

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Abteilung Klinische Medizin  
Prof. Dr. Peter Zabel

---

**Untersuchungen zum Allergenrepertoire der Erdnuss:  
Molekulare Charakterisierung von  
Ara h 7, Ara h 8, Oleosin und LTP**

**Inauguraldissertation**  
**zur Erlangung der Doktorwürde**  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-

vorgelegt von  
Susanne Riecken  
aus Osnabrück

Lübeck, 2008

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Klassifikation von allergischen Reaktionen.....	1
1.2 Pathomechanismus der Typ I-Allergie.....	3
1.3 Erdnussallergie.....	4
1.3.1 Epidemiologie.....	4
1.3.2 Diagnostik und Therapie.....	5
1.3.3 Allergenspektrum der Erdnuss.....	6
1.3.3.1 Die Hauptallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3/4.....	6
1.3.3.2 2S-Albumine der Erdnuss: Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7.....	7
1.3.3.3 Mit Pollenallergenen kreuzreaktive Erdnussallergene: Ara h 5 und Ara h 8.....	8
1.3.3.4 Oleosin, LTP und PNA als potentielle Allergene der Erdnuss.....	9
1.4 Zielsetzung.....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3 DNA- und Protein-Marker.....	11
2.1.4 Bakterienstämme/Zelllinien.....	12
2.1.5 Vektoren.....	13
2.1.6 Oligonukleotide.....	14
2.1.7 Antikörper und Patientenserum.....	15
2.1.8 Verwendete Erdnussorten.....	17
2.1.9 Computerprogramme.....	17
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1 Methoden zur DNA-Analyse.....	18
2.2.1.1 Präzipitation von DNA.....	18
2.2.1.2 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Fällung.....	18
2.2.1.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	18

---

2.2.1.4	Analytische Agarosegelelektrophorese.....	19
2.2.1.5	Präparative Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.2	Enzymatische Modifizierung von DNA.....	20
2.2.2.1	DNA-Restriktion.....	20
2.2.2.2	Phosphorylierung von DNA.....	21
2.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	22
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.2.3.1	Standard-PCR.....	23
2.2.3.2	PCR aus Kolonien.....	24
2.2.4	Isolation von genomischer DNA aus der Erdnuss.....	24
2.2.5	Herstellung von cDNA.....	25
2.2.5.1	Isolation von RNA aus der Erdnuss.....	25
2.2.5.2	Erststrang-Synthese.....	25
2.2.6	Sequenzierung von DNA.....	25
2.2.7	<i>E. coli</i> : Transformation und Expression.....	26
2.2.7.1	Nährmedien zur Kultivierung.....	26
2.2.7.2	Kultivierung und Lagerung.....	26
2.2.7.3	Transformation mittels Hitzeschock-Methode.....	27
2.2.7.4	Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
2.2.7.5	Expression von rekombinanten Proteinen.....	28
2.2.7.6	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.3.1	Herstellung von Erdnussextrakten.....	30
2.3.2	Reinigung von Ölkörperchen.....	30
2.3.3	Proteinbestimmung.....	32
2.3.4	Elektrophoretische Trennung von Proteinen.....	32
2.3.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.3.4.2	Coomassie-Färbung.....	34
2.3.5	Semidry-Blotting.....	35
2.3.6	Nachweismethoden von Proteinen auf Membranen.....	36
2.3.6.1	Proteinfärbung mittels India Ink.....	36
2.3.6.2	Spezifischer Proteinnachweis mittels Immunoblot.....	36
2.3.6.3	Verstärkung der Immunnachweise durch Chemilumineszenz.....	37
2.3.7	Säulenchromatographische Aufreinigung von Proteinen.....	38

2.3.7.1	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	38
2.3.7.2	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	39
2.3.7.3	Ionenaustauschchromatographie (IEC).....	40
2.3.7.4	Protein G-Affinitätschromatographie.....	41
2.3.8	Reduktion und Alkylierung.....	42
2.3.9	Tryptischer Verdau.....	42
2.3.10	MALDI-TOF-MS.....	43
2.3.11	ESI-FT-ICR-MS.....	43
2.3.12	Proteinsequenzierung.....	44
2.3.13	Quantifizierung von Ara h 1 mittels ELISA.....	44
2.3.13.1	Indirekter Inhibitions-ELISA.....	46
2.3.13.2	Sandwich-ELISA.....	47
2.3.14	Herstellung von Antiserum mit „multiplen antigenen Peptiden“.....	48
2.3.15	RNase-Aktivitätsnachweise.....	48
2.3.15.1	Zymogramm.....	48
2.3.15.2	Untersuchung im Agarosegel.....	50
2.3.15.3	Untersuchung mittels Photometer.....	51
2.4	Zellbiologische Methoden.....	51
2.4.1	Kultivierung von Ratten-Basophilen-Leukämiezelllinien (RBL-Zellen)...	51
2.4.2	Auftauen und Einfrieren von RBL-Zellen.....	52
2.4.3	Mediatorfreisetzungstest aus RBL-Zellen (RBL-Test).....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
3.1	Ara h 8.....	56
3.1.1	Etablierung einer Reinigungsstrategie für nAra h 8.....	56
3.1.2	Klonierung einer neuen Ara h 8 Isoform.....	60
3.1.3	Biochemische und physikochemische Untersuchung des nAra h 8.....	63
3.1.4	RNase-Aktivitätsnachweis.....	66
3.2	Oleosin.....	68
3.2.1	Herstellung von Antiserum gegen Oleosin.....	68
3.2.2	Strategien zur Herstellung und Klonierung von Oleosin.....	70
3.2.3	Expression und Reinigung von Oleosin.....	74
3.2.4	Gewinnung und Reinigung von natürlichem Oleosin.....	77
3.2.5	IgE-Reaktivität von Oleosin.....	78

---

<b>3.3 LTP</b> .....	<b>81</b>
3.3.1 Klonierung der LTP Gensequenz.....	81
3.3.2 Expression und Reinigung von LTP.....	84
3.3.3 Nachweis des natürlichen LTPs.....	86
<b>3.4 Ara h 7</b> .....	<b>88</b>
3.4.1 Klonierung der Ara h 7 Gensequenz.....	88
3.4.2 Identifizierung des natürlichen Ara h 7.....	90
<b>3.5 Erdnussvarietäten aus Südostasien</b> .....	<b>93</b>
3.5.1 Untersuchung von Extrakten verschiedener Varietäten.....	93
3.5.2 Etablierung eines Ara h 1-ELISAs.....	95
3.5.3 Extraktanalyse mittels der 2D-DIGE Technik.....	98
3.5.4 Vergleich der biologischen Reaktivität.....	100
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>103</b>
<b>4.1 Reinigung von nAra h 8 deckt eine neue Isoform auf</b> .....	<b>105</b>
4.1.1 Reinigung von Ara h 8 aus Erdnussextrakt.....	105
4.1.2 Bestätigung einer neuen Ara h 8 Isoform.....	107
4.1.3 Funktionelle Charakterisierung von Ara h 8.....	108
<b>4.2 Oleosin</b> .....	<b>110</b>
4.2.1 Allergencharakterisierung: Expression von Oleosin.....	110
4.2.2 Reinigung von natürlichem Oleosin.....	113
4.2.3 Nachweis der IgE-Reaktivität .....	113
<b>4.3 LTP</b> .....	<b>115</b>
4.3.1 Identifizierung eines neuen Erdnussallergens.....	115
4.3.2 Charakterisierung des natürlichen LTPs.....	118
<b>4.4 Ara h 7</b> .....	<b>119</b>
4.4.1 Aufdeckung und Charakterisierung einer neuen Isoform.....	119
4.4.2 Identifizierung von natürlichem Ara h 7.....	120
<b>4.5 Allergen-defiziente Erdnüsse aus Südostasien</b> .....	<b>122</b>
4.5.1 Etablierung eines ELISAs zur Bestimmung von Ara h 1.....	122
4.5.2 Bestimmung der biologischen Reaktivität mittels RBL-Test.....	123
4.5.3 Reduzierter Allergengehalt korreliert nicht mit reduzierter Allergenität...124	
<b>4.6 Einsatz von Allergenen in Diagnostik und Therapie</b> .....	<b>126</b>

<b>5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>145</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>157</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>160</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>161</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
2D-DIGE	zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese
Acc no.	GenBank accession number
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl. "antigen presenting cell")
APS	Ammoniumpersulfat
Ara h	Allergen der Erdnuss ( <i>Arachis hypogaea</i> )
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl. "bovine serum albumin")
c	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA (engl. "complementary DNA")
ddH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. "deoxyribonucleic acid")
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	engl. "enzyme linked immunosorbent assay"
ESI-FT-ICR	Elektrospray-Ionisation-Fourier Transform-Ionencyclotronresonanz
EST	engl. "expressed sequence tags" - Sequenzen
Fc	konstante Region des Antikörpers (engl. "fragment crystallisable")
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (engl. "foetal calf serum")
gDNA	genomische DNA
h	Stunde (engl. "hour")
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
His-Tag	Histidin-Anhang
HLA	englisch für "Human Leucocyte Antigen"
HPLC	englisch für "High Performance Liquid Chromatography"
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

---

LB	engl. "lysogeny broth"
LTP	Lipidtransferprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	engl. "matrix assisted laser desorption/ionisation"
MCS	engl. "multiple cloning side"
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. "major histocompatibility complex")
mRNA	engl. "messenger RNA"
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (engl. "molecular weight")
n	natürlich
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
nsLTP	nicht-spezifisches Lipidtransferprotein
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. "open reading frame")
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. "polymerase chain reaction")
pI	isoelektrischer Punkt
PR	engl. "pathogenesis related"
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
RBL	Ratten-Basophilen-Leukämiezelllinien
RNA	Ribonukleinsäure (engl. "ribonucleic acid")
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. "sodium dodecyl sulfate")
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. "Tris-buffered saline")
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	engl. "time of flight"
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
Trx-Tag	Thioredoxin-Anhang
U	engl. "unit"
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	engl. "volume per volume"
w/v	engl. "weight per volume"
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

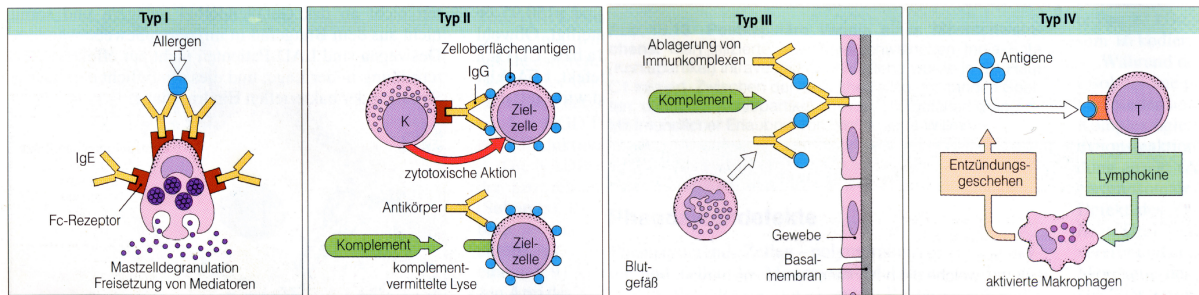
# 1 Einleitung

Allergische Erkrankungen haben in den letzten Jahrzehnten vor allem in den Industrienationen zunehmend an Bedeutung gewonnen (Bachert *et al.* 2001). Heute gehören sie international zu den häufigsten chronischen Erkrankungen und sind zu einem wichtigen sozioökonomischen Problem geworden. Als Ursache für die anhaltende Zunahme werden vor allem veränderte Umweltfaktoren wie Umweltverschmutzung, erhöhte Allergenexposition, veränderte Ernährungsgewohnheiten und erhöhte Hygienestandards sowie die genetisch bedingte Veranlagung (Atopie) diskutiert (Ring *et al.* 2001). Die Symptome sind vielfältig, unterschiedlich stark ausgeprägt und manifestieren sich an verschiedenen Organsystemen. Sie reichen von allergischer Rhinitis, Asthma bronchiale, Störungen des Gastrointestinaltraktes, Ekzembildung bis hin zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schockreaktionen (Ring und Darsow 2002).

Der Begriff Allergie wurde bereits im Jahre 1906 von Clemens von Pirquet eingeführt. Die Allergie wird als eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer Überempfindlichkeitsreaktion gegen normalerweise harmlose und nicht infektiöse Stoffe, die sogenannten Allergene, definiert. Meistens handelt es sich dabei um Proteine, es können aber auch chemisch reaktive niedermolekulare Verbindungen sein, die kovalent an körpereigene Proteine und Zellstrukturen binden und diese dadurch verändern. Die Frage, was ein Protein zum Allergen macht, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Obwohl die bekannten Allergene keine gemeinsamen strukturellen Eigenschaften aufweisen, scheinen einige Eigenschaften typisch für viele Allergene zu sein. Dies sind unter anderem ein Molekulargewicht von ca. 10-70 kDa, Stabilität und eine hohe Löslichkeit im wässrigen Milieu (Janeway *et al.* 2002).

## 1.1 Klassifikation von allergischen Reaktionen

Die allergischen Erkrankungen lassen sich nach Coombs und Gell (1963) anhand ihrer unterschiedlichen Immunreaktionen in vier Typen unterteilen, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind.



**Abbildung 1: Einteilung der Allergietypen anhand des Pathomechanismus [verändert nach Roitt et al. 2001].**

Bei der Typ I-Reaktion handelt es sich um eine IgE-vermittelte Reaktion, die auch aufgrund der innerhalb von Minuten auftretenden Symptome als Allergie vom Soforttyp bezeichnet wird. Das Allergen vernetzt dabei spezifisch die an die Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper, wodurch die Zelle degranuliert und Mediatoren freigesetzt werden. Dies hat akute Entzündungsreaktionen mit Symptomen wie allergische Rhinitis und bronchiales Asthma bis hin zum anaphylaktischen Schock zur Folge.

Die allergische Reaktion vom Typ II ist eine zytotoxische Reaktion. Durch Interaktion von zellgebundenem Antigen und zirkulierenden IgG- oder IgM-Antikörpern kommt es zu einer Aktivierung der Komplementkaskade, die eine Lyse der Zellen induziert. Diesem Allergietyp liegt z.B. die Rhesusinkompatibilität (*Erythroblastosis fetalis*) zwischen einer Rhesusnegativen Mutter und einem Rhesuspositiven Kind zugrunde.

Die Typ III-Reaktion wird auch Immunkomplexerkrankung genannt. Hierbei kommt es zu einer Ablagerung der aus zirkulierendem Antigen und IgG- bzw. IgM-Antikörpern gebildeten Komplexe. Dies bewirkt die Aktivierung des Komplementsystems und die Anlockung von Neutrophilen. Diese setzen lysosomale Proteasen frei und führen damit zur Schädigung des Gewebes. Als Beispiel kann die allergische Alveolitis aufgeführt werden.

Die T-Zell-vermittelte Typ IV-Reaktion zeichnet sich dadurch aus, dass sensibilisierte T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) das zellgebundene Allergen erkennen und Cytokine freisetzen. Dadurch werden cytotoxische T-Zellen und Makrophagen stimuliert und es wird eine Entzündungsreaktion induziert. Die Symptome treten erst nach 24-48 Stunden auf, so dass dieser Typ auch als Spätreaktion bezeichnet wird. Typische Beispiele sind die Kontaktekzeme wie im Fall der Nickelallergie.

## 1.2 Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Im Fokus dieser Arbeit steht die Erdnussallergie, die zur Typ I-Allergie gezählt wird. Der Pathomechanismus lässt sich in zwei Abschnitte gliedern, eine Sensibilisierungs- und eine Effektorphase (Abbildung 2).

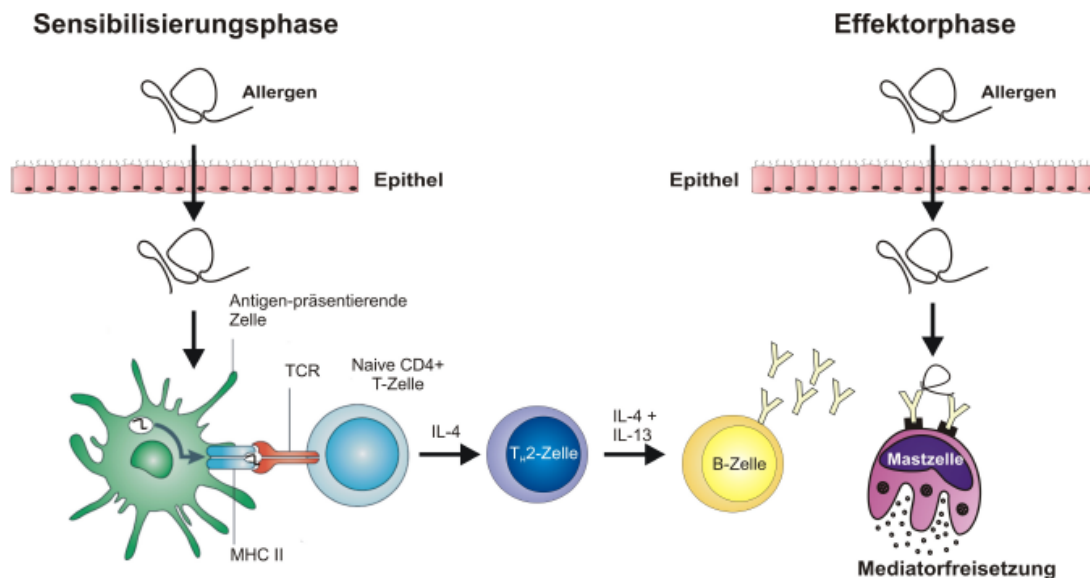


Abbildung 2: Pathomechanismus der Typ I-Allergie [verändert nach Roitt et al. 2001]

In der symptomlos verlaufenden Sensibilisierungsphase gelangen Allergene durch die Epithel-Barriere in den Körper, in dem sie von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritische Zellen) aufgenommen und prozessiert werden. Die Fragmente werden über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) auf der Zelloberfläche präsentiert. An diesem Komplex binden spezifisch naive T-Helferzellen über den T-Zellrezeptor (TCR) (Rammensee *et al.* 1993). Die dadurch aktivierten T-Helferzellen differenzieren in T<sub>H</sub>2-Zellen und sezernieren die Cytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13). Diese veranlassen die Ausreifung von B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen. Die sezernierten IgE-Antikörper binden mit ihrem Fc-Teil an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen (Kinet 1999).

Die Effektorphase wird eingeleitet, indem bei erneuter Allergen-Exposition die auf den Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper durch die Epitope eines Allergens kreuzvernetzt

werden. Dies führt zur Freisetzung von präformierten Mediatoren wie Histamin, den Proteinasen Chymase und Tryptase und zur Neusynthese von Prostaglandinen und Leukotrienen, die an den Erfolgsorganen die klinischen Symptome auslösen.

