 6212	28/F	Fisch
33	DPM 1252	26/F	Erdnuss, Walnuss, Apfel, Birne, Kiwi, Mandel
34	EMM 11369	43/F	Erdnuss, Walnuss, Aprikose, Bohnen
35	GVC 6391	23/F	Erdnuss, Walnuss, Tomate, Banane
36	MMM 1365	15/F	Erdnuss, Walnuss
37	LME 8673	31/F	-
38	MJC 3549	24/F	Erdnuss, Walnuss, Melone
39	OPN 4203	24/M	Erdnuss, Apfel, Kiwi, Pflaume
40	OMS 8181	19/M	Apfel
41	MDC 2473	17/F	Apfel, Melone
42	IGB 7881	30/F	Erdnuss, Walnuss
43	AGG 8066	7/F	Erdnuss
44	SCP 7535	26/F	Erdnuss, Walnuss
45	MRO 7528	38/F	Kiwi, Apfel, Birne
46	RGP 8074	20/F	Tomate, Kiwi, Sonnenblumenkerne, Reis, Mais, Ananas
47	RMJ 10440	10/F	-
48	JGL 10571	12/M	Kiwi
49	CMC 10585	34/M	-
50	LGB 10005	14/F	Erdnuss, Kiwi, Birne, Sonnenblumenkerne
51	ELC 9318	30/F	Erdnuss, Walnuss, Apfel, Kiwi, Trockenfrüchte

10. Publikationen und Präsentationen

10.1 Publikationen:

C. Hartz, MS. Miguel Moncin, A. Cistero-Bahima, K. Foetisch, K. Metzner, A. Conti, J. Lidholm, S. Vieths and S. Scheurer.

Molecular characterisation of Lac s 1, the major allergen from lettuce (*Lactuca sativa*). *Molecular Immunology*, 2007 Apr;44(11):2820-30.

I. Lauer, M. Miguel-Moncin, T. Abel, K. Foetisch, **C. Hartz**, D. Fortunato, A. Cistero-Bahima, S. Vieths and S. Scheurer.

Identification of a plane pollen Lipid Transfer Protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach LTP, Pru p 3.

Clinical Experimental Allergy, 2007 Feb;37(2):261-9.

S. Scheurer, I. Lauer, K. Foetisch, MS. Miguel Moncin, M. Retzek, **C. Hartz**, E. Enrique, J. Lidholm, A. Cistero-Bahima and S. Vieths.

Strong allergenicity of Pru av 3, the Lipid Transfer Protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004 Oct;114(4):900-7.

10.2 Präsentationen:

03.2006 AAAAI (American Academy of Allergy, Asthma and Immunology) 62nd Annual Meeting, Miami Beach, Florida, USA. (Poster-Präsentation)

"Cross-reactivity among Pru p 3 and Cor a 8 with different IgE-binding capacities"

03.2005 GDCh (Gesellschaft Deutscher Chemiker), Jahrestagung Regionalverband Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft-FG in der GDCh, Frankfurt am Main. (Vortrag)

"Bedeutung von Lipid-Transfer Proteinen (LTPs) bei der Soforttypreaktion gegen Salat (*Lactuca sativa*)"

- 04.2004 9th International symposium on immunological, chemical and clinical problems of food allergy, Budapest, Ungarn.
(Poster-Präsentation)
C. Hartz, M. San Miguel-Moncin, I. Lauer, T. Haase, M. Krail, A. Cistero-Bahima, S. Vieths, S. Scheurer.
"Adverse reaction to lettuce (*Lactuca sativa*) varieties: Identification of Lipid-transfer-proteins (LTPs) as major allergens"
- 04.2004 DGAKI (Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie e.V) Allergie-Workshop Mainz.
(Vortrag)
"Bedeutung von Lipid-Transfer Proteinen (LTPs) bei der Soforttypreaktion gegen Salat (*Lactuca sativa*)"
- 06.2003 Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spanien. (Vortrag)
"Relevance of nsLTPs in the pathogenesis of food allergy"

11. Danksagung

Ein besonders herzlicher Dank geht an Herrn Dr. S. Scheurer für die außerordentlich gute Betreuung während der gesamten Dissertation. Seine ständige Hilfsbereitschaft zur Lösung jeglicher Probleme und die stete Bereitschaft zur Diskussion der wissenschaftlichen Daten hat meine Arbeit sehr bereichert.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Vieths möchte ich mich ebenso herzlich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Abteilung Allergologie des Paul-Ehrlich-Institutes bedanken. Ich danke ihm besonders für die motivierenden Diskussionen und die ständige Bereitschaft zur Lösung wissenschaftlicher Probleme.