## **1.3 Erdnussallergie**

### **1.3.1 Epidemiologie**

Die Prävalenz von Nahrungsmittelallergien ist stark von den Ernährungsgewohnheiten abhängig, so dass geographische Unterschiede zu beobachten sind. Im zentralen Europa und in den USA sind vor allem Allergien gegen Kuhmilch, Hühnereier, Fisch, Meeresfrüchte, Nüsse, Leguminosen wie Erdnüsse oder Soja und Früchte vorherrschend. Es zeigen sich aber auch Unterschiede des Allergiespektrums zwischen Kindern und Erwachsenen. Kinder entwickeln hauptsächlich Allergien gegen Kuhmilch und Hühnereier, während im Erwachsenenalter allergische Reaktionen auf Nüsse und Früchte dominieren (Ring *et al.* 2001, Sampson 2004). Bei der Erdnussallergie ist eine Zunahme der Sensibilisierungsrate und gleichzeitig ein Absinken des Sensibilisierungsalters zu beobachten (Grundy *et al.* 2002). Bereits geringste Dosen von 100 µg können klinische Symptome auslösen, die Schwelle liegt dabei um das 100-fache niedriger als bei anderen Lebensmitteln (Hourihane *et al.* 1997). Die Sensibilisierung findet meistens im frühen Kindesalter statt. Nur 10-20 % der Erdnussallergiker verlieren ihre Sensitivität gegenüber der Erdnuss, während die Rate bei Nahrungsmitteln wie Kuhmilch und Hühnerei bei 80-85 % liegt (Skolnick *et al.* 2001, Fleischer *et al.* 2003). Untersuchungen zufolge reagiert derzeit 1 % der Bevölkerung in den USA allergisch auf Erdnüsse (Sicherer *et al.* 2003). Aufgrund der zunehmenden Verwendung von Erdnüssen in der Verarbeitung von Lebensmitteln ist die Tendenz steigend. Dieser Trend ist ebenso in westeuropäischen Ländern zu beobachten. In Großbritannien ist seit 1989 ein dramatischer Anstieg auf >1 % der Bevölkerung zu verzeichnen (Grundy *et al.* 2002). Genaue Zahlen für Deutschland existieren aufgrund fehlender Studien leider nicht. Aber auch in Asien scheint die Erdnussallergie ein zunehmendes Problem zu sein (Chiang *et al.* 2007). Fakt ist, dass die Erdnussallergie die wichtigste Nahrungsmittelallergie mit der höchsten Prävalenz in den USA und Europa ist.

### 1.3.2 Diagnostik und Therapie

Im Vergleich zu anderen Lebensmitteln zeichnet sich die Erdnussallergie durch ihre besonders schwere Symptomatik aus. Die Exposition von geringen Erdnussmengen löst bei vielen Erdnussallergikern heftige allergische Reaktionen aus bis hin zum anaphylaktischen Schock. Während die Allergiediagnostik sich in den letzten Jahren deutlich verbessert hat, ist es bis heute nicht gelungen, eine kausale Therapiestrategie zur Behandlung der Erdnussallergie zu entwickeln. Die einzige Möglichkeit, allergische Reaktionen zu umgehen, besteht somit ausschließlich in der Karenz erdnusshaltiger Lebensmittel. Die Deklarationspflicht erdnusshaltiger Lebensmittel vereinfacht diese Strategie, jedoch garantiert dies keine 100 %ige Sicherheit. Vielfach werden Erdnussproteine verschleppt und dadurch Kontaminationen von erdnussfreien Lebensmitteln verursacht. Zudem bergen öffentliche Plätze, wie Restaurants und Schulen die Gefahr des unbewussten Erdnussverzehr.

Die Entwicklung einer Therapie für Erdnussallergiker scheiterte bislang an den unabschätzbaren Nebenwirkungen, die während der Immuntherapie auftreten können. In verschiedenen Studien kam es vielfach zu systemischen Reaktionen und sogar zu anaphylaktischen Schockreaktionen (Oppenheimer *et al.* 1992, Nelson *et al.* 1997). Es besteht nach wie vor der eindeutige Bedarf einer sicheren und effizienten Therapie für Erdnussallergiker. Das realistische Ziel ist vorerst nicht eine Heilung der Erdnussallergie, sondern die Erhöhung der Toleranz, die den Verzehr von einigen wenigen Erdnüssen erlaubt.

Obwohl die Diagnose der Erdnussallergie durch die Analyse mittels Hautpricktests und Messungen von spezifischem IgE standardisiert worden ist, ist eine Verbesserung der Diagnostik weiterhin erforderlich. Die verschiedenen Testverfahren beruhen hauptsächlich auf der Verwendung von natürlichen Erdnussextrakten. Diese beinhalten neben den Allergenen auch nicht-allergene Proteine und variieren in ihrer Proteinzusammensetzung in Abhängigkeit von der Erdnusssorte, der Extraktionsmethode und den Lagerungsbedingungen. Einige Proteine, wie das Allergen Ara h 8, werden dabei gar nicht erfasst oder sind nur in geringer Konzentration vertreten. Eine Standardisierung und eine Komponenten-aufgelöste Diagnostik mit einzelnen Allergenen, natürlich oder rekombinant, würde eine optimale Allergiediagnostik gewährleisten (Astier *et al.* 2006).

### 1.3.3 Allergenspektrum der Erdnuss

1981 wurde Peanut-I als erstes Erdnussallergen identifiziert und isoliert (Sachs *et al.* 1981). Bis heute konnte in den über 30 verschiedenen Erdnussproteinen das Allergenspektrum auf acht Allergene erweitert werden (Tabelle 1), die zudem Isoformen aufweisen. Die Allergene werden bei dem Allergennomenklatur Subkomitee der „International Union of Immunological Societies“ (I.U.I.S.) registriert und in Anlehnung an den botanischen Namen der Erdnuss, *Arachis hypogaea* benannt, gefolgt von der Allergennummer, die in der Reihenfolge der Entdeckung vergeben wird.

**Tabelle 1: Übersicht der bestätigten und der vermuteten Erdnussallergene.**

Allergen	MW [kDa]	pI	Proteinfamilie	Erstbeschreibung
Ara h 1	63,5	5,4	Vicilin	Burks <i>et al.</i> (1995)
Ara h 2	17,3	5,7	2S Albumin	Burks <i>et al.</i> (1992)
Ara h 3	58,4	5,7	Glycinin	Rabjohn <i>et al.</i> (1999)
Ara h 4	61,0	5,5	Glycinin	Kleber-Janke <i>et al.</i> (1999)
Ara h 5	14,0	4,6	Profilin	Kleber-Janke <i>et al.</i> (1999)
Ara h 6	14,5	5,2	2S Albumin	Kleber-Janke <i>et al.</i> (1999)
Ara h 7	15,8	5,6	2S Albumin	Kleber-Janke <i>et al.</i> (1999)
Ara h 8	16,9	5,0	PR-10	Mittag <i>et al.</i> (2004)
Oleosin	18,4	9-10	n.d.	Pons <i>et al.</i> (1998)
LTP	ca. 9	basisch	nsLTP	-
PNA	26,7	5,0	n.d.	Burks <i>et al.</i> (1994)

#### 1.3.3.1 Die Hauptallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3/4

Die Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 gehören zu den Hauptallergenen der Erdnuss. Ara h 1 und Ara h 2 zeigen eine IgE-Reaktivität von über 95 % der Erdnuss-sensitiven Patientenserum (Burks *et al.* 1991, Burks *et al.* 1992, Burks *et al.* 1995, Stanley *et al.* 1997), Ara h 3 nur von 45 % (Rabjohn *et al.* 1999). Bei Ara h 4 handelt es sich nicht um ein eigenständiges Allergen. Es ist in seiner Proteinsequenz zu 92 % identisch mit Ara h 3 und müsste daher korrekterweise als Isoform aufgeführt werden. Daraus hat sich die

Benennung Ara h 3/4 entwickelt. Ara h 1 und Ara h 3/4 sind bereits in mehreren biochemischen und immunologischen Studien ausführlich analysiert worden. Das Glykoprotein Ara h 1 bildet wie andere 7S Globuline trimere Komplexe (Maleki *et al.* 2000) und ist zudem mit Ara h 3/4 in unterschiedlichen Verhältnissen vergesellschaftet, so dass Komplexe von 160-500 kDa gebildet werden (Boldt *et al.* 2005).

### **1.3.3.2 2S-Albumine der Erdnuss: Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7**

Die Allergene Ara h 6 und Ara h 7, wie auch Ara h 2 gehören zu den Conglutinen, die den 2S-Albuminen der Prolamin-Superfamilie zugeordnet werden (Kleber-Janke *et al.* 1999, Breiteneder und Mills 2005) und zeichnen sich durch einen hohen Cysteingehalt in ihrer Proteinsequenz aus. Die vielen Cysteinreste sind für Proteine der Prolamin-Superfamilien typisch und bilden ein konserviertes Muster (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C) (Kreis *et al.* 1985, Shewry *et al.* 2006). 2S-Albumine repräsentieren eine große Gruppe der Samenspeicherproteine, die in vielen dikotyledonen Pflanzen vertreten sind (Shewry *et al.* 1995) und Gegenstand umfangreicher biochemischer und immunologischer Untersuchungen sind.

Als Ara h 2 wurden zwei Isoformen identifiziert, die sich in einem Peptideinschub von 12 Aminosäuren unterscheiden (Chatel *et al.* 2003). Die biologische Funktion konnte der Eigenschaft eines Trypsininhibitors zugeordnet werden, die wie die IgE-Reaktivität durch Röstprozesse zunimmt (Maleki *et al.* 2000, Maleki *et al.* 2003, Gruber *et al.* 2005). Die Maillard-Reaktion, eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion, scheint diesen Effekt beizusteuern (Maleki *et al.* 2000, Maleki *et al.* 2003).

Kleber-Jahnke *et al.* (1999) identifizierten Ara h 6 und Ara h 7 als IgE-reaktive Proteine in der Erdnuss über eine cDNA Phagen-Display-Bibliothek. Dabei wurden cDNA-Expressionsprodukte auf Phagenoberflächen präsentiert und die Allergene durch ihre Affinität zu IgE selektiert. Aufgrund der relativ niedrigen IgE-Reaktivität (38 % bzw. 43 %) wurden sie als intermediäre Allergene eingestuft. Ara h 6 ist zu 53 % in seiner Proteinsequenz identisch mit Ara h 2 und weist ebenfalls eine starke Resistenz gegenüber Erhitzungs- und Verdauungsprozessen auf (Suhr *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu Ara h 2 und Ara h 6 konnte Ara h 7 bisher nur mittels Phage-Display gefunden und als Allergen identifiziert werden (Kleber-Janke *et al.* 1999), jedoch nicht das natürliche Protein nachgewiesen werden. Während die Proteinsequenz von Ara h 2 acht Cysteinreste und die von Ara h 6 zehn aufweist, verfügt Ara h 7 lediglich über sechs Cysteine. Diese Anzahl ist untypisch für Proteine der 2S-Albuminfamilie, deren konserviertes Muster aus acht Cysteinen besteht. Weitere Untersuchungen zum Ara h 7 sind nicht publiziert worden.

### **1.3.3.3 Mit Pollenallergenen kreuzreaktive Erdnussallergene: Ara h 5 und Ara h 8**

Ara h 5, das Erdnussprofilin, und Ara h 8, das dem Hauptallergen der Birke (Bet v 1) homologe Protein, sind die einzigen pollenassoziierten Allergene der Erdnuss und konnten bisher nur auf DNA-Ebene nachgewiesen werden (Kleber-Janke *et al.* 1999, Mittag *et al.* 2004). Ihre IgE-Reaktivität beruht auf Kreuzreaktivitäten mit homologen Aeroallergenen.

Kleber-Janke *et al.* (2001) konnten durch Inhibitionsversuche mit Ara h 5 Kreuzreaktivitäten zu Profilinen der Kirsche, Birne und des Selleries nachweisen, jedoch nicht zum Profilin der Birke. Entgegen der allgemeinen Hitzesensitivität von Profilinen (Breiteneder und Radauer 2004) weist Ara h 5 eine hohe Thermostabilität auf (Kleber-Janke *et al.* 2001).

Untersuchungen zum Ara h 8 konnten trotz der guten Charakterisierung des homologen Birkenpollenallergens Bet v 1 ebenfalls nur am rekombinanten Protein durchgeführt werden. Das natürliche Protein konnte bisher nicht aus der Erdnuss isoliert werden. Im Unterschied zum Ara h 5 ist Ara h 8 ein wichtiges Allergen für Birkenpollenallergiker (Mittag *et al.* 2004). 85 % der Patienten mit einer kombinierten Erdnuss- und Birkenpollenallergie reagieren mit rekombinantem Ara h 8. Dieses Protein gehört zu der Familie der PR-10 Proteine, die in die Abwehrreaktion der Pflanzen gegen Pathogene involviert sind, deren genaue Funktion aber noch unklar ist. Da das Ara h 8 ein für Birkenpollenallergiker bedeutendes Protein ist, ist die Isolierung der natürlichen Form von großem Interesse, um für die Diagnostik und Therapie eine Referenz zum rekombinanten Produkt zu haben. Zur Aufklärung der allergenen Wirkung ist die genaue Untersuchung zur biologischen Funktion unabdingbar.

#### 1.3.3.4 Oleosin, LTP und PNA als potentielle Allergene der Erdnuss

Oleosine sind strukturell sehr gut charakterisierte Proteine und sind in die Bildung und Stabilisierung von Ölkörperchen involviert, die als Speicherquelle für Triacylglycerole (TAG) dienen (Huang 1996). Ihre hohe Affinität zu Lipiden ist verglichen mit anderen Proteinen außergewöhnlich. Die hydrophilen N- und C-terminalen Bereiche des Oleosins liegen außen im Cytosol, während der zentrale hydrophobe Bereich in das lipophile Zentrum des Ölkörperchens hineinragt (Huang 1996). Das Erdnuss-Oleosin ist von Pons *et al.* (2002) als Minorallergen beschrieben worden. Bislang wurde es jedoch nicht vom I.U.I.S. Allergennomenklatur Subkomitee als Allergen anerkannt. Hierfür wird ein Nachweis von mindestens 5 reaktiven Patientenseren verlangt. Pons *et al.* konnten nur 3 positiv reagierende Erdnussallergiker von 14 getesteten nachweisen. In zwei weiteren Studien konnten sie die Reinigung des natürlichen Proteins zeigen (Pons *et al.* 1998, Pons *et al.* 2005). Das Protein wurde tryptisch verdaut und die erhaltenen Fragmente sequenziert. Ein Peptid entsprach dabei dem Oleosin aus der Sojabohne und diente als Ausgangspunkt für die Amplifikation des Gens, von dem dann die Proteinsequenz abgeleitet wurde (Pons *et al.* 2005). Obwohl diskutiert wird, ob Erdnussoleosin durch Verwendung von Erdnussöl in verschiedensten Salben und Kosmetika sensibilisierend wirkt, existieren erstaunlicherweise keine weiteren Studien über das Erdnussoleosin. In der Diagnostik wird das Oleosin allgemein nicht beachtet, da es sich aufgrund der hydrophoben Eigenschaften nicht in einem zu Hautpricktesten verwendeten wässrigen Erdnussextrakt befindet.

Die in Bezug auf ihre Liganden nicht-spezifische Lipidtransferproteine (nsLTPs) sind stabile, konservierte Proteine und wurden als Allergene nach der Entdeckung im Pfirsich (Pastorello *et al.* 1999) in vielen botanisch voneinander unabhängigen Pflanzen gefunden (Asero *et al.* 2000). Für Nahrungsmittelallergiker ohne Birkenpollinosis in Südeuropa gilt das LTP als Hauptallergen in Früchten der Rosaceae-Gewächsen (z.B. Pfirsich, Apfel, Aprikose) (Pastorello *et al.* 1999, Sanchez-Monge *et al.* 1999, Pastorello *et al.* 2000, Pastorello *et al.* 2001). Eine Studie von Asero *et al.* (2002) lässt das Vorkommen von LTP in der Erdnuss vermuten, es wurde bislang aber nicht nachgewiesen. Da LTP schwerste Symptomaten auslösen kann, wäre es von höchstem Interesse, dieses Protein in der Erdnuss zu identifizieren.

Ähnlich wie dem Oleosin konnte dem Erdnuss-Hämagglutinin (PNA) eine allergene Wirkung zugeschrieben werden. Von Burks *et al.* (1994) wurde es als Minorallergen beschrieben,

jedoch reichte die geringe Anzahl an Patientenseren nicht aus, um es als Allergen zu klassifizieren. Da es in Western-Blot-Analysen keine IgE-Reaktivität zeigte, ist es wahrscheinlich als potentiell Allergen in den Hintergrund getreten. Kommerziell erhältliche Präparate von natürlichem PNA sind mit Ara h 1 und Ara h 2 kontaminiert (Becker, pers. Mitteilung).

## 1.4 Zielsetzung

Um eine verbesserte Diagnostik zu erreichen und kurative Therapien zu entwickeln, muss das Allergenrepertoire der Erdnuss aufgeklärt werden. Dazu gehört die vollständige Identifizierung und Charakterisierung der krankheitsrelevanten Allergene. Die Herstellung rekombinanter Proteine vereinfacht dabei die Untersuchungen, jedoch ist die Identifikation der natürlichen Proteine unabdingbar. Diese müssen als Referenzproteine hinzugezogen werden, um die Eigenschaften der rekombinanten Proteine abzugleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bislang kaum charakterisierten Erdnussallergene im Molekulargewichtsbereich unter 25 kDa mittels molekularer, proteinbiochemischer und immunologischer Methoden untersucht werden. Dies beinhaltet die Allergene Ara h 7 und Ara h 8, das potentielle Allergen Oleosin und das in der Erdnuss nur vermutete, aber bislang nicht identifizierte Lipidtransferprotein (LTP).

Die bisher nur auf cDNA-Ebene nachgewiesenen Allergene Ara h 7 und Ara h 8 sollten dabei als Protein in der Erdnuss identifiziert werden. Weiterhin galt es, das Erdnussoleosin rekombinant zu exprimieren und das natürliche Pendant zu identifizieren. Der Nachweis des LTPs in der Erdnuss sollte auf DNA- und Protein-Ebene erfolgen. Zur Charakterisierung der Allergenität von Oleosin und LTP waren Patientenseren zur Verfügung gestellt worden.

Darüber hinaus sollte abgeschätzt werden, inwieweit Allergen-defiziente Erdnüsse zur Unterstützung der derzeit einzigen Therapieform der Erdnussallergie, der Karenz erdnusshaltiger Lebensmittel, eingesetzt werden könnten. Dazu wurden verschiedene Erdnussvarietäten qualitativ auf ihren Allergehalt analysiert. Durch den Vergleich der biologischen Reaktivität einer Majorallergen-defizienten Erdnuss mit der Standard-Erdnuss sollte die Eignung von allergenreduzierten Erdnüssen als Nahrungsmittlersatz ermittelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) verwendet. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q Academic System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt, das im Folgenden als ddH<sub>2</sub>O bezeichnet wird.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturplatten	96 well	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturschalen	25 cm <sup>2</sup> / 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen	Ø 9 cm	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten, steril	1 ml / 2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml	Greiner (Frickenhäuser)
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	1,5 ml / 2 ml / 15 ml / 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	0,25 ml / 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter	0,22 µm / 0,45 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Filtrationseinheit	150 ml	Schleicher & Schuell (Dassel)
Filtrationseinheit	250 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Microtiterplatten	96 well Maxi Sorp	Nunc (Wiesbaden)

#### 2.1.3 DNA- und Protein-Marker

##### DNA-Marker

peqGold (PEQLAB Biotechnology, Erlangen)

10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500,  
1.200, 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

100 bp-Leiter extended (Roth, Karlsruhe)

5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 900, 800, 700, 600,  
500, 400, 300, 200, 150, 100 bp

**Protein-Marker**

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (BIO-RAD, München)

97,4 kDa (Phosphorylase b); 66,2 kDa (BSA); 45,0 kDa (Ovalbumin);

31,0 kDa (Carboanhydrase); 21,5 kDa (Soja Trypsin Inhibitor); 14,4 kDa (Lysozym)

**2.1.4 Bakterienstämme/Zelllinien**

Folgend sind die *Escherichia coli*-Stämme beschrieben, die für Klonierungsarbeiten bzw. für die heterologe Expression von Erdnussproteinen verwendet wurden, sowie die RBL-Zelllinie, die für Aktivitätstests eingesetzt wurde.

Organismus	Genotyp/Charakteristika	Referenz/Hersteller
<b>Klonierungsstämme</b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str<sup>R</sup>) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen (Groningen, NL)
<b>Expressionsstämme</b>		
Origami (DE3)	$\Delta$ <i>ara-leu7697 <math>\Delta</math><i>lacX74 <math>\Delta</math><i>phoAPvuII</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F<sup>+</sup>[<i>lac</i><sup>+</sup>(<i>lacI</i><sup>f</sup>)<i>pro</i>] <i>gor522</i> ::Tn10 (Tc<sup>R</sup>) <i>trxB</i>::kan (DE3)</i></i>	Novagen (Darmstadt)
Rosetta gami	$\Delta$ <i>ara-leu7697 <math>\Delta</math><i>lacX74 <math>\Delta</math><i>phoAPvuII</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F<sup>+</sup>[<i>lac</i><sup>+</sup>(<i>lacI</i><sup>f</sup>)<i>pro</i>] <i>gor522</i> ::Tn10 (Tc<sup>R</sup>) <i>trxB</i>::kan (DE3) pRARE<sup>6</sup> (Cm<sup>R</sup>)</i></i>	Novagen (Darmstadt)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen (Darmstadt)
ArcticExpress	<i>E. coli B</i> F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> <i>Tet</i> <sup>r</sup> <i>gal endA Hte</i> [ <i>cpn10 cpn60 Gent</i> <sup>r</sup> ]	Stratagene (La Jolla, USA)
<b>Zelllinie</b>		
RBL 703/21	Humanisierte Ratten Basophilen-Leukämiezelllinie. Die Basophilen Ratten-Leukämiezelllinie RBL-2H3 wurde mit den Genen des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI transfiziert.	Vogel <i>et al.</i> (2005)

### 2.1.5 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für die Klonierungsarbeiten (Tabelle 2) bzw. für die Expression in *E. coli* verwendet (Tabelle 3).

**Tabelle 2: Klonierungsvektoren**

Vektor	Größe	Resistenz	Eigenschaften	Hersteller
pGEM-T easy	3015 bp	Ampicillin	lacZ-Gen linearisiert, mit überhängenden 3'-T-Enden zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega (Mannheim)
pCR2.1TOPO	3931 bp	Ampicillin Kanamycin	lacZ-Gen linearisiert, mit überhängenden 3'-T-Enden zur Klonierung von PCR-Produkten, Topoisomerase kovalent an 3'-Enden gebunden	Novagen (Darmstadt)

**Tabelle 3: *E. coli* Expressionsvektoren**

Vektor	Größe	Promotor	Resistenz	Eigenschaften	Hersteller
pET17b	5711 bp	<i>T7lac</i>	Ampicillin	His-Tag	Novagen (Darmstadt)
pET23b	3666 bp	<i>T7lac</i>	Ampicillin	His-Tag	Novagen (Darmstadt)
pET32b	5900 bp	<i>T7lac</i>	Ampicillin	Trx-Tag His-Tag S-Tag	Novagen (Darmstadt)
pET43.1b	7275 bp	<i>T7lac</i>	Ampicillin	Nus-Tag His-Tag S-Tag HSV-Tag	Novagen (Darmstadt)

### 2.1.6 Oligonukleotide

Es wurden mehrere Primer für die Amplifikationen der verschiedenen Gensequenzen und für die Amplifikation verschiedener Teilfragmente ausgewählter Gene aus dem Erdnuss-Genom entworfen (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Oligonukleotide für die Amplifikation verschiedener Gensequenzen aus der Erdnuss.**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle	Bindungsort	Temp [°C]
Ara h 8 – Isoform Mittag <i>et al.</i> (2004); GenBank AY328088				
8M.f	GATATCGGGCGTCTTCAC TTTCG	<i>EcoR</i> V	5'-Ende (reifes Protein)	58
8M.r	GAATTCCCATATTGAGTA GGGTTGG	<i>EcoR</i> I	3'-Ende	58
Ara h 8 – Isoform Riecken <i>et al.</i> (2008); GenBank EF4366550				
8R.f	GATATCGGGTGTTTCACAC TTTTG	<i>EcoR</i> V	5'-Ende (reifes Protein)	47
8R.r	GAATTCCCGTTGGACAAA ACATAAC	<i>EcoR</i> I	3'-Ende	47
Oleosin – GenBank AY605694				
Oleo.f	GGATCCAATGGCTACTGC TAC	<i>BamH</i> I	5'-Ende	59
Oleo.r	GAATTCCCTGATGATGAC CTCTTAAC	<i>EcoR</i> I	3'-Ende	59
NOleo.r	GAATTCCCAACATCGTAG CCGC	<i>EcoR</i> I	im 5'-Bereich	59
COleo.f	GGATCCACAGGTACATGG GACG	<i>BamH</i> I	im 3'-Bereich	59

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle	Bindungsort	Temp [°C]
LTP – GenBank EU159429				
LTP <sub>hom.f</sub>	CATTCCTTACAAGATCAG CACCTC	-	im 3'-Bereich	57
LTP <sub>pre.f</sub>	CTTCAACACTCCAAAAC ACACTTAGC	-	5'UTR	57
LTP <sub>f</sub>	GATATCATGTGGCCAAGT GAACAGTG	<i>EcoR</i> V	5'-Ende (reifes Prot.)	57
LTP <sub>r</sub>	GAATTCCTCGAACTTAATG GTAGCACAG	<i>EcoR</i> I	3'-Ende	57
Ara h 7 – GenBank EU046325				
7.f	AAGCTTATGATGGTCAAG CTCAGCATC		5'-Ende	55

Neben den selbst entworfenen Oligonukleotiden wurden kommerziell erhältliche Primer verwendet:

*Not I* d(T)<sub>18</sub> 5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAA(T)<sub>18</sub>-3' (GE Healthcare, München)  
Oligo d(T)<sub>15</sub> 5'-(T)<sub>15</sub>-3' (Promega, Mannheim)

### 2.1.7 Antikörper und Patientenserum

Patientenserum von Erdnussallergikern wurden freundlicherweise von der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel, von Frau PD Dr. Jappe aus der Universitätsklinik zu Heidelberg und von Frau Prof. Dr. Fölster-Holst der Kieler Universitätsklinik zur Verfügung gestellt. Von Herrn Dr. Mari (Zentrum für Klinische und Experimentelle Allergologie, IDI-IRCCS, Rom) wurden Seren von Erdnuss- und/oder Pflanzallergikern bereit gestellt.

Die verwendeten monoklonalen und polyklonalen Primärantikörper sowie die Sekundärantikörper sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper sowie der mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierten Sekundärantikörper.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Referenz</b>
Monoklonale Antikörper (mAk)		
Pn-t	Ara h 1	Buschmann <i>et al.</i> (1996)*
Pn-c	Ara h 1	Uhlemann (1991)*
Pn-b	Ara h 3/4	Uhlemann (1991)*
Pn-x	Ara h 3/4	Maid (1998)*
PEI-7B2	Ara h 3/4	Reese (Paul-Ehrlich Institut, Langen)
Polyklonale Antikörper (pAk)		
KB	Gesamt- Erdnussextrakt	Diese Arbeit*
K7	Ara h 1	Diese Arbeit*
MAP3	Ara h 2	Gruber <i>et al.</i> (2004)*
anti-Gly m 4	Gly m 4 (Ara h 8)	Mittag <i>et al.</i> (2004)*
anti-Ara h 6	Ara h 6	Suhr <i>et al.</i> (2004)*
Sekundärantikörper		
anti-Human IgE-AP		Allergopharma (Reinbek)
Ziege anti-Maus IgG/IgM-AP		Dianova (Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG-AP		Dianova (Hamburg)

\* Hergestellt im Forschungszentrum Borstel

### 2.1.8 Verwendete Erdnussorten

Verschiedene kommerziell erhältliche Erdnussorten wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Jumbo Riesen (Seeberger, Ulm) wurden für die nachfolgenden Experimente als Standard-Erdnuss definiert.

Standard-Erdnuss:	Jumbo Riesen, geröstet	(Seeberger, Ulm)
Keimfähige Erdnuss:	Spanish Type	(Max Kiene GmbH, Hamburg)
Bali-1 Erdnuss:	Kacang Asin	(Manalagi, Bali, Indonesien)
Bali-2 Erdnuss:	Roasted Peanut	(Garuda, PT Sinar Niaga Sejahtera, Indonesien)
Thailand Erdnuss:	Peanut Kernels	(TRS Wholesale Co, Middlesex, England)
Indonesien Erdnuss:	Peanut Kernels	(bezogen von einem Marktstand in Indonesien, Händler unbekannt)

### 2.1.9 Computerprogramme

Neben Standardcomputerprogrammen wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Programme verwendet:

<u>Software</u>	<u>Verwendungszweck</u>
Vector NTI 6.0 (InforMax, North Bethesda, USA)	DNA- und Protein-Analysen
PrimerSelect (Lasergene, DNASTar Inc, USA)	DNA- und Protein-Analysen
MikroWIN2000 (Asys Hitech, Eugendorf, Österreich)	OD-Bestimmung (ELISA, RBL)
SOFTmax PRO 4.3 LS (Molecular Devices, München)	Auswertung von ELISA
PeptideMass ( <a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a> )	Kalkulation von Peptidmassen
SignalIP ( <a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a> )	Vorhersage von Signalpeptiden
ProPep ( <a href="http://www.imtech.res.in/raghava/propred/">http://www.imtech.res.in/raghava/propred/</a> )	Vorhersage von MHC II Bindung
NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )	Gendatenbank

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 Methoden zur DNA-Analyse**

#### **2.2.1.1 Präzipitation von DNA**

Zur Konzentrierung, Reinigung und Umpufferung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde die Präzipitation von DNA mithilfe der Isopropanol-Fällung durchgeführt. Zu einem Volumen DNA-Lösung wurden zwei Volumina Isopropanol hinzugegeben. Das nach der Zentrifugation (20 min/15000 x g/4 °C) erhaltene DNA-Pellet wurde mit einem Volumen 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Entfernung des Ethanols an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.1.2 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Fällung**

Um die Deproteinierung von DNA-haltigen Lösungen zu erreichen, wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA nach der Methode von Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) erfolgte die Phasentrennung der Suspension durch Zentrifugation (10 min/15000 x g/4 °C). Die DNA-haltige wässrige Oberphase wurde in ein neues Gefäß überführt und eine Isopropanol-Präzipitation angeschlossen (2.2.1.1).

#### **2.2.1.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Bei dieser Wellenlänge entspricht der Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Das Maß der Proteinkontamination einer Lösung wurde durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Eine reine DNA-Probe liegt vor, wenn  $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$  ist. Geringere OD-Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin. Viel höhere Werte als 1,8 können dagegen Anzeichen einer RNA-Kontamination in der

Lösung sein. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Probe mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:50 verdünnt und in einer Quarzküvette gemessen.

Neben der photometrischen Bestimmung von DNA wurden DNA-Konzentrationen über Agarosegele (2.2.1.4) abgeschätzt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente mit einem Molekulargewichtsstandard ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der Probe.

#### **2.2.1.4 Analytische Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde angewandt, um Fragment- und Vektorgrößen aus DNA-Restriktionen und PCR-Reaktionen sowie die Konzentrationen von DNA- und RNA-Lösungen zu ermitteln. Der Versuchsaufbau und die Durchführung erfolgten nach der Vorschrift von Sambrook und Russell (2001).

##### Verwendete Puffer:

TAE      40 mM    Tris-Acetat (pH 7,5)  
          1 mM      EDTA

10x DNA-Probenpuffer      100 mM EDTA  
  30 % (v/v) Glycerin  
  0,05 % (w/v) Xylencyanol  
  0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße der DNA wurden Gele mit 1 % bzw. 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer angesetzt und gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-100 V durchgeführt. Zur Detektion der DNA wurden die Gele nach dem Lauf für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (3 µg/ml H<sub>2</sub>O) inkubiert. Die Anregung der Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids erfolgte auf einem UV-Transilluminator. Die Ergebnisse

wurden mittels Videoprinter oder mit dem GelDoc XR-System (Bio-Rad, München) dokumentiert und analysiert.

### **2.2.1.5 Präparative Agarosegelelektrophorese**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen und Restriktionen wurde eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt. Der Ablauf erfolgte wie bei der analytischen Agarosegelelektrophorese, wobei die gewünschten Fragmente nach Auftrennung und Anfärbung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction“-Kits (Qiagen, Hilden) wurde die DNA nach Vorschrift des Herstellers aus dem Agarosegel eluiert. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Auflösung der Agarose und der selektiven, quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren an eine Siliziumdioxid-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.

Alternativ wurde eine weitere Methode zur DNA-Elution aus Agarosegelen angewendet: Mit einer Kanüle wurde ein Loch in den Boden eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes gestochen und dieses zu  $\frac{3}{4}$  mit Filterwatte gestopft. Das ausgeschnittene Gelstück wurde auf die Watte gelegt. Dieses Reaktionsgefäß wurde in ein zweites, 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und in einer Zentrifuge bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die DNA wurde dabei mit dem Puffer aus dem Agarosegel in das 1,5 ml Gefäß eluiert, während das Agarosestück durch die Watte zurückgehalten wurde. Das Zentrifugat wurde anschließend mit Isopropanol gefällt und mit 70 % igem Ethanol gewaschen.

## **2.2.2 Enzymatische Modifizierung von DNA**

### **2.2.2.1 DNA-Restriktion**

Zur Linearisierung von Vektoren, Vorbereitung von DNA-Proben zur Klonierung und Überprüfung von positiv transformierten Klonen wurde die Restriktionsanalyse eingesetzt. Die Restriktionen erfolgten unter Verwendung der Reaktionspuffer der Hersteller bei Beachtung der Temperatur- und Zeitoptima (Tabelle 6). Pro Mikrogramm DNA wurden 10 U der benötigten Endonuklease eingesetzt, um eine vollständige Hydrolyse zu gewährleisten.

War ein Doppelverdau nicht möglich, so wurden die Enzyme nacheinander eingesetzt. Nach dem ersten Restriktionsverdau wurde das Enzym entweder hitzeinaktiviert oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und eine Isopropanolfällung angeschlossen. Das Ergebnis der Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.4) überprüft.

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Enzyme und Angabe zu den einzelnen Restriktionsbedingungen.**

<b>Enzym</b>	<b>Puffer</b>	<b>Volumen [µl]</b>	<b>Zeit [h]</b>	<b>Temp. [°C]</b>	<b>Hersteller</b>
<i>EcoR</i> I	H	10-50	2-3	37	Roche (Mannheim)
<i>EcoR</i> V	B	10-50	2-3	37	Roche (Mannheim)
<i>EcoR</i> I/ <i>EcoR</i> V	B	10-50	3-5	37	
<i>Nde</i> I	H	10-100	3-5	37	Roche (Mannheim)
<i>Xho</i> I	N	10-100	3-5	37	Roche (Mannheim)
<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	B	10-100	3-5	37	
<i>Bam</i> H I	B	10-50	2-3	37	Roche (Mannheim)
<i>Bam</i> H I/ <i>EcoR</i> I	B	10-100	2-3	37	Roche (Mannheim)
<i>Kpn</i> I	L	50-100	3-5	37	Roche (Mannheim)
<i>Sac</i> I	A	50-100	3-5	37	Roche (Mannheim)
<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	L	50-100	3-5	37	
<i>Nde</i> I	4	50-100	3-5	37	NEB (Frankfurt/Main)
<i>Nde</i> I/ <i>EcoR</i> I	-	-	-	-	

### 2.2.2.2 Phosphorylierung von DNA

Die Phosphorylierung wurde unter Verwendung einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, Calf intestinal alkaline phosphatase) von der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung in 1x NEBuffer 3 auf 0,5 µg/10 µl eingestellt und 0,5 U CIP pro µg DNA hinzugefügt. Nach einer 60-minütigen Inkubationzeit bei 37 °C wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion oder präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt.

### 2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

#### Ligation in pGEM-T und in pCR2.1-TOPO

Die Klonierung von PCR-Produkten in die kommerziell erhältlichen Vektoren pGEM-T easy (Promega, Mannheim) und pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte nach Herstellerprotokoll. Das Prinzip dieser Vektor-Systeme beruht darauf, dass ein Thymin-Rest an die 3'-Enden der Schnittstelle der restringierten Vektoren synthetisiert worden ist. Da thermostabile DNA-Polymerasen während der PCR häufig einen unspezifischen Adenosinrest an das Produkt anfügen, sind diese Systeme somit speziell für die Klonierung von nicht modifizierten PCR-Produkten geeignet. Der pCR2.1 TOPO-Vektor verfügt zusätzlich über eine Topoisomerase, die kovalent an den 3'-Enden gebunden ist und die Ligation vereinfacht.

Eine Identifikation positiver Klone erfolgte durch die vom Vektor erworbene Ampicillinresistenz und über Blau-Weiß-Selektion. Die beiden Vektoren enthalten in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) das *lacZ*-Gen, das den N-terminalen Teil des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Durch Verwendung eines Bakterienstammes, der im Genom die kodierende Sequenz für den C-terminalen Bereich der  $\beta$ -Galaktosidase enthält, kann das Selektionssystem genutzt werden. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase ist auf den mit dem Induktor IPTG (Isopropyl-1-Thio- $\beta$ -D-Galaktose) und dem Indikator X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) supplementierten LB-Agar-Platten (2.2.7.1) direkt nachweisbar. Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet den farblosen Indikator unter Freisetzung eines blauen Farbstoffes. Der Einbau eines DNA-Fragmentes in die MCS verschiebt das Leseraster des *lacZ*-Gens, so dass diese Bakterienkolonien in Anwesenheit von X-Gal farblos bleiben.

#### Ligation in pET-Vektoren

Die Verknüpfung zweier restringierter DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Es wurden 50 bis 100 ng Vektor-DNA eingesetzt, die bei Bedarf vorab phosphoryliert wurde (2.2.2.2). Das Insert wurde in zwei Ansätzen im dreifach- und zehnfach-molaren Überschuss zur Vektormenge in ein Reaktionsvolumen von 10  $\mu$ l gegeben. Die entsprechenden Insert-Mengen wurden nach folgender Formel (ROCHE, LAB FAQS) berechnet:

$$\frac{\text{ng (Vektor)} \times \text{kb (Größe des Inserts)}}{\text{kb (Größe des Vektors)}} \times \frac{\text{mol Insert}}{\text{mol Vektor}}$$

Die Ligation wurde über Nacht in einem Wasserbad bei 16 °C durchgeführt und anschließend in *E.coli* transformiert (2.2.7.3).

## 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.2.3.1 Standard-PCR

Mit Hilfe der PCR können DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert und modifiziert werden. So können zum Beispiel gezielt neue Restriktionsschnittstellen zur späteren Klonierung von Gensequenzen eingefügt werden. Für die PCR benötigt man die doppelsträngige DNA-Matrize und komplementäre kurze Oligonukleotide („Primer“), die den zu amplifizierenden Bereich am 5'- und am 3'-Ende flankieren. Außerdem ist die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und ein dNTP (Desoxynukleosid-Triphosphat)-Gemisch erforderlich. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen, die sich aus den drei Teilschritten der Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung zusammensetzen. Die Reaktionslösungen mit einem Volumen von 25 µl bzw. 50 µl wurden in einem 250 µl bzw. 500 µl PCR-Reaktionsgefäß folgendermaßen angesetzt:

Template DNA	10-100 ng
10 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
5'-Primer	10 pmol
3'-Primer	10 pmol
dNTP	0,2 mM
Taq-Polymerase	2,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

In dieser Arbeit wurden die DNA-Polymerase, der 10 x PCR-Puffer und das MgCl<sub>2</sub> von der Firma Peqlab (Erlangen) und die dNTPs von Roche (Mannheim) bezogen.