Herrn Prof. Dr. A. Mosandel danke ich recht herzlich für die Bereitschaft die Dissertation als Vertreter der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main zu betreuen.

Bei Mechthild Retzeck und Yvonne Lorenz, mit denen ich mir das Labor geteilt habe und die mehr als nur Kolleginnen für mich waren, möchte ich mich außerordentlich herzlich für die tägliche Unterstützung und Problemlösung in allen Lebenslagen bedanken.

Bei Annette Jamin möchte ich mich recht herzlich für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Ein ausserordentlich herzlicher Dank geht an Dr. Andreas Reuter, der mir in der Endphase meiner Arbeit mit vielen konstruktiven Vorschlägen sehr geholfen hat. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Massenspektrometriedaten bedanken.

Herrn Dr. Kay Fötisch danke ich sehr für die aufwändigen Durchführungen der Histamin-Freisetzung-Tests.

Bei Dr. Gerald Reese, Melanie Albrecht und Stefanie Randow bedanke ich mich für die außerordentlich gute Kooperation.

Besonders dankbar bin ich für die Hilfe von Kay-Martin Hanschmann bei der Auswertung der statistischen Analysen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Arbeit an der FPLC-Anlage bedanke ich mich bei Frau Dr. Iris Lauer.

Frau R. Höppner und Michaela Gubesch danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der serologischen Untersuchungen.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Fachgebiete 5/01 und 5/4 für ihre Unterstützung im Laboralltag und der Hilfsbereitschaft zur Beantwortung aller Fragen. Ganz besonders möchte ich mich hier nochmal bei Dr. Christian Schörner und Dr. Gerald Reese für die konstruktiven Vorschläge, die meine Arbeit sehr bereichert haben, bedanken.

Weiter möchte ich mich bei Dr. med. A. Cistero-Bahima und Dr. med. M. San Miguel für die Bereitstellung der spanischen Patientenserum und die sehr gute Kooperation bedanken.

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Jonas Lidholm, der mir nicht nur bei Problemen während der Proteinexpression in *P. pastoris* viele hilfreiche Tipps hat zukommen lassen, sondern auch in der einen oder anderen Notsituation durch die Bereitstellung von experimentellen ImmunoCAPs ausgeholfen hat.

Für eine sehr gute Zusammenarbeit bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Prof. Dr. B. Bohle und Dr. A. Conti.

Mein persönlicher Dank geht an all meine Freunde, auf deren Unterstützung und Verständnis ich mich jederzeit während der Dissertation verlassen konnte. Insbesondere möchte ich mich sehr herzlich bei Patricia Bach, Silvia Hahn, Daniel Müller, Julian Flockton und Tobias Wingerter bedanken, die zu jeder Tages- und Nachtzeit ein offenes Ohr für mich hatten.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, meinen Eltern Klaus und Gisela, sowie meiner Schwester Claudia, bedanken, die mich in jeder Lebenslage motiviert und unterstützt haben.

12. Lebenslauf

Person

Christina Hartz

geboren am 26.01.1978 in Offenbach am Main

Berufstätigkeit

01.2003-07.2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) in Langen in der Abteilung Allergologie, Fachgebiet 5/4 „Entwicklung und Standardisierung“

Berufliche Ausbildung

seit 01.2003 Promotion am Paul-Ehrlich-Institut in Langen in der Arbeitsgruppe von Dr. S. Scheurer (FG 5/4) zum Thema: "Nicht spezifische Lipidtransfer Proteine: Untersuchungen zur Prävalenz und IgE-Kreuzreaktivität bei potenziell schweren Formen der Lebensmittelallergie."

10.2001-07.2002 Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut in Langen in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. R. Löwer (PR-2) zum Thema: "Regulation der Expression von HDTV/HERV-K: Kartierung von Aminosäuren, die essentiell für den nukleären Import und die RNA-Bindung des Rec-Proteins sind."

10.1997-07.2002 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Schulbildung

09.1988-07.1997 Adolf-Reichwein-Gymnasium in Heusenstamm

08.1984-07.1988 Astrid-Lindgren-Schule in Dietzenbach