Die Amplifikation wurde unter nachstehenden Bedingungen in dem Thermocycler Primus 25 advanced (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur zur Primeranlagerung für jedes Primerpaar spezifisch gewählt (siehe Tabelle 4).

	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94 °C	20 sec	} 30 x
Primeranlagerung	47-58 °C	45 sec	
Primerverlängerung	72 °C	1 min	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	1 x
Programmende	4 °C	Endlos	

Nach Abschluss der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe, Konzentration und die Reinheit der amplifizierten DNA zu ermitteln.

### 2.2.3.2 PCR aus Kolonien

Um eine große Anzahl transformierter Bakterienklone ohne vorherige Plasmid- bzw. DNA-Präparation überprüfen zu können, wurde eine PCR direkt aus Kolonien durchgeführt. Dazu wurde etwas Zellmaterial einer Kolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in den Standard-PCR-Ansatz gegeben und die PCR unter Standardbedingungen durchgeführt (2.2.3.1). Jedoch wurde hier eine längere initiale Denaturierungsphase (10 min) gewählt.

### 2.2.4 Isolation von genomischer DNA aus der Erdnuss

Die Isolation von gDNA aus der Erdnuss (Jumbo Riesen, Seeberger, Ulm) erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Dazu wurden Erdnüsse mit flüssigem Stickstoff versetzt, in einer elektrischen Kaffeemühle gemahlen und 100 mg Erdnussmehl zur Zelllyse eingesetzt. Gleichzeitig fand eine RNA-Degradation durch die im Lysispuffer enthaltene RNase A statt. Anschließend wurden die Proteine und Polysaccharide präzipitiert. Durch Zentrifugation der Probe über einen Filter wurden diese Bestandteile und die Zelltrümmer zurückgehalten und die DNA-haltige Lösung abgetrennt. Anschließend wurde die DNA über eine Silika-Membran reversibel gebunden, gewaschen und mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

## 2.2.5 Herstellung von cDNA

### 2.2.5.1 Isolation von RNA aus der Erdnuss

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus keimfähigen Erdnüssen (Max Keine GmbH, Hamburg) wurde das kommerziell erhältliche SV Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim) verwendet. Dieses beruht auf der Verwendung von Guanidinthiocyanat, welches zum einen die Zellen lysiert und zum anderen RNasen inhibiert und so vor einer Degradation der RNA schützt. Die extrahierte RNA wird reversibel an eine Silica-Matrix gebunden. Der Einsatz einer DNase degradiert die im Extrakt eventuell vorhandene genomische DNA. Durch Waschschrte wird die RNA von Salzen, Proteinen und zellulären Verunreinigungen befreit und mit nukleasefreiem Wasser von der Membran eluiert. Für einen Ansatz wurden Erdnüsse in flüssigem Stickstoff gefroren, gemahlen und 30 mg Erdnussmehl auf 175 µl RNA Lysis Puffer eingesetzt. Die isolierte RNA wurde entweder direkt verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.5.2 Erststrang-Synthese

Um aus der isolierten Gesamt-RNA cDNA herzustellen, werden Oligo(dT)-Oligonukleotide verwendet, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Mit einer reversen Transkriptase wird die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert, so dass ein mRNA/cDNA-Hybrid entsteht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das First-Strand cDNA Synthesis Kit der Firma GE Healthcare (München) mit den im Abschnitt 2.1.6 angegebenen Oligonukleotiden verwendet. Im Anschluss an die Erststrang-Synthese-Reaktion wurden die Proben bei -20 °C eingefroren oder mit einem Aliquot eine PCR mit den gewünschten genspezifischen Oligonukleotiden angeschlossen.

### 2.2.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg). Dazu wurde das Plasmid mit dem zu sequenzierenden Fragment aus *E. coli* mittels Minipräparation (2.2.7.4) isoliert, ein Aliquot von 1 µg abgenommen und getrocknet. Mithilfe des Programms VektorNTI 6.0 (InforMax, North Bethesda, USA) wurden die Ergebnisse ausgewertet.

## 2.2.7 *E. coli*: Transformation und Expression

### 2.2.7.1 Nährmedien zur Kultivierung

Zur Anzucht und Kultivierung von *E. coli*-Bakterienstämmen wurde LB-Medium (engl. “lysogeny broth“) verwendet. Alle Medien wurden in ddH<sub>2</sub>O angesetzt und autoklaviert. Die hitzelablen Komponenten der Selektionsmedien (Ampicillin, IPTG und X-Gal) wurden als Stammlösung angesetzt, steril filtriert und nach dem Autoklavieren dem auf 50-60 °C abgekühlten Medium hinzugefügt.

LB-Medium            1% (w/v) Pepton  
                           1% (w/v) NaCl  
                           0,5% (w/v) Hefeextrakt

LB-Agarplatten      LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar

LB-Amp-Medium    LB-Medium + Ampicillin (Endkonzentration 100 mg/ml)  
                           Stammlösung Ampicillin: 100 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

LB-Amp-Agar        LB-Amp-Medium + 1,5 % (w/v) Agar

LB-Amp-Agar mit IPTG/X-Gal

LB-Amp-Agar + 10 mM IPTG (Stammlösung 100 mM in ddH<sub>2</sub>O)  
                           + 1,2 % (w/v) X-Gal (Stammlösung 3% (w/v) in DMF)

### 2.2.7.2 Kultivierung und Lagerung

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37 °C in LB-Flüssigmedium auf einem Schüttelinkubator (180 rpm). Zur Kultivierung der mit Plasmid transformierten Zellen wurde dem Medium das jeweilige Antibiotikum zugesetzt. Die Selektion nach der Transformation erfolgte auf entsprechend supplementierten LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Die Bakterienstämmen wurden auf LB-Agarplatten bei 4 °C gelagert. Zur längerfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt, dazu wurden 400 µl der üN-Kultur mit 500 µl Glycerin gemischt und bei –80 °C eingefroren.

### 2.2.7.3 Transformation mittels Hitzeschock-Methode

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte mit Hilfe von Calciumchlorid. Hierzu wurde eine *E. coli*-Vorkultur in 4 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C angesetzt. Mit 0,2 ml dieser Kultur wurden 20 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt und 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (10 min/5000 x g/4 °C) und in 1 ml eisgekühlter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (10 min/5000 x g /4 °C) und das Pellet in 2 ml eisgekühlter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 10 % Glycerin aufgenommen. Je 200 µl der kompetenten Zellen wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert bzw. direkt zur Transformation eingesetzt. Die Transformationseffizienz der Zellen sowie mögliche Kontaminationen wurden durch Kontrolltransformationen überprüft.

Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Hierzu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen mit 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. mit 10-20 µl eines Ligationsansatzes gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und dann für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 100-300 µl der Bakteriensuspension auf eine selektive LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

### 2.2.7.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung aus Bakterien erfolgte nach Birnboim und Doly (1979) mittels alkalischer Lyse. Die Präparationen wurde entweder mithilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) oder des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab, Erlangen) unter Einhaltung des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Die Prinzipien der beiden verwendeten Kits beruhen neben der alkalischen Lyse von Bakterienzellen auf der reversiblen Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Matrix. Durch Waschschriffe mit chaotropen Salzlösungen und ethanolhaltigen Lösungen wurde die an der Matrix gebundene Plasmid-DNA von RNA und Proteinen gereinigt. Die Elution des gereinigten Plasmids erfolgte bei erwarteten Konzentrationen über 100 ng/µl mit 50 µl TE-Puffer, bei geringeren DNA-Konzentrationen

mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Dadurch ist eine Einengung des Eluates in der Speedvac (SPD12P, Thermo Savant, Holbrook, USA) möglich, ohne die Salzkonzentration der Probe durch die im TE-Puffer enthaltenen Salze zu erhöhen.

### **2.2.7.5 Expression von rekombinanten Proteinen**

Zur heterologen Expression verschiedener Erdnuss-Allergene in *E. coli* wurde mit Antibiotikum supplementiertes LB-Medium mit einer üN-Kultur im Verhältnis 1:100 angeimpft. Anschließend wurde die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Abnahme von 1 ml Kultur zur Negativkontrolle wurde die Expression durch Zugabe von 1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert (Endkonzentration 1 mM). Nach einer Expressionsdauer von 4 Stunden wurde eine 1 ml Probe als Kontrolle abgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (30 min/12000 x g/4 °C) und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Pellets der Kontrollen wurden zur weiteren Analyse mit 1 µl Benzonase versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese (2.3.4.1) analysiert.

### **2.2.7.6 Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen**

Für den Aufschluss der Zellen wurden je nach Löslichkeit der heterolog exprimierten Proteine verschiedene Methoden verwendet:

#### **Lyse unter nativen Bedingungen**

Die Bakterienpellets aus 1 l Expressionskultur wurden in 30 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von 2 ml BugBuster 10x Protein Extraction Reagent (Novagen, Darmstadt), einem Detergens, wurden die Zellen chemisch lysiert.

#### **Lyse unter denaturierenden Bedingungen**

Waren die exprimierten Proteine unter nativen Bedingungen nicht in Lösung zu bringen, wurden die Bakterienpellets in Harnstoff-Puffer (8 M Urea, 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0) resuspendiert und lysiert.

Zur Degradation von DNA und RNA und damit zur Verbesserung der Löslichkeit wurden außerdem 3 µl der Endonuklease Benzonase (Novagen, Darmstadt) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf einem Taumelroller. Die Abtrennung intakter Zellen, unlöslicher Bestandteile sowie Zell- und Membrantrümmer erfolgte durch Zentrifugation (30 min/12000 x g/4 °C). Der lösliche Überstand wurde anschließend für die Proteinaufreinigung verwendet.

### Variationen

Waren die exprimierten Proteine weder unter nativen noch unter denaturierenden Bedingungen löslich, wurden weitere Puffer zur Lyse ausgetestet.

SB3-10 Puffer	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,0) 4 M Urea 2 M Thiourea 2,5 % (w/v) SB3-10 (3-(Decyldimethylammonium)- Propansulfonat, Sigma)
SB3-10 Puffer + NP-40	SB3-10 Puffer 2,5 % (v/v) Nonidet P-40
Guanidinhydrochlorid-Puffer	6 M Guanidin-HCl 0,1 M Tris (pH 8) 5 mM DTT (1 mM EDTA)

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Erdnussextrakten

#### Verwendete Lösungen:

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer	0,1 M $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,0
Ammoniumacetat-Puffer	0,1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH 5,0

Zur Extraktherstellung wurden Erdnüsse gepalt, in flüssigem Stickstoff gefroren und in einer elektrischen Kaffeemühle gemahlen. Das Erdnussmehl wurde über Nacht bei 4 °C in 250 ml Extraktionspuffer pro 30 g Mehl gerührt. Nach zweimaliger Zentrifugation (30 min/10000 x g/4 °C) wurde der Überstand durch Zelluloseacetatfilter (Sartorius, Göttingen) mit absteigender Porengröße von 8,0, 0,8, 0,45 und 0,2 µm mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe gefiltert. Der Extrakt wurde über Nacht bei 4 °C gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert. Nach anschließender Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode (siehe 2.3.3) wurde die Proteinlösung aliquotiert und lyophilisiert.

Zur Entfettung von Erdnussmehl wurden 5 g Erdnussmehl zunächst für 15 min mit 20 ml Aceton versetzt und ausgerührt. Das Fett-Aceton-Gemisch wurde durch einen Filter der Porengröße 8,0 µm filtriert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das im Erdnussmehl zurückgebliebene Aceton wurde bei Raumtemperatur abgedampft. Anschließend wurde das entfettete Erdnussmehl wie beschrieben extrahiert oder das Öl zur Reinigung der Ölkörperchen verwendet (2.3.2).

### 2.3.2 Reinigung von Ölkörperchen

Die Reinigung von Ölkörperchen und Isolation von Oleosin erfolgte in Anlehnung an die Methode von Tzen *et al.* (1997). Dabei wurde zunächst das Erdnussöl über Saccharosekissen gereinigt und durch Entfettung die Ölkörperchen isoliert.

#### Verwendete Lösungen:

Natriumphosphatpuffer:	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,5)
------------------------	--

Lösung 1: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)  
0,6 M Saccharose

Lösung 2: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)  
0,4 M Saccharose

Lösung 3: 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)  
0,2 M Saccharose  
0,1 % (v/v) Tween 20

Lösung 4: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)  
0,6 M Saccharose  
2 M NaCl

Lösung 5: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)  
0,25 M Saccharose  
2 M NaCl

Lösung 6: 9 M Harnstoff

Als Ausgangsmaterial wurde Erdnussöl verwendet, das mit Aceton aus Erdnussmehl extrahiert worden war (2.3.1). 5 ml Erdnussöl wurden mit 25 ml Lösung 1 gemischt und für 1 min gevortext. Anschließend wurden 10 ml Lösung 2 zur Probe hinzugegeben und für 60 min bei 4300 x g und 12 °C zentrifugiert. Die auf der Oberfläche schwimmende Ölschicht wurde abgenommen, zuerst mit 20 ml Lösung 3 vermischt, dann 10 ml Natriumphosphatpuffer zugegeben und zentrifugiert (60 min/4300 x g/12 °C). Die Ölschicht wurde wieder abgenommen, mit 20 ml Lösung 4 gemischt und 20 ml Lösung 5 zugegeben. Nach erneuter Phasentrennung (60 min/4300 x g/12 °C) wurde die obere Schicht mit Lösung 6 versetzt und 10 min auf einem Taumelroller bei RT inkubiert. 10 mM Natriumphosphatpuffer wurde zu der Probe gegeben und zentrifugiert (30 min/4300 x g/12 °C). Die Ölschicht wurde mit 10 ml Lösung 1 versetzt und durch Zugabe von 10 ml Hexan und Zentrifugation (30 min/4300 x g/12 °C) entfettet. Die Hexan-Öl-Schicht wurde abgenommen und verworfen. Die Ölkörperchenschicht wurde abgenommen und mit 10 ml Lösung 1 versetzt. Nach kurzem Mischen wurden 10 ml Lösung 2 zugeben. Nach der Phasentrennung (60 min/4300 x g/12 °C)

wurde die Ölkörperchenschicht abgenommen. Um das trotz Hexan-Behandlung vorhandene Öl zu entfernen, wurde eine Protein-Fällung mit Aceton angeschlossen. Dazu wurde die Probe mit 5 Teilen Aceton vermischt, für eine Stunde bei -20 °C inkubiert und die ausgefallenen Proteine pelletiert (5 min/6000 x g/4 °C). Das Pellet wurde getrocknet und in der SDS-PAGE analysiert (siehe 2.3.4.1).

### **2.3.3 Proteinbestimmung**

#### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde das Coomassie Protein Assay Reagenz (Pierce, Bonn) verwendet. Zu 980 µl Reagenz wurden 20 µl der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben und die Extinktion gegen ddH<sub>2</sub>O bei einer Wellenlänge von 595 nm in dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Konzentration wurde mithilfe einer Standardreihe von 62,5 µg/ml bis 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt.

#### **Proteinbestimmung über den molaren Extinktionskoeffizienten**

Die Konzentration von Proteinlösungen bekannter Zusammensetzung wurde alternativ über die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Hierzu wurden 50 µl einer Proteinlösung in eine UVette (Eppendorf, Hamburg) gegeben und die Absorption in dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Die Konzentration wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$c \text{ [mg/ml]} = \frac{\text{MW} \times E_{280} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon}$$

Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) für die jeweiligen zu bestimmenden Proteine wurde mit dem Programm Vector NTI berechnet.

### **2.3.4 Elektrophoretische Trennung von Proteinen**

#### **2.3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Analyse von Proteingemischen und gereinigten Proteinen wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Durch die Behandlung der Proben mit SDS werden die

Proteine denaturiert und proportional zur Polypeptidkettenlänge negativ geladen, so dass alle Proteine in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wandern und durch die Porengröße der Gelmatrix nach dem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Je nach der zu erwartenden Proteinzusammensetzung wurden unterschiedliche Vernetzungsgrade gewählt, die durch die Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentrationen festgelegt wurden.

Verwendete Lösungen:

Probenpuffer (2x, reduzierend) 200 mM Tris/HCl (pH 6,8)  
 20 mM EDTA  
 25 % (v/v) Glycerin  
 3 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 2 % (w/v) SDS  
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (4x) 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)

Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)

Elektrodenpuffer 50 mM Tris (pH 8,3)  
 384 mM Glycin  
 0,1 % (w/v) SDS

APS (Ammoniumpersulfat) 10 % (w/v) Stammlösung

Pyronin G 1 % (v/v) Stammlösung in Sammelgelpuffer

Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen Doppelgelsystem (PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S, Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Zunächst wurden die Gelkassetten zu 2/3 mit Trenngel-Lösung (Tabelle 7) befüllt und bis zur Polymerisierung mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Anschließend wurde das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung (Tabelle 7) überschichtet und ein Gelkamm zur Ausbildung von Probenaschen eingesetzt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und nach dem Abkühlen in die Taschen des polymerisierten Sammelgels gegeben. Im

Elektrodenpuffer wurde zunächst die Elektrophorese bei einer Spannung von 50 V gestartet, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht, bis die Lauffront des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblaus das untere Ende des Geles erreichte. Als Molekulargewichtsstandard wurde der SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range (BioRad, München) verwendet.

**Tabelle 7: Mengenangaben für die Zusammensetzung von zwei SDS-Gelen.**

	Trenngel		Sammelgel
	12 %	15 %	4 %
ddH <sub>2</sub> O	5,5 ml	3,9 ml	2,9 ml
Rotiphorese Gel 30	6,5 ml	8,1 ml	850 µl
Trenngelpuffer (4-fach)	4 ml	4 ml	-
Sammelgelpuffer (4-fach)	-	-	1,3 ml
1 % (w/v) Pyronin G	-	-	16 µl
10 % (w/v) SDS	163 µl	163 µl	51 µl
TEMED	16 µl	16 µl	5 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	30 µl

(Rotiphorese Gel 30: 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1 (Roth, Karlsruhe); TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Roth, Karlsruhe); APS: Ammoniumpersulfat (Roth, Karlsruhe))

### 2.3.4.2 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der im SDS-PAGE getrennten Proteine wurden diese mit dem Farbstoff Coomassie Blue angefärbt.

#### Verwendete Lösungen:

Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie Blue R-250
	45 % (v/v) Methanol
	45 % (v/v) Eisessig
Entfärber-Lösung	18 % (v/v) Isopropanol
	9 % (v/v) Eisessig

Das Gel wurde für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit Entfärber-Lösung unter mehrfachem Wechseln der Lösung entfärbt. Dies erfolgte so lange, bis die Proteinbanden sichtbar und der Hintergrund des Gels klar wurde.

Zum Konservieren wurden die gefärbten SDS-PAGE-Gele über Nacht in Glycerinpuffer (2 % (v/v) Glycerin, 7 % (v/v) Eisessig) inkubiert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Lagen in Glycerinpuffer getränkter Einmachhaut getrocknet.

### 2.3.5 Semidry-Blotting

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach dem Prinzip des Semidry-Blottings auf eine NC (Nitrocellulose)-Membran bzw. auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Dies wurde nach der Methode von Kyhse-Anderson (1984) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt.

#### Verwendete Puffer:

Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl (pH 10,0) 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl (pH 10,4) 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl (pH 9,4) 10 % (v/v) Methanol 20 mM 6-Aminohexansäure

Zwischen den beiden Elektrodenplatten des Semidry-Blotters (Phase, Lübeck) wurden luftblasenfrei zwei Lagen in Anodenpuffer I getränktes Gel-Blotting Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), eine Lage in Anodenpuffer II getränktes Blotting-Papier, die mit Anodenpuffer II äquilibrierte Membran, das SDS-PAGE-Gel und drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Blotting-Papier geschichtet. Wurde statt einer NC-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) verwendet, so musste die Membran vor Äquilibration in Anodenpuffer II durch Inkubation in Methanol aktiviert werden. Der Transfer der Proteine erfolgte für 30 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

## 2.3.6 Nachweismethoden von Proteinen auf Membranen

### 2.3.6.1 Proteinfärbung mittels India Ink

Mithilfe einer India Ink-Färbelösung nach Hancock und Tsang (1983) konnten die auf der NC- oder PVDF-Membran transferierten Proteine angefärbt werden.

#### Verwendete Lösungen:

Färbelösung	0,1 % (v/v) India Ink (Winsor & Newton, London) in TBS-T (pH 7,4)
TBS-T (pH 7,4)	100 mM Tris/HCl (pH 7,4) 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,05 % (v/v) Tween 20

Die Membran wurde nach dem Blotten für ca. 2 h in der Färbelösung inkubiert. Überschüssige Farbpartikel wurden durch anschließendes Waschen in TBS-T entfernt.

### 2.3.6.2 Spezifischer Proteinnachweis mittels Immunoblot

#### Verwendete Lösungen:

TBS-T (pH 7,4)	siehe 2.3.6.1
TBS (pH 9,5)	100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
NBT	0,033 % (w/v) NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) in TBS (pH 9,5)
BCIP	0,5 % (w/v) BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat)

Nach dem Semidry-Blotting wurden zunächst die freien Bindungsstellen der Membranen blockiert, um unspezifische Bindungen der einzusetzenden Antikörper zu verhindern. NC-Membranen wurden unter Schütteln 30 min in TBS-T (pH 7,4) und PVDF-Membranen 2 h in 5 % Milchpulver in TBS-T (pH 7,4) inkubiert. Für den immunenzymatischen Nachweis wurden die primären Antikörper, monoklonale bzw. polyklonale Antikörper und Patientenseren, in TBS-T (pH 7,4) verdünnt und über Nacht mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte eine 4-stündige Inkubation mit dem entsprechenden, mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Sekundäantikörper. Die ungebundenen Sekundäantikörper wurden nach zweimaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T (pH 7,4) entfernt. Nach Äquilibrierung der Membran für 10 min in TBS (pH 9,4) erfolgte die Färbereaktion der gebundenen Antikörper mit dem NBT/BCIP-System. Zur Herstellung der Substratlösung wurde NBT bei 37 °C vorgewärmt und BCIP in einem Verhältnis von 1:30 hinzugegeben (Leary *et al.* 1983). Durch Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Reaktion gestoppt.

### 2.3.6.3 Verstärkung der Immunnachweise durch Chemilumineszenz

#### Verwendete Lösungen:

TBS	20 mM Tris/HCl (pH 7,6) 137 mM NaCl
Blockierungspuffer	TBS 0,2 % (v/v) I-Block Reagent (Applied Biosystems, Darmstadt) 0,1 % (v/v) Tween-20
Assay-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 9,8) 1 mM MgCl <sub>2</sub>

Der Chemilumineszenznachweis erfolgte mit dem CDP-Star Substrat für Alkalische Phosphatase von Applied Biosystems (Darmstadt). Dazu wurde ein Semidry-Blotting auf NC-Membran durchgeführt und die Membran anschließend für 10 min in TBS gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit Blockierungspuffer für 30-60 min blockiert. Die Membran wurde in Streifen geschnitten und mit in Blockierungspuffer verdünnten Patientenseren (1:20) für 30-60 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 2x 5 min in Waschpuffer gewaschen und für 30-60 min mit dem anti-Human IgE-AP Antikörper

(1:5000 in Blockierungspuffer) inkubiert. Nach weiteren Waschsritten, 3x 5 min in Waschpuffer und 2x 2 min im Assay-Puffer, wurden die Streifen auf eine stabile Plastikfolie gelegt und mit einem saugfähigen Papier (Development Folder, Applied Biosystems, Darmstadt) von überschüssiger Flüssigkeit befreit, ohne die Membran dabei trocknen zu lassen. Nach Zugabe von Substratlösung wurde der Blot für 5 min inkubiert, bevor die überschüssige Flüssigkeit erneut entfernt wurde. Für die Detektion wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, München) aufgelegt, der nach Bedarf exponiert und anschließend maschinell entwickelt wurde. Dabei wurden Expositionsintervalle von 30 sec, 2 min und 10 min gewählt.

### **2.3.7 Säulenchromatographische Aufreinigung von Proteinen**

#### **2.3.7.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie**

Rekombinante Proteine, die mit einem Polyhistidin-Peptid (His-Tag) versehen waren, konnten anhand ihrer Affinität zu zweiwertigen Metallionen gereinigt werden.

#### Verwendete Puffer für die native Reinigung:

Äquilibrierungspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 7,5) 300 mM NaCl
Waschpuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 7,5) 300 mM NaCl 50 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 7,5) 300 mM NaCl 1 M Imidazol

Verwendete Puffer für die denaturierende Reinigung:

Äquilibriumspuffer	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM Natriumphosphat (pH 8,0)
Waschpuffer	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM Natriumphosphat (pH 6,3)
Elutionspuffer	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM Natriumphosphat (pH 4,5)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Affinität der His-Fusionsproteine zu Nickelionen mittels Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic Säure)-Agarose (Qiagen, Hilden) oder zu Cobaltionen mittels Talon (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ausgenutzt. Das resuspendierte Säulenmaterial (5 ml) wurde in eine Leersäule gefüllt und mit 3x 50 ml Äquilibriumspuffer gespült. Je nachdem, in welchem Puffer die Bakterien lysiert wurden (2.2.7.6), wurde entweder eine Reinigung unter nativen oder unter denaturierenden Bedingungen gewählt. Das Lysat wurde im Batch-Verfahren mit dem vorbereiteten Säulenmaterial für 30 min inkubiert. Nach Absinken des Säulenmaterials wurde der Durchlauf gestartet und unspezifisch gebundene Verunreinigungen mit 2x 20 ml Waschpuffer entfernt. An die Säule gebundene Proteine wurden mit 10 ml Elutionspuffer eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE (2.3.4.1) analysiert.

**2.3.7.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)**

Bei einer Größenausschlusschromatographie werden Proteine nach ihrer Größe getrennt, wobei die größeren Proteine zuerst eluieren (inverser Siebeffekt). Die kleineren Proteine dringen in die Poren des Säulenmaterials ein und weisen dadurch eine entsprechend längere Retentionszeit auf.

Verwendete Eichproteine und Puffer:

Proteintestmischung 1 enthielt folgende Eichproteine:

Ferritin [440 kDa]

Aldolase [158 kDa]

Ovalbumin [46 kDa]

Ribonuklease [13,7 kDa]

Proteintestmischung 2 enthielt folgende Eichproteine:

Catalase [232 kDa]

Albumin [67 kDa]

Chymotrypsinogen [25 kDa]

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer      0,2 M (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>

Zur Abtrennung von Erdnussproteinen < 25 kDa wurde eine geeichte Superdex 200-Säule (GE Healthcare, München) mit einer Länge von 34 cm und einem Durchmesser von 1,5 cm verwendet. Die Trennung der Proteingemische erfolgte nach Herstellerangaben an dem ÄKTA-purifier System (GE Healthcare, München) mit Ammoniumhydrogencarbonat als Laufpuffer. Die Fraktionen wurden in einem Volumen von 1 ml gesammelt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert, gepoolt, dialysiert und lyophilisiert.

### **2.3.7.3 Ionenaustauschchromatographie (IEC)**

Mithilfe der Ionenaustauschchromatographie können Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes getrennt werden. Je stärker ein Protein geladen ist, desto besser wird es an das entgegengesetzt geladene Säulenmaterial gebunden. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Wahl des pH-Wertes des Puffers, da dieser die Nettoladung des Proteins und des Säulenmaterials bedingt. Um ein Protein stark an die Säule zu binden, darf der pH-Wert des Puffers nicht in der Nähe des isoelektrischen Punktes des zu reinigenden Proteins liegen. Weiterhin ist die Salzkonzentration des Puffers, mit der das Protein von der Säule eluiert wird, wichtig. Bei geringer Salzkonzentration werden zunächst nur die schwach an das Säulenmaterial gebundenen Proteine eluiert, bei steigenden Salzkonzentrationen auch die stärker gebundenen Proteine.

Verwendete Puffer:

Startpuffer	20 mM Tris (pH 8,0)
Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8,0) 0,5 M NaCl

Bei der verwendeten Source 15Q-Säule (GE Healthcare, München) handelt es sich um eine Anionenaustauschsäule, die nach Herstellerangaben an dem ÄKTA-purifier System (GE Healthcare, München) betrieben wurde. Das lyophilisierte Proteingemisch wurde im Startpuffer aufgenommen und auf die gleichermaßen äquilibrierte Säule gegeben. Ungebundenes Material wurde durch einen Waschschrift mit Startpuffer entfernt. Zur Elution wurde der Elutionspuffer in einem Gradienten über 45 Säulenvolumen schrittweise von 0 % auf 30 % und über 10 Säulenvolumen von 30 % auf 100 % erhöht. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem Volumen von 1 ml gesammelt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

#### **2.3.7.4 Protein G-Affinitätschromatographie**

Zur Reinigung von polyklonalen Antikörpern wurde deren Affinität zu Protein G ausgenutzt, welches eine Bindungsdomäne für die F<sub>c</sub>-Region von IgG aufweist. Die Reinigung erfolgte über eine HiTrap Protein G-Säule (GE Healthcare, München) an dem ÄKTA-purifier System (GE Healthcare, München) mit den unten aufgelisteten Lösungen.

Verwendete Puffer:

Bindungspuffer:	20 mM Natriumphosphat (pH 7,0)
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7)
Neutralisierungspuffer:	1 M Tris-HCl (pH 9,0)

Die Probe wurde auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule gegeben. Durch einen Waschschrift wurde ungebundenes Material entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Elutionspuffers von der Säulenmatrix abgelöst und in

1 ml Fraktionen aufgefangen. Der pH-Wert der Fraktionen wurde sofort mit 100 µl Neutralisierungspuffer auf pH 7,0 eingestellt.

### **2.3.8 Reduktion und Alkylierung**

Durch die S-Carboxymethylierung von Cysteinresten mit Iodessigsäure ist es möglich, Cystein-haltige Proteine zu modifizieren und somit ihren isoelektrischen Punkt in den sauren pH-Bereich zu verschieben.

Für die Reduktion wurde 1 mg lyophilisiertes Protein in 100 mM Tris (pH 8,5) zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml gelöst. 10 µl einer 1 M DTT-Lösung wurde hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Alkylierung wurde durch Zugabe von 20 µl 1 M Iodessigsäure (angesetzt in 1 M NaOH) im Dunkeln für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Probe wurde anschließend dialysiert und lyophilisiert.

### **2.3.9 Tryptischer Verdau**

Die zu analysierenden Proteinbanden wurden aus einem SDS-PAGE-Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Inkubation der Gelstücke für 10 min in 500 µl ddH<sub>2</sub>O erfolgte eine Umpufferung durch Zugabe von Acetonitril und 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung im Verhältnis 1:1. Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Probe mit 250 µl Acetonitril versetzt und für ca. 30 min in der Speedvac dehydratisiert. Anschließend erfolgte der tryptische Verdau durch Zugabe von 20 µl Trypsinlösung (10 µg modifiziertes Trypsin in Sequenzierungsgrad (Roche, Mannheim) in 50 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>) über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurden zunächst 20 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zugesetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in das Ausgangsgefäß 20 µl 5 %ige Ameisensäure hinzugefügt, inkubiert und der Überstand wieder abgenommen. Die Extraktion wurde nach Zugabe von 20 µl Acetonitril und erneuter Inkubationszeit beendet. Anschließend wurden alle Überstände gepoolt und in der Speedvac auf ein Restvolumen von ca. 10 µl eingengt. Die Aufreinigung tryptischer Peptide erfolgte über reversed-phase Chromatographie mit C18-Säulenmaterial in 10 µl ZipTip Pipettenspitzen (Millipore, Schwalbach) nach Herstellerangaben. Die vorbereiteten Proben wurden zur Massenbestimmung der Peptide mit MALDI-TOF-MS eingesetzt.

### **2.3.10 MALDI-TOF-MS**

Mit der „matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS) lässt sich die Molekülmasse von Proteinen und Peptiden bestimmen. Dazu werden die Proteinproben in einer Energie absorbierenden Matrix kokristallisiert. Die Kristalle werden mit einem Laserimpuls im Hochvakuum verdampft, dabei zugleich ionisiert und mittels einer angelegten Spannung beschleunigt. Nach Durchlaufen einer genau definierten Flugstrecke wird ihr Auftreffen von einem Detektor registriert. Die für die Flugstrecke erforderliche Zeit ist dabei abhängig von der Masse und Ladung der Ionen. Durch Eichung des Gerätes mit Molekülen bekannter Masse kann die Masse der Probenmoleküle über ihre Flugzeit genau bestimmt werden.

Zur Massenbestimmung mittels MALDI-TOF-MS wurden die tryptischen Fragmente mit gesättigter Matrixlösung ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure, Bruker Daltonik, Bremen) im Verhältnis 1:1 gemischt und kokristallisiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Peptidmassen mit einem Reflex III Massenspektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen) in Reflektor-TOF-Konfiguration mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV bestimmt.

### **2.3.11 ESI-FT-ICR-MS**

Zur exakten Massenbestimmung von gereinigten Proteinen wurde die hochauflösende Elektrospray-Ionisation Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (ESI-FT-ICR-MS) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Probe durch Versprühen mit Hilfe einer Kapillare und angelegter Hochspannung in die Gasphase gebracht und ionisiert. Die Bestimmung der Masse im positiven Ionen Modus erfolgte mit dem Massenspektrometer Apex II (Bruker Daltonics, Bremen), ausgestattet mit einem aktiv abgeschirmten 7 Telsa Magneten und einer Apollo II Ionenquelle. Die lyophilisierten Proteine wurden in einem 50:50:0,001 (v/v/v) Gemisch aus Methanol, ddH<sub>2</sub>O und Essigsäure mit einer Flussrate von 2  $\mu$ l/min versprüht. Zur Erleichterung der Spektren-Auswertung wurden die geladenen Ionen durch anschließende algorithmische Ladungs-Dekonvolution rechnerisch in neutrale Moleküle transformiert.

### 2.3.12 Proteinsequenzierung

Die N-terminale Proteinsequenzierung erfolgt nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (1970). Dabei wird an die N-terminale Aminosäure im basischen Milieu Phenylisothiocyanat (PITC) gekoppelt. Die Erniedrigung des pH-Wertes durch den Zusatz von TFA führt zur Abspaltung der endständigen Aminosäure vom Protein und deren Umwandlung in ein Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäuren-Derivat. Diese Prozedur aus Kopplung, Abspaltung und Umwandlung wird für die einzelnen Aminosäuren der Proteinkette wiederholt. Die jeweils abgespaltenen PTH-Aminosäuren durchlaufen eine reversed-phase Chromatographie und werden über ihre Retentionszeit im Vergleich zu den Standard-PTH-Aminosäuren identifiziert.

Zur Sequenzierung wurden auf PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) geblottete Proteinspots ausgeschnitten und in einem Procise Proteinsequencer (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert. Sollte ein Protein aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel sequenziert werden, so wurde es durch passive Adsorption auf eine PVDF Membran transferiert.

Für die passive Adsorption (Reuter *et al.* 2005) wurde ein Proteinspot aus einem SDS-Gel herausgeschnitten, in einer Speedvac (SPD12P, Thermo Savant, Holbrook, USA) getrocknet und in 50 µl 200 mM Tris-HCl mit 2 % SDS, pH 8,5 aufgenommen. Anschließend wurden 200 µl ddH<sub>2</sub>O und eine ca. 5x 2 mm große, in Methanol aktivierte PVDF-Membran hinzugefügt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde Methanol in einer Endkonzentration von 10 % hinzugegeben. Die Adsorption wurde 5 Tage bei Raumtemperatur durchgeführt und die Membran anschließend 5x mit 10 % Methanol gewaschen. Nach Trocknung wurde sie zur N-terminalen Sequenzierung eingesetzt.

### 2.3.13 Quantifizierung von Ara h 1 mittels ELISA

Das Prinzip eines ELISA beruht auf der Bindung von Enzym-markierten Antikörpern an Antigene. In einer nachfolgenden Substratreaktion kommt es je nach Stärke der Bindung zu einer proportionalen Umsetzung des Substrates in ein detektierbares Endprodukt.

#### Verwendete Lösungen und Puffer:

Coating-Puffer Guanidin	6 M Guanidinhydrochlorid
	50 mM NaHCO <sub>3</sub>
	pH 9,6 mit NaOH

---

Coating-Puffer Natriumcarbonat	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 50 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6 mit NaOH
Coating-Puffer Natriumacetat	0,29 % (v/v) Eisessig pH 5,0 mit NaOH
Waschpuffer	100 mM Tris/HCl (pH 7,4) 100 mM NaCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,05 % (v/v) Tween-20
Blockierungslösung	5 % (w/v) Milchpulver in Waschpuffer
Inkubationslösung	2,5 % (w/v) Milchpulver in Waschpuffer
Diethanolamin-Puffer	1 M Diethanolamin 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> pH 9,8
Substratlösung	1 mg/ml para-Nitrophenylphosphat (pNPP) in Diethanolamin-Puffer

Bei einem indirekten ELISA werden Antigene durch Adsorptionseffekte an eine Festphase gebunden ("Coating"). Nach Entfernung der ungebundenen Antigene werden freie Bindungsstellen mit einem Protein oder Proteingemisch abgesättigt und somit für unspezifische Bindungen geblockt. Anschließend erfolgt eine spezifische Bindung mit dem primären Antikörper. Durch Inkubation mit einem Enzym-markiertem Detektionsantikörper wird in Anwesenheit einer Substratlösung eine Farbreaktion katalysiert. Bei diesen Enzymen handelt es sich vorrangig um Meerrettichperoxidase oder Alkalische Phosphatase.

Für einen Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper benötigt, die spezifisch das nachzuweisende Antigen binden. Dabei müssen die Antikörper verschiedene Epitope

erkennen, um sich nicht gegenseitig zu behindern. Der erste Antikörper wird an eine Festphase gebunden ("Catcher"-Antikörper). Anschließend werden die freien Bindungsstellen abgesättigt. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird hinzugegeben, so dass dieses an die gecoateten Antikörper binden kann. Im nächsten Schritt wird der zweite spezifische Antikörper hinzugegeben, der an das Antigen bindet. Dieser Sekundärantikörper wird vom Enzym-markierten Detektionsantikörper gebunden, wodurch eine Farbreaktion katalysiert werden kann.

Die Etablierung eines Ara h 1-spezifischen ELISAs sollte die Quantifizierung des Ara h 1-Gehalts in verschiedenen Erdnussextrakten ermöglichen. Hierzu wurde gereinigtes Ara h 1 zur Verfügung gestellt.

### **2.3.13.1 Indirekter Inhibitions-ELISA**

Der indirekte Inhibitions-ELISA wurde zunächst wie ein indirekter ELISA aufgebaut. Dabei wurde gereinigtes Ara h 1 an die Festphase gekoppelt, mit den spezifischen Ara h 1-Antikörpern Pn-c inkubiert und die Bindung mittels AP-konjugiertem anti-Maus Antikörper evaluiert. Der Ara h 1-Gehalt verschiedener Erdnussextrakte konnte abgeschätzt werden, indem der primäre Antikörper mit den Extrakten präinkubiert wurde und die Bindung zu dem gecoateten Ara h 1 mit dem ungehemmten Antikörper verglichen wurde. Zur Kontrolle wurde eine Selbst-Inhibition der primären Antikörper mit Ara h 1 durchgeführt.

Als erster Schritt wurden der effektivste Coating-Puffer und die optimalen Antigen- und Antikörperverdünnungen in Vorversuchen bestimmt, um eine ausreichend niedrige Nachweisempfindlichkeit bei einer maximalen Extinktion im Bereich von 2-2,5 zu erreichen. Zur Kopplung von Ara h 1 an die Mikrotiterplatten wurden standardmäßig sieben Coating-Puffer ausgetestet. Die Inkubations- und Reaktionsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt und die Zeiten dabei so gewählt, dass von einer Gleichgewichtseinstellung der jeweiligen Reaktionen auszugehen war. Dazu wurden die Reaktionsschritte bei Inkubationszeiten unter 16 h bei 37 °C durchgeführt. Der ELISA wurde nach Auswertung der Vorversuche wie folgt aufgebaut:

Die Kavitäten einer 96 well Maxisorp Platte wurden mit jeweils 60 µl Ara h 1 in einer Konzentration von 5 mg/ml im Coating-Puffer Guanidin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer pro Kavität (Elx405 Auto Plate Washer,

Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) wurden die Platten mit 200 µl Blockierungslösung für 7 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde der in Inkubationslösung verdünnte Antikörper Pn-c (1:10) in einem Volumen von 60 µl eingesetzt und über Nacht inkubiert. Für die Inhibitionsanalyse wurde der Antikörper Pn-c zuvor für 2 h in Inkubationslösung mit Ara h 1, Standard-Erdnussextrakt und Bali-Erdnussextrakt in Konzentrationen von 0,08-1280 µg/ml auf einem Taumelroller versetzt. Am nächsten Tag erfolgte nach einem Waschschrift die Detektion der gebundenen Antikörper durch Inkubation mit einem AP-konjugierten anti-Maus Antikörper (60 µl pro Kavität, Verdünnung 1:10000) für 2 h. Nach einem anschließenden Waschschrift wurden 200 µl der Substratlösung pro Vertiefung eingesetzt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 3 M NaOH abgestoppt, die Absorption bei 405 nm im ELISA Reader Expert 96 (Asys Hitech GmbH, Eugendorf) gemessen. Die Daten wurden mit dem Programm MicroWIN2000 dokumentiert.

### **2.3.13.2 Sandwich-ELISA**

Für den Sandwich-ELISA wurden wie beim Inhibitions-ELISA in Vorversuchen die optimalen Konzentrationen und Bedingungen bestimmt. Dabei wurden die Inkubationszeiten, -temperaturen und Waschschrift analog zum Inhibitions-ELISA durchgeführt. Zur Verfügung stand zunächst das Kaninchenserum K7 gegen Gesamt-Erdnussextrakt, das über eine Protein G-Säule affinitätschromatographisch gereinigt worden war (2.3.7.4) und an die Mikrotiterplatte im Volumen von 60 µl und in einer Konzentration von 2 µg/ml in Natriumcarbonatpuffer über Nacht gebunden wurde. Die anschließende Blockierung konnte auf die Dauer von 2 Stunden reduziert werden. Die Inkubation mit den verschiedenen Extrakten erfolgte in Verdünnungen von 2 ng/ml bis 32 mg/ml für 2 Stunden. Als Sekundärantikörper wurde auf den Ara h 1-spezifischen monoklonalen Antikörper Pn-t zurückgegriffen, der im Verhältnis 1:5 eingesetzt wurde. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm SOFTmax PRO verwendet. Der gemessene Ara h 1-Gehalt der verschiedenen Extraktverdünnungen wurde halblogarithmisch aufgetragen und mit dem 4-fit Parameter Modell als sigmoidaler Kurvenverlauf extrapoliert.

Im Lauf der ELISA-Etablierung wurde ein anti-Ara h 1 Kaninchenserum hergestellt, das im Folgenden als KB bezeichnet wird. Für den Sandwich-Aufbau wurde der Antikörper Pn-t über eine Protein G-Säule gereinigt (2.3.7.4) und in Natriumacetatlösung (3 µg/ml) gecoatet. Die Extrakte wurden in Konzentrationen von 0,001 ng/ml bis 1 mg/ml eingesetzt.

Gebundenes Ara h 1 wurde mit dem Protein G-gereinigten KB Serum im Verhältnis 1:1000 detektiert. Der AP-konjugierte anti-Kaninchen Antikörper wurde 1:5000 eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte wie beschrieben mit dem 4-fit Parameter Modell.

### **2.3.14 Herstellung von Antiserum mit „multiplen antigenen Peptiden“**

Für die Herstellung von monospezifischen Antikörpern gegen das Oleosin wurde zunächst die Proteinsequenz mit dem Programm DNA Star auf B-Zell-Epitope untersucht. Da mit den Peptiden Kaninchen immunisiert werden sollten, wurde die Sequenz zudem auf T-Zell-Epitope hin untersucht. Dies erfolgte mit dem Programm ProPred. Zur Erzeugung von „multiplen antigenen Peptiden“ (MAPs) wurden ausgewählte Sequenzbereiche als verzweigte Peptide mittels Festphasensynthese erzeugt. Dies wurde freundlicherweise von Herrn Bartels (Laborgruppe Strukturbiochemie, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt. Die Immunisierung von Kaninchen mit den synthetisierten Peptiden fand in der BGFA (Berufsgenossenschaftlichen Forschungsinstitut der Arbeitsmedizin, Ruhr-Universität Bochum) statt. Die Auswertung und Titerbestimmung der Seren erfolgte mittels Immunoblot.

### **2.3.15 RNase-Aktivitätsnachweise**

#### **2.3.15.1 Zymogramm**

Mithilfe eines Zymogramms nach Yen und Green (1991) sollte eine möglicherweise vorhandene RNase-Aktivität des Erdnussallergens Ara h 8 nachgewiesen werden. Dazu wurde unter RNase-freien Bedingungen ein Polyacrylamidgel gegossen. Die verwendeten Geräte und das Prinzip der Proteinauftrennung entsprechen hierbei zunächst der SDS-PAGE (2.3.4.1). Die verwendeten Lösungen und Puffer werden mit DEPEC-H<sub>2</sub>O angesetzt, um eine RNase-Kontamination von außen zu vermeiden. Durch Eingießen von RNA in das Trenngel wird der RNase ein Substrat geboten. Die Detektion der RNA erfolgt durch den Farbstoff Toluidin-Blau, während durch RNase-Aktivität degradierte RNA ungefärbt bleibt.

Für das Gel verwendete Lösungen:

2x Probenpuffer      50 mM Tris-HCl Puffer (pH 6,8)  
                              2 % (w/v) SDS  
                              10 % (w/v) Glycerol  
                              0,025 % (w/v) Bromphenolblau

Trenngel              11,3 % (w/v) Acrylamid  
                              0,3 % (w/v) N',N'-Methylenbisacrylamid  
                              0,46 M Tris (pH 9,0)  
                              2,4 mg/ml torula yeast RNA (Sigma)

Kurz vor Verwendung wurden folgende Substanzen hinzugeben:

0,08 % (w/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

0,08 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Sammelgel            4,5 % (w/v) Acrylamid  
                              0,12 % (w/v) N',N'-Methylenbisacrylamid  
                              0,063 M Tris (pH 6,8)

Kurz vor Verwendung wurden folgende Substanzen hinzugeben:

0,08 % (w/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

0,08 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Laufpuffer            1,4 % (w/v) Glycin  
                              27,5 mM Tris (pH 7,0)  
                              0,1 % (w/v) SDS

Für die Färbung verwendete Lösungen:

Waschpuffer I        0,01 M Tris-HCl pH 7,0  
                              25 % (v/v) Isopropanol

Waschpuffer II	0,01 M Tris-HCl pH 7,0
Inkubationspuffer	0,1 M Tris-HCl pH 7,0
Färbelösung	0,2 % (w/v) Toluidin-Blau O (Sigma) 0,01 M Tris-HCl pH 7,0

Die aufgetragenen Proteine wurden zunächst der Größe nach in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die folgenden Schritte wurden im Wasserbad bei 51 °C durchgeführt. Die RNasen wurden zunächst aktiviert, indem das SDS aus dem Gel mit dem im Waschpuffer I enthaltenen Isopropanol für 2x 10 min herausgewaschen wurde. Das Isopropanol wurde anschließend mit zwei 10-minütigen Waschschrritten mit dem Waschpuffer II entfernt. Nach einer folgenden Inkubationsdauer von 50 min wurde das Gel zunächst für 10 min mit dem Waschpuffer II und anschließend für 10 min in der Färbelösung inkubiert. Das anschließende Entfärben sollte die degradierte RNA als aufgehellte Bande sichtbar machen, während die intakte RNA blau angefärbt bleibt. Dazu wurde das Gel 10 min und anschließend 2x 20 min mit Waschpuffer II inkubiert.

### **2.3.15.2 Untersuchung im Agarosegel**

Ziel dieses Versuches ist es, eine RNase-Aktivität nachzuweisen, indem RNA zu dem zu untersuchenden Protein hinzugegeben wird und nach Inkubation der RNA-Gehalt im Agarosegel überprüft wird.

Zu 2 µg RNA aus Pflanzenmaterial (*Poaceae*) wurden verschiedene Konzentrationen (0,2 bis 20 µg) an Proteinen mit vermuteter RNase-Aktivität zugegeben. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen an nukleasefreiem Wasser und als Positivkontrolle Verdünnungen einer RNaseA-Lösung hinzugefügt. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.2.1.4) und der RNA-Gehalt bestimmt.

### 2.3.15.3 Untersuchung mittels Photometer

Zur photometrischen Bestimmung von RNase-Aktivität wurden jeweils 200 µg torula yeast RNA (Sigma) mit 2 µg RNase A bzw. dem zu untersuchenden Protein in 150 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion gestoppt, indem eine Phenol-Chloroform Extraktion angeschlossen wurde. Dazu wurde 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zu der Probe gegeben. Nach Zentrifugation (10 min/15000 x g/4 °C) wurde die wässrige Phase abgenommen und die RNA mit Isopropanol gefällt. Zu einem Volumen RNA-Lösung wurden zwei Volumina Isopropanol hinzugegeben. Nach der Zentrifugation (20 min/15000 x g/4 °C) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Der RNA-Gehalt der Lösung wurde bei OD<sub>280</sub> im Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Zusätzlich wurde ein Aliquot im Agarosegel analysiert.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung von Ratten-Basophilen-Leukämiezelllinien (RBL-Zellen)

#### Verwendetes Medium:

RBL-Kulturmedium	80:20 MEM:RPMI; 5 % FCS; 1 % L-Glutamine
	400 ml MEM (Earle's)
	100 ml RPMI 1640
	25 ml FCS
	5 ml L-Glutamine (100x)
	0,5 g Geneticin Sulphate (Invitrogen, Karlsruhe)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete RBL-Zelllinie RBL 703/21 wurde freundlicherweise von Gerald Reese aus dem Paul-Ehrlich-Institut (Langen) zur Verfügung gestellt. Die humanisierte Zelllinie der RBL-2H3-Zellen wurde im RBL-Kulturmedium im Brutschrank bei 5-7 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Alle 7 Tage wurden die adhären wachsenden Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Kulturflasche abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert (100 x g / 10 min / RT), in Kulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt. Sollte die Zellzahl

genau ermittelt werden, wurden die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt und entsprechend verdünnt.

## **2.4.2 Auftauen und Einfrieren von RBL-Zellen**

### **Auftauen und Entfernung von DMSO**

In flüssigen Stickstoff eingefrorene Zellen wurden im Cryo-Röhrchen in einem Becherglas mit lauwarmem Wasser aufgetaut. Der Inhalt wurde direkt in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und auf Eis weiter bearbeitet. Innerhalb von 3 min wurde tröpfchenweise 1 ml MEM Medium hinzugegeben, das Röhrchen dabei leicht geschwenkt. Anschließend wurde entsprechend innerhalb von 3 min 2 ml Medium und danach innerhalb von 3 min 6 ml Medium zugesetzt. Die Zellen wurden pelletiert (100 x g / 10 min / RT). Für die Kultivierung wurden die Zellen in 7 ml Kulturmedium resuspendiert.

### **Einfrieren**

Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche abgelöst und anschließend pelletiert (100 x g / 10 min / RT). Die weitere Behandlung erfolgte auf Eis unter leichtem Schwenken. Nach Antauen der Zellen wurde zunächst 1 ml kaltes FCS hinzugegeben, anschließend 0,8 ml kaltes RPMI und tröpfchenweise 0,2 ml kaltes DMSO. Die Suspension wurde in Cryo-Röhrchen à 1 ml aliquotiert. In einem Cryo-Einfriergerät wurden die Zellen zunächst langsam auf  $-80\text{ °C}$  heruntergekühlt und nach 3 Tagen in flüssigen Stickstoff gelagert.

## **2.4.3 Mediatorfreisetzungstest aus RBL-Zellen (RBL-Test)**

Der RBL-Test ist ein *in vitro* Modell, mit dem die IgE-abhängige allergeninduzierte Mediatorfreisetzung aus Ratten-Basophilen-Leukämiezellen ermittelt werden kann. Es wurde die humanisierte RBL-Zelllinie RBL 703/21 verwendet, die den Fc $\epsilon$ -Rezeptor auf der Oberfläche trägt. An diesen können die IgE-Antikörper, z.B. aus humanen Seren, binden. Eine Kreuzvernetzung führt zur Degranulation der Zellen und zur Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase, die durch Substratumsetzung bestimmt wird.

Verwendete Medien und Puffer:

RBL-Assay Medium	MEM; 5 % FCS; 1 % L-Glutamine 500 ml MEM (Earle's) 25 ml FCS 5 ml L-Glutamine (100x)
Tyrode Puffer (20x)	136,9 mM NaCl 2,6 mM KCl 0,42 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,49 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
D <sub>2</sub> O-Tyrode-Puffer (1x)	5 ml Tyrode Puffer (20x) 140 µl 1 M CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 5,6 mM Glucose x H <sub>2</sub> O (α-D-Glucose, Serva, Heidelberg) 100 mM HEPES 25 ml D <sub>2</sub> O Mit 1 N NaOH auf pH 7,45 einstellt  Vor Gebrauch wurde frisch dazugeben: 0,1 % BSA ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O
Lysis Puffer	1 % Triton X-100 (Sigma)
Zitronensäurelösung	0,4 M Zitronensäure-Monohydrat (pH 4,5)
Substratlösung	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 4,5 mit 0,4 M Zitronensäure) 1,3 mg/ml p-Nitro-phenyl-N-acetyl-β-D-glucosamid (Sigma)

Stopplösung

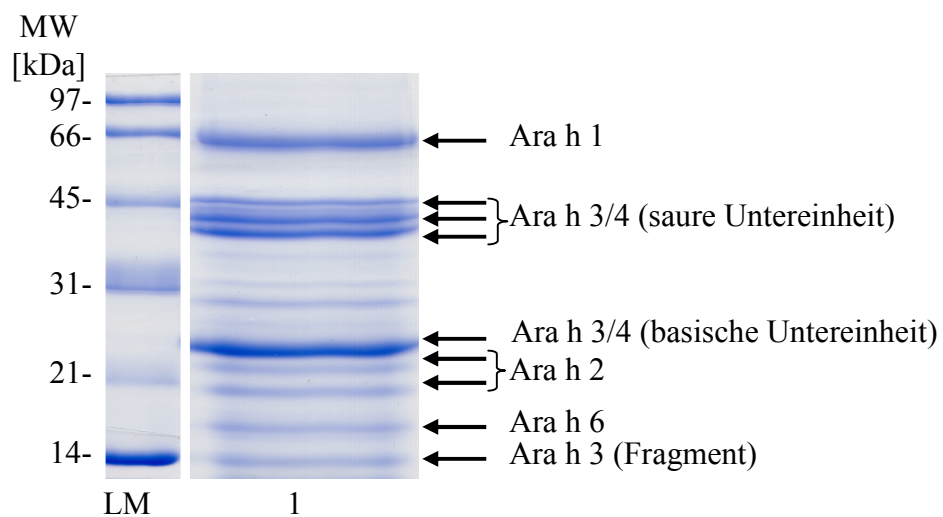
0,25 M Glycin (pH 10,7)

Die RBL 703/21 Zellen wurden in RBL-Assay-Medium aufgenommen und auf einer 96-Well-Platte mit 150.000 Zellen pro Vertiefung in einem Volumen von 50 µl ausgesät. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurden für die passive Sensibilisierung die Seren in RBL-Assay-Medium im Verhältnis 1:10 vorverdünnt und in einem Volumen von 50 µl zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit einem ELISA-Washer (Elx405 Auto Plate Washer, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) 3x mit Tyrode-Puffer gewaschen, wobei die Einwirkzeit während der einzelnen Waschschrte 30 sec betrug. Für die Stimulation der Zellen mit Allergenen wurden die einzelnen Extrakte (Verdünnung 0,0001 bis 10 µg/ml) und der Lysis-Puffer (Verdünnung 1:10) in D<sub>2</sub>O-Tyrode-Puffer verdünnt. 100 µl der entsprechenden Lösungen wurden in die entsprechenden Kavitäten gegeben und die Platte 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Messung der β-Hexosaminidase-Freisetzung wurden 50 µl der Substratlösung in eine neue Platte vorgelegt und mit 30 µl des Zellüberstandes versetzt. Nach weiteren 45 min Inkubation im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung beendet. Die Absorption wurde anschließend bei 405 nm (Referenzfilter 650 nm) im ELISA-Reader Expert 96 (Asys Hitech GmbH, Eugendorf) gemessen. Die Freisetzung konnte nach Abzug des Plattenhintergrundes mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Release [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{Antigenkontrolle}}}{\text{OD}_{\text{Total}}} \times 100 \%$$

### 3 Ergebnisse

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die bislang kaum charakterisierten Erdnussallergene unter 25 kDa mittels molekularbiologischen, proteinbiochemischen und immunologischen Methoden zu untersuchen. Um eine Orientierung über die in der Erdnuss vorhandenen Allergene zu erhalten, wurde unter Standard-Bedingungen ein Extrakt hergestellt und dieser in der SDS-PAGE analysiert und im Immunoblot mit verfügbaren Antikörpern bzw. mit N-terminaler Sequenzierung identifiziert. Abbildung 3 zeigt, dass im Coomassie-gefärbten SDS-Gel hauptsächlich das Allergen Ara h 1 (63 kDa) und mehrere Isoformen von Ara h 3/4, sowie Ara h 2 (17 und 19 kDa) und Ara h 6 (14,5 kDa) vertreten sind. Für die Erdnussproteine Ara h 7, Ara h 8, Oleosin und das wahrscheinlich in der Erdnuss existierende LTP konnten keine korrelierenden Banden im SDS-Gel gefunden werden. Spezifische Antikörper für eine Detektion im Immunoblot waren nicht verfügbar. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Proteine wahrscheinlich nur in geringen Konzentrationen vorhanden oder unter den Standard-Extraktionsbedingungen nicht im Extrakt vorhanden sind.



**Abbildung 3: Darstellung eines wässrigen Erdnussextraktes (pH 8,0) nach SDS-PAGE zum Nachweis des Proteinspektrums.**

(12 % Gel, reduzierende Bedingungen, 15 µg Erdnussextrakt/cm, Coomassie-Färbung)

LM: Proteinmarker, Spur 1: Erdnussextrakt mit den Hauptkomponenten Ara h 1, Ara h 3/4, Ara h 2 und Ara h 6, die über spezifische Antikörper bzw. Sequenzierung identifiziert wurden.

### 3.1 Ara h 8

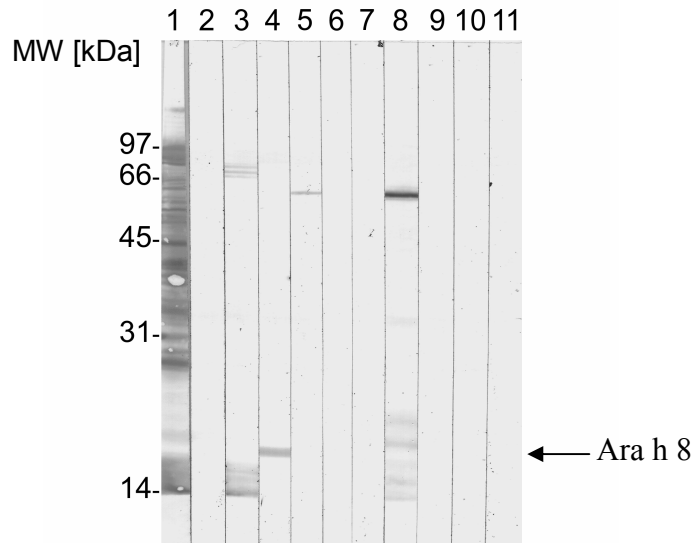
Bisher konnte vom Ara h 8, dem Bet v 1-homologen Allergen der Erdnuss, nur die Gensequenz kloniert und die IgE-Reaktivität am heterolog exprimierten Protein nachgewiesen werden (Mittag *et al.* 2004). Für das rekombinante Ara h 8 konnte ein theoretisches Molekulargewicht von 16,95 kDa und ein pI von 5,0 berechnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das natürliche Ara h 8 in der Erdnuss identifiziert, gereinigt und charakterisiert werden, um ein Referenzmolekül für das rekombinante Protein zu erhalten.

#### 3.1.1 Etablierung einer Reinigungsstrategie für nAra h 8

Zur Reinigung von Ara h 8 aus Erdnussextrakt wurden zunächst die Extraktionsbedingungen optimiert. Hierzu wurde Erdnussmehl entfettet und für die Extraktion Puffer mit verschiedenen pH-Werten getestet. Die Extrakte wurden im Immunoblot auf Ara h 8 Gehalt hin überprüft. Für den Ara h 8-Nachweis wurde ein kreuzreaktives Kaninchenserum verwendet, das gegen das Bet v 1-Homologe der Soja (Gly m 4) hergestellt worden war (anti-Gly m 4 Kaninchenserum). Außerdem wurden standardmäßig die monoklonalen Antikörper gegen Ara h 1 (Pn-t) und Ara h 3/4 (Pn-x und PEI-7B2), sowie die polyklonalen Kaninchenseren gegen Ara h 2 (MAP3) und Ara h 6 (rAra h 6) eingesetzt.

Die Extraktion mit Ammoniumacetat-Puffer bei pH 5,0 führte gegenüber der Standard-Extraktion bei pH 8,0 zu einem Ara h 8 (17 kDa) angereicherten Extrakt (Abbildung 4). Als weitere Allergene in diesem Extrakt konnten Ara h 1 (63 kDa), Ara h 2 (17 und 19 kDa) und Ara h 6 (14,5 kDa) identifiziert werden. Ara h 2 wurde nur durch IgE-Reaktivität des Patientenserums detektiert.

Aufgrund der niedrigen Ara h 8 Konzentration in der Erdnuss war trotz der optimierten Extraktionsbedingungen in der India Ink-Färbung keine korrespondierende Proteinbande zu der mit dem anti-Gly m 4 Antikörper detektierten Bande nachzuweisen. Der große Proteinanteil an Ara h 3/4 in der Erdnuss konnte durch die saure Extraktion erfolgreich zurückgehalten werden. Im Immunoblot waren weder mit den eingesetzten monoklonalen Antikörpern noch mit dem Patientenserum Ara h 3/4 Isoformen nachweisbar (Abbildung 4).



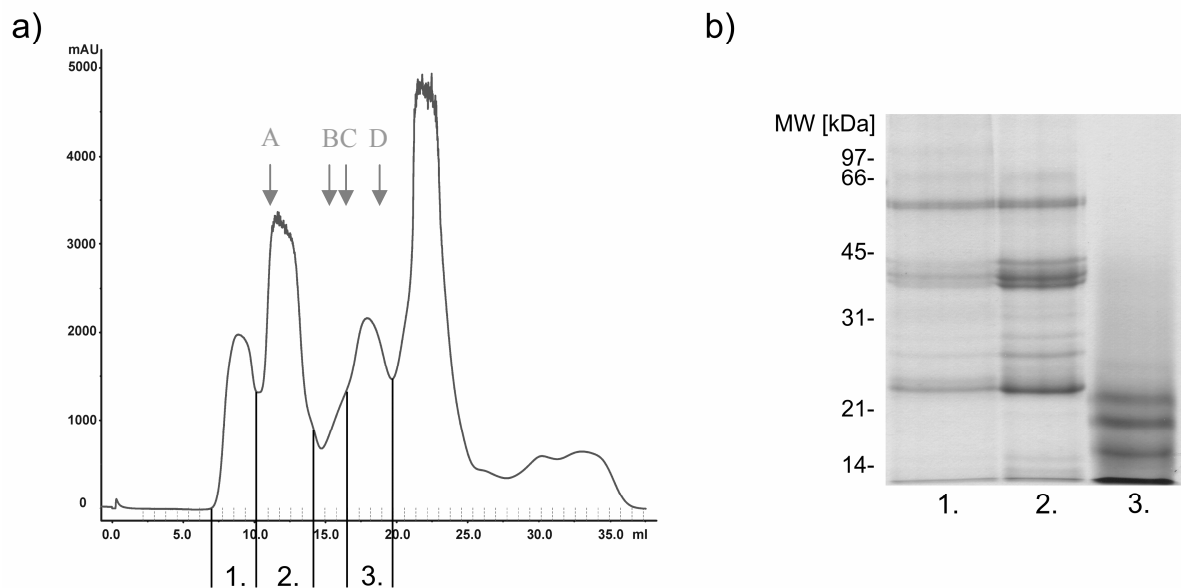
**Abbildung 4: Immunoblot von Erdnussextrakt, unter sauren Bedingungen hergestellt (pH 5,0), zum Nachweis von Ara h 8 .**

(12 % Gel, 15 µg Erdnussextrakt/cm, reduzierende Bedingungen, PVDF Membran)

Spur 1: India Ink, Spur 2: Kaninchen anti-Ara h 2 (MAP3), Spur 3: Kaninchen anti-Ara h 6, Spur 4: zu Ara h 8 kreuzreaktives anti-Gly m 4 Kaninchenserum, Spur 5: anti-Ara h 1 mAk (Pn-t), Spur 6: anti-Ara h 3/4 mAk (Pn-x), Spur 7: anti-Ara h 3/4 mAk (PEI-7B2), Spur 8: Patientenserum JG3, Spur 9: Negativkontrolle anti-Kaninchen IgG, Spur 10: Negativkontrolle anti-Maus IgG+IgM, Spur 11: Negativkontrolle anti-Human IgE.

Für eine weitere Konzentrierung von nAra h 8 und zur Abtrennung von größeren Proteinen, wie Ara h 1, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dazu wurde der saure Extrakt über eine Superdex-200 Säule getrennt. Die Proteine, die größer als 25 kDa waren, konnten ungehindert mit dem Laufpuffer entsprechend ihrem Laufverhalten die Säule passieren (Fraktion 1 und 2 in Abbildung 5), während hingegen die Proteine, die kleiner als 25 kDa sind (z.B. Ara h 8), mit der Sephadex-Matrix interagierten und später eluiert wurden (Fraktion 3 in Abbildung 5).

Die Isolation von Ara h 8 aus der Fraktion 3 sollte mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie erfolgen. Da der theoretisch berechnete pI von Ara h 8 bei 5,0 liegt, wurde die Anionenaustauschsäule Source 15 Q verwendet. Abbildung 6a zeigt das Chromatogramm und die Analyse einiger Fraktionen mittels SDS-PAGE. Der Reinigungsschritt führte jedoch nicht zu einem sauberen Produkt. Denn neben der Ara h 8-Bande sind Verunreinigungen zu erkennen, welche immunologisch hauptsächlich als Ara h 6 identifiziert werden konnten, das einen dem Ara h 8 ähnlichen pI von 5,2 aufweist.

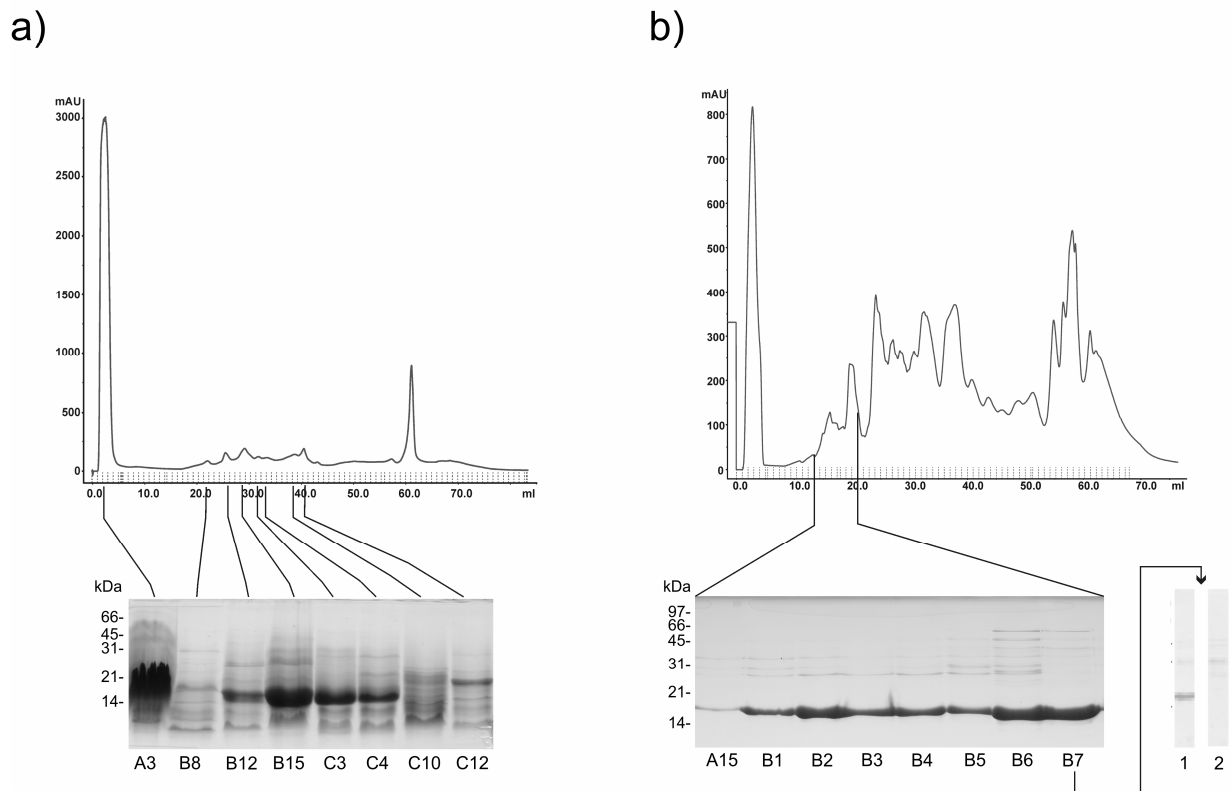


**Abbildung 5: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von Erdnussextrakt, unter sauren Bedingungen hergestellt, zur Konzentrierung von Proteinen kleiner als 25 kDa.**

a) Chromatogramm der Superdex 200 Säule, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Eingezeichnet sind die Fraktionen, die vereinigt wurden (Segmente 1-3) und die Eichproteine (A: Ferritin (440 kDa), B: Ovalbumin (43 kDa), C: Chymotrypsinogen A (25 kDa), D: Ribonuklease A (13,7 kDa)).  
 b) 12 % Gel der vereinigten Fraktionen. Proben 1 und 2 enthalten vor allem das Allergen Ara h 1 und weitere Proteine größer als 25 kDa, Probe 3 enthält Proteine kleiner als 25 kDa (Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 8).

Um eine Strategie zu finden, die die Isolation von Ara h 8 durch Abtrennung von Ara h 6 ermöglicht, wurden die Primärsequenzen der beiden Proteine miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass Ara h 6 fünf Cystine aufweist, während Ara h 8 keine Cysteinreste besitzt. Durch eine Reduktion und anschließende Alkylierung der Cysteine mit Iodessigsäure sollte der isoelektrische Punkt von Ara h 6 stärker zu den sauren pH-Werten verschoben und dadurch das Protein von Ara h 8 mittels Ionenaustauschchromatographie abtrennbar werden.

Wie in Abbildung 6 b, in der die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie nach vorhergegangener Reduktion und Alkylierung der Erdnussproteine kleiner als 25 kDa zu sehen ist, erscheint in der SDS-PAGE einzelner Fraktionen eine nahezu saubere Ara h 8 Bande (Fraktionen B1-B7). Zur Überprüfung wurde von der Fraktion B7, die die intensivste und sauberste Ara h 8 Bande aufwies, ein Immunoblot mit den Antikörpern anti-Gly m 4 und anti-Ara h 6 durchgeführt. Es konnte eindeutig gereinigtes Ara h 8 nachgewiesen werden, welches keinerlei Kontaminationen mit Ara h 6 aufwies (Abbildung 6 b).



**Abbildung 6: Chromatogramme und SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen von Erdnussextrakt nach Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von Ara h 8.**

a) Chromatogramm ( $OD_{280}$ ) der IEC mit Proteinen  $< 25$  kDa (Abbildung 5, Fraktion 3) **ohne** vorherige Acetylierung. Verschiedene Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Die Ara h 8 enthaltenden Fraktionen B12-C4 sind vorwiegend mit Ara h 6 verunreinigt.

b) Chromatogramm ( $OD_{280}$ ) der IEC mit Proteinen  $> 25$  kDa (Abbildung 5, Fraktion 3) **mit** vorheriger Acetylierung. Die Fraktionen A15-B7 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Immunoblotanalyse der Fraktion B7, die die Konzentration an gereinigtem Ara h 8 enthält, zeigt keine Kontaminationen mehr mit Ara h 6 (Spur 1: Kaninchen anti-Gly m 4; Spur 2: Kaninchen anti-Ara h 6).

Neben der nachgewiesenen Reaktivität mit dem kreuzreaktiven anti-Gly m 4 Antikörper wurde zur eindeutigen Identifizierung von Ara h 8 das gereinigte Protein ansequenziert. Hierbei wurden die 12 N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Das Ergebnis bestätigte das Vorliegen von Ara h 8, zeigte aber auch, dass dieses Protein in vier Aminosäuren von der publizierten Sequenz (AY328088) abwich und dass die erste Aminosäure, ein Methioninrest, fehlte, die wahrscheinlich durch *in vivo* Prozessierung entfernt wurde (siehe Abbildung 10).

Ara h 8 konnte durch die Kombination verschiedener säulenchromatographischer Methoden aus Erdnussextrakt isoliert, gereinigt und charakterisiert werden. Die dem N-Terminus entsprechende Ara h 8 Gensequenz wurde in nachfolgenden Versuchen kloniert und exprimiert.

### 3.1.2 Klonierung einer neuen Ara h 8 Isoform

Das publizierte Ara h 8 trägt die GenBank Acc No. AY328088 und wird als Erdnussallergen Ara h 8.0101 bezeichnet. Da die N-terminale Sequenzierung Abweichungen zu der in der Datenbank angegebenen Ara h 8.0101-Sequenz zeigte, sollte die Ara h 8 Gensequenz näher untersucht werden und gegebenenfalls eine neue Isoform kloniert werden.

Als erster Schritt wurde gDNA aus der Erdnuss isoliert und mit Ara h 8 (AY328088) spezifischen Oligonukleotiden (8M.f/8M.r) amplifiziert. Nach Zwischenklonierung in den Vektor pGEM-T und Sequenzierung wurde die vollständige Gensequenz überprüft. Dabei wurde ein Intron zwischen dem Basenpaar 177-261 entdeckt (Abbildung 7). Die von der Gensequenz abgeleitete Primärsequenz zeigt bei gleicher Länge (157 AS) 11 Aminosäureaustausche zu der Ara h 8.0101-Sequenz, so dass die Identität 93 % beträgt.

```

M G V F T F E D E I T S T L P P A K L Y
1  ATGGGCGTCTTCACTTTTCGAGGATGAAATCACCTCCACCCTGCCCCCTGCCAAGCTTTAC
   ATGCCGCAGAAGTGAAGCTCCTACTTTAGTGAGGTGGGACGGGGACGGTTCGAAATG
   N A M K D A D S I T P K I I D D V K S V
61  AATGCTATGAAGGATGCCGATCCATCACCCCTAAGATTATGATGACGTCAGAGTGTT
   TTACGATACTTCTACGGCTAAGGTAGTGGGGATTCTAATACTACTGCAGTTCTCACAA
   E I V E G N G G P G T I K K L T I V E
121 GAAATCGTTGAGGAAACGGTGGTCTGGAAACCATCAAGAAACTCACCATTGTCGAGGgt
   CTTTAGCAACTCCCTTTGCCACCAGGACCTTGGTAGTTCTTTGAGTGGTAACAGCTCCca
   _____
   Intron
181 cagtaactattcaattcagtatacatacactatataatgtgtgataaattatgtgttgttaa
   gtcattgataagttaagtcatatgtatgtatgatatacacactattaatacacaacattt
   _____
   D G E T K F I L H K V
241 ttgtaataataataatgatataatgcagATGGAGAAACCAAGTTTATCTTACACAAAGT
   aacattattattactatatacgcTACCTCTTTGGTTCAAATAGAATGTGTTTCA
   E A I D E A N Y A Y N Y S V V G G V A L
301 GGAGGCAATAGATGAGGCTAACTATGCATACACTACAGCGTGGTTGGAGGAGTGGCGCT
   CCTCCGTTTACTACTCCGATGATACGTATGTTGATGTCGCACCAACCTCCTCACCGCA
   P P T A E K I T F E T K L V E G P N G G
361 GCCTCCCACGGCGGAGAAGATAACATTTGAGACGAAGCTGGTAGAAGGACCCAACGGAGG
   CGGAGGTGCGCCTCTTCTATTGTAACCTCTGCTTCGACCATCTTCTGGGTTGCCTCC
   S I G K L S V K F H S K G E A K P E E E
421 ATCCATCGGGAAGCTGAGTGTGAAGTTCCACTCGAAAGGAGAAGCGAAGCCAGAGGAGGA
   TAGGTAGCCCTTCGACTCACACTTCAAGGTGAGCTTTCCTCTTCGCTTCGGTCTCCTCCT
   D M K K G K A K G E A L F K A I E G Y V
481 AGACATGAAGAAGGGTAAGGCCAAGGGCGAAGCTCTCTTCAAGGCTATTGAGGGTTACGT
   TCTGTACTTCTCCATTCCGGTTCCTCGCTTCGAGAGAAGTCCGATAACTCCCAATGCA
   L A N P T Q Y
441 TTTGGCCAACCCTACTCAATAT
   AAACCGTTGGGATGAGTTATA

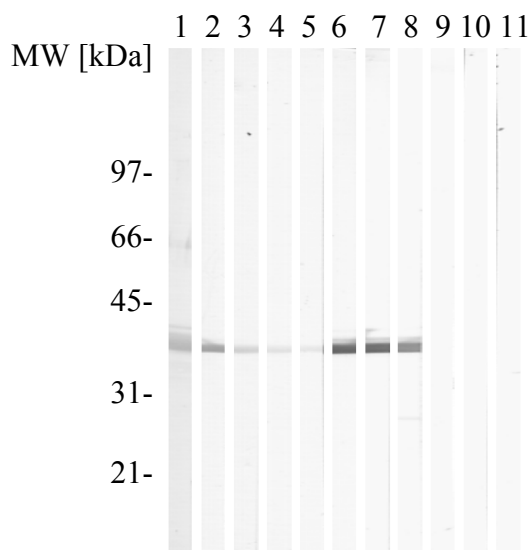
```

**Abbildung 7: Analyse der genomischen DNA von Ara h 8 unter der Verwendung spezifischer Primer, abgeleitet von AY328088 (Ara h 8.0101).**

Die Großbuchstaben in der Nukleotidsequenz zeigen die Exons an, Kleinbuchstaben das Intron. Die bestimmte Aminosäuresequenz ist über der Gensequenz angegeben, die grau markierten Aminosäuren weichen von der Ara h 8.0101 Sequenz ab.

Für die Charakterisierung und Klonierung der Gensequenz wurde mRNA aus der Erdnuss isoliert und mithilfe des *Not I* d(T)<sub>18</sub>-Primers in cDNA umgeschrieben. Um die Zweitstrang-Synthese durchführen zu können und erste Sequenzinformationen zu erhalten, wurde der 8M.f-Primer in Kombination mit dem *Not I* d(T)<sub>18</sub>-Primer verwendet. Das Amplifikat wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO ligiert und sequenziert. Ein Datenbankvergleich brachte die Sequenz AY726607 hervor, die einem PR10-Protein zugeordnet werden konnte und eine hohe Homologie zu der amplifizierten Ara h 8-Sequenz aufwies. Lediglich im 3'-Bereich waren Abweichungen vorhanden. Da der abgeleitete N-Terminus identisch war, im Gegensatz zu der publizierten Sequenz, wurde die AY726607 Sequenz genutzt, um einen Vorwärtsprimer zu konstruieren (8R.f). Ein Rückwärtsprimer wurde entsprechend der Sequenzierungsergebnisse angefertigt. Die auf diese Weise amplifizierte Ara h 8-Sequenz wurde zur Expression über die primerinternen Restriktionsschnittstellen *EcoR I* und *EcoR V* aus dem pCR2.1-TOPO herausgeschnitten und in den Leserahmen des gleichermaßen geschnittenen Vektors pET32b ligiert. Dieses Konstrukt wurde sequenziert, in BL21(DE3) Zellen transformiert und unter Standardbedingungen exprimiert. Nach Lyse der Bakterienzellen konnten unter nativen Bedingungen fast 80 % des Proteins in gelöster Form im Überstand nachgewiesen werden. Die Reinigung des 36 kDa großen Proteins erfolgte über eine Talon-Säule, wobei eine Ausbeute von ca. 8,5 mg gereinigtem Protein pro l Expressionskultur erzielt wurde. Aliquots der verschiedenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die gereinigtes Ara h 8 enthielten, wurden gepoolt, gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend aliquotiert und lyophilisiert.

Die Immunreaktivität des rekombinanten Ara h 8 wurde im Western Blot mit Patientenseren (WE-J, MW-J, KH-J, KU-J und KP-28) nachgewiesen. Die Seren wurden aufgrund von positiven Ergebnissen im CAP-Test mit dem bereits publizierten, rekombinanten Ara h 8 vorselektiert (Tabelle 8). Zur Kontrolle wurden der polyklonale anti-Gly m 4 Antikörper und der monoklonale, gegen den His-Tag gerichtete anti-His Antikörper mitgeführt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Immunoblot von rAra h 8 (rAra h 8.0201) zum Nachweis der IgE-Reaktivität**

(SDS-PAGE, 5 µg rAra h 8/cm, reduzierende Bedingungen, PVDF Membran)

Spur 1: India Ink, Spur 2-6: 5 Patientenseren (WE-J, MW-J, KH-J, KU-J, KP28), Spur 7: Kaninchen anti-Gly m 4, Spur 8: anti-His Antikörper, Spur 9: Negativkontrolle anti-Human IgE, Spur 10: Negativkontrolle anti-Kaninchen IgG, Spur 11: Negativkontrolle anti-Maus IgE.

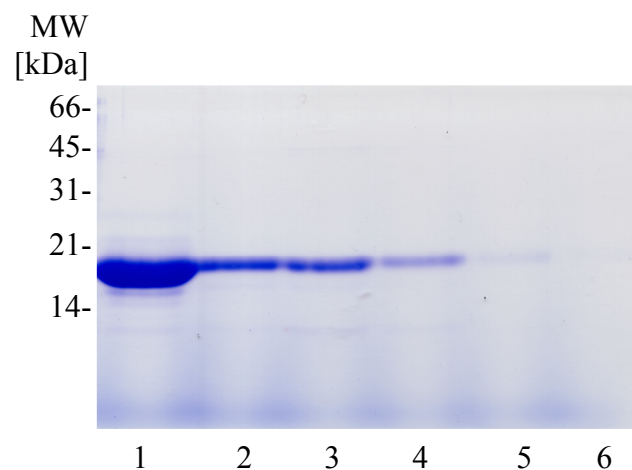
Der dargestellte Immunoblot zeigt die IgE-Reaktivität von rAra h 8 mit den getesteten Patientenseren. Dabei reagierte der Patient KP28 am stärksten mit dem Allergen, in der Intensität vergleichbar mit dem anti-Gly m 4 und anti-His Antikörper. Bei den Patienten KH-J und KU-J konnte nur leichte Reaktivität detektiert werden.

**Tabelle 8: Charakteristika der im Immunoblot eingesetzten Patientenseren.**

Auflistung der Konzentration des Gesamt-IgE, der Reaktivität zu Ara h 8, dem Bet v 1-Homologen der Birke, sowie zum Erdnuss-, Soja- und Birkenpollen-Gesamtextrakt.

Patient	Gesamt IgE [kU/l]	rAra h 8 [kU/l]		Erdnuss [kU/l]		Soja [kU/l]		Birke [kU/l]	
		[kU/l]	CAP	[kU/l]	CAP	[kU/l]	CAP	[kU/l]	CAP
WE-J	5,1	5,1	3	n.d.	n.d.	0	0	10,3	3
MW-J	637	45,9	4	2,0	2	0,4	1	>100	6
KH-J	296	9,2	3	0,7	1	0,6	1	66,3	5
KU-J	156	8,8	3	3,1	2	0,5	1	35,2	4
KP28	1696	>100	6	80,7	5	28,7	4	>100	6
JG3	3693	n.d.	n.d.	>100	6	12	3	9,2	3

Zur Optimierung der Expressionsausbeuten, der Löslichkeit und der Reduktion der angefügten Tags des Ara h 8 wurde von der Firma Geneart eine auf die Expression in *E.coli* optimierte Gensequenz synthetisiert. Diese wurde über die *Xho* I und *Nde* I Schnittstellen des Vektors pET23b kloniert, so dass der T7-Tag und die komplette MCS herausgeschnitten wurde und das Ara h 8 als 17,7 kDa Fusionsprotein mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert werden konnte. Zur Expression wurde das Konstrukt in BL21(DE3)-Zellen transformiert. Mithilfe der nativen Reinigungsmethode über eine Talon-Säule konnten Ausbeuten von 12 mg gereinigtem Ara h 8 pro Liter Kultur erreicht werden (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Trennung von Ara h 8 nach Expression aus pET23b-Ara h 8 Geneart über  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätschromatographie.**  
(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)  
Spur 1-6: Elutionsschritte 1-6

### 3.1.3 Biochemische und physikochemische Untersuchung des nAra h 8

Die Analyse der klonierten Ara h 8 Gensequenz und der daraus resultierenden Primärsequenz (Ara h 8.0201) zeigt deutliche Unterschiede zu der bereits veröffentlichten Ara h 8.0101 Sequenz. Die *in silico* translatierte Sequenz unterschied sich nicht nur am N-Terminus, lediglich 54 % der gesamten Proteinsequenz waren identisch. Eine Suche in der Datenbank zeigte eine höhere Identität (85,1 %) zu einem kürzlich veröffentlichten Protein, dem AhPR10 (Acc No. AY726607) (Abbildung 10). Aufgrund dieser Abweichungen wurden die theoretischen Molekulargewichte bestimmt. Während Ara h 8.0101 ein Molekulargewicht von 16,95 kDa ausweist, konnte bei der neu klonierten Isoform ein Molekulargewicht von 16,28 kDa ermittelt werden. Die neu klonierte Isoform wurde in die GenBank Datenbank mit

der Accession Number EU046325 gestellt und wurde offiziell als neues Isoallergen Ara h 8.0201 klassifiziert.

```

GVHTFEEESTSP
1
Ara h 8.0101 MGVFTFEDEITSTVPPAKLYNA MKDADSI TPKLIID DVK SVEIIVEGNGGP
Ara h 8.0201 .GVHTFEEESTSPVPPAKL F KATVVDGDELTPKLI PAIQSIEIIVEGNGGP
AhPR10 (AY726607) MGVHTFEEESTSPVPPAKL F KATVVDGDELTPKLI PAIQSIEIIVEGNGGP

51
Ara h 8.0101 GTIKKLTIV EDGETK F I LHKVES IDEANYAYNYSVVG GVALPPTAEKITF
Ara h 8.0201 GTVKKVTAV EDGKTSYVLHKIDAIDEATYTYDYTISGGTGFQEILEKVSF
AhPR10 (AY726607) GTVKKVTAV EDGKTSYVLHKIDAIDEATYTYDYTISGGTGFQEILEKVSF

101
Ara h 8.0101 ETKLVEGPN GGSIGKLT LKYHTKGD AKPDEEELKKGKAKGEGLFRAIEGY
Ara h 8.0201 KTKLEAADG G .SKIKVSVTFHTKGDAPLPDE VHQDVKQK SQGIFKAIEGY
AhPR10 (AY726607) KTKLEAADG G .SKIKVSVTFHTKGDAPLPDE FIKMSTKSQE . .SHAMRVM

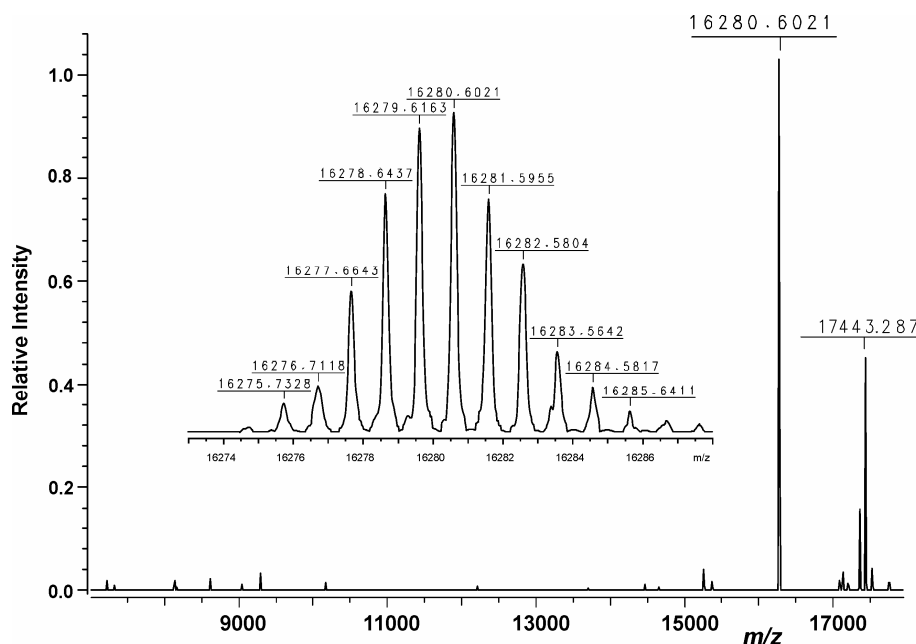
151
Ara h 8.0101 VLANPTQY
Ara h 8.0201 VLSN....
AhPR10 (AY726607) FVH....

```

**Abbildung 10: Alignment der Proteinsequenzen von Ara h 8.0101, Ara h 8.0201 und Ah PR10.**

In allen Sequenzen vorkommende identische Aminosäuren wurden schwarz markiert, Übereinstimmungen in nur zwei Sequenzen grau. Das Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung ist in fetten, unterstrichenen Buchstaben angegeben.

Das Molekulargewicht des natürlichen Proteins sollte mittels Massenspektroskopie analysiert werden und mit Ara h 8.0101 und dem neu identifizierten Ara h 8.0201 verglichen werden. Zur exakten Größenbestimmung wurde zunächst eine ESI FT-ICR MS Analyse durchgeführt. Hierzu wurde gereinigtes natürliches Ara h 8 aus der Fraktion B7 der Ionenaustauschchromatographie (Abbildung 6 b) eingesetzt. Das ladungsbereinigte Massenspektrum der positiven Ionen zeigt einen Hauptpeak bei 16 280,60 Da und einen schwächeren bei 17 443,287 Da (Abbildung 11). Der Basispeak der Isotopenverteilung des ersten Moleküls stimmt dabei exakt mit dem kalkulierten Molekulargewicht von Ara h 8.0201 (16 280,17 Da) überein, jedoch nicht mit Ara h 8.0101 (16 950,6 Da).



**Abbildung 11: Massenspektrometrische Analyse des natürlichen Ara h 8.**  
Übersicht des ESI FT-ICR MS/MS Spektrums und in der Vergrößerung die molekularen Ionen in der Region um 16 280 kDa.

Um das natürliche Ara h 8 genauer zu untersuchen und mit der neuen Isoform Ara h 8.0201 abzugleichen, wurde es tryptisch verdaut und wurden die Fragmente mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Von den 17 möglichen Fragmenten konnten 16 den theoretischen Massen von Ara h 8.0201 zugeordnet werden. Bei kleinen Fragmenten (<500 Da) war dies möglich durch Auffinden von Fragmenten, an denen an einer Schnittstelle nicht gespalten wurde (Miscleavage). Somit konnten 94 % der Proteinsequenz von Ara h 8.0201 mit den Fragmenten des natürlichen Proteins abgedeckt werden (Abbildung 12).

```

1  GVHTFEEESTSPVPPAKLFKATVVDGDELTPKLIPAIQSI EIVEGNGGPG
51  TVKKVTAVEDGKTSYVLHKIDAIDEATYTYDYTISGGTGFQEILEKVSFK
101 TKLEAADGGSKIKVSVTFHTKGDAPLPDEVHQDVKQKSQGIFKAIEGYVL
151 SN

```

**Abbildung 12: Ergebnis des Trypsin Fingerprints vom natürlichen Ara h 8**  
Die Proteinsequenz von Ara h 8.0201 ist zu 94 % mit den identifizierten Fragmenten des tryptischen Verdauens vom nAra h 8 (grau markiert) abgedeckt. Der schwarze Rahmen zeigt zudem den über Proteinsequenzierung bestimmten N-Terminus an.

Da das rekombinante Ara h 8 in seiner Proteinsequenz dem natürlichen entspricht und keine Hinweise auf potentielle posttranslationalen Modifikationen vorhanden sind, wurde rAra h 8 für anschließende funktionelle Untersuchungen eingesetzt.

### 3.1.4 RNase-Aktivitätsnachweis

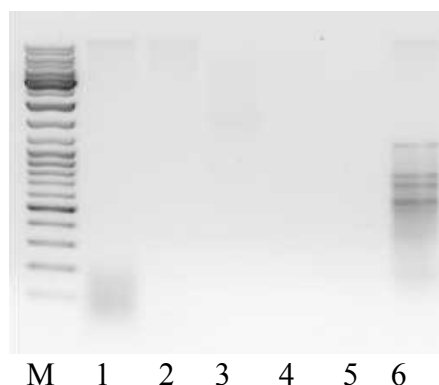
Um das Ara h 8 auf eine eventuell vorhandene RNase-Aktivität zu überprüfen, wurden drei verschiedene Tests mit dem 17,7 kDa großen rekombinanten Ara h 8 (Konstrukt aus pET23b-Ara h 8 Geneart) durchgeführt.

#### Zymogramm

Beim Zymogramm wurde RNA aus der Torula Hefe in die Gelmatrix eines SDS-Geles mit eingegossen. In der anschließenden Gelelektrophorese wurden verschiedene Konzentrationen an rAra h 8 und zur Positivkontrolle RNase A eingesetzt. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurde die im Gel befindliche RNA mit Toluidin-Blau angefärbt. Ein deutlicher RNA-Abbau war in den RNase A enthaltenen Proben zu sehen, für das rAra h 8 konnte mit diesem Versuch jedoch keine eindeutige RNase-Aktivität nachgewiesen werden.

#### RNase-Nachweis im Agarosegel

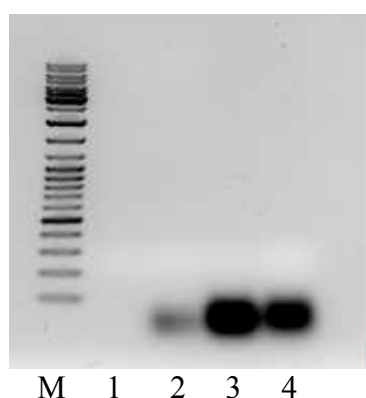
Da die Ergebnisse im Zymogramm nicht eindeutig waren, wurde ein weiterer RNase-Aktivitätstest durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus frischem Pflanzenmaterial (Gras) isoliert. Jeweils 2 µg dieser RNA wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rAra h 8 versetzt (0,2, 2 und 20 µg) und inkubiert. Zur Positivkontrolle wurde RNase A (0,2 µg und 2 µg) mitgeführt, zur Negativkontrolle zum gleichen Volumenanteil RNase-freies Wasser. In Abbildung 13 ist deutlich zu erkennen, dass bereits durch 0,2 µg RNase A die RNA komplett abgebaut wurde. Eine deutliche RNase-Aktivität war auch beim rAra h 8 nachweisbar. Beim Einsatz von 0,2 µg rAra h 8 war nur noch degradierte RNA zu erkennen, bei 2 und 20 µg rAra h 8 wurde die RNA vollständig abgebaut.



**Abbildung 13: RNase-Aktivitätsnachweis von Ara h 8 im Agarosegel durch Abbau von Pflanzen-RNA**  
M: Marker, Spur 1: 0,2 µg rAra h 8, Spur 2: 2 µg rAra h 8, Spur 3: 20 µg rAra h 8, Spur 4: 0,2 µg RNase A, Spur 5: 2 µg RNase A, Spur 6: Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser.

### RNase-Nachweis mittels photometrischer Bestimmung

Zur Absicherung der RNase-Aktivitäts-Ergebnisse und zur Quantifizierung der RNase-Aktivität wurde RNA aus der Torula Hefe mit Konzentrationen von 2 µg Ara h 8 und als Positivkontrolle mit 2 µg RNase A versetzt. Als Negativkontrolle dienten 2 µg rekombinantes Oleosin, welches unter den gleichen Bedingungen wie das Ara h 8 exprimiert und gereinigt worden war, um so eventuelle Kontaminationen mit RNasen während dieser Herstellungsprozedur zu ermitteln. Zur weiteren Kontrolle wurde ein Aliquot mit dem gleichen Volumen an RNase-freiem Wasser versetzt. Während die RNase A nach der Inkubationszeit die komplette RNA abgebaut hatte, war beim Einsatz von rAra h 8 nur noch 63 % der ursprünglich eingesetzten RNA nachweisbar (Abbildung 14).



	RNA-Konz.	
	[µg/ml]	OD <sub>260</sub>
<b>RNase A</b>	0	0,12
<b>rAra h 8</b>	88,4	2,26
<b>rOleosin</b>	302	7,40
<b>Kontrolle</b>	238	5,83

**Abbildung 14: Semiquantitativen Bestimmung der RNase-Aktivität durch Abbau von Hefe-RNA mittels Photometrie.**

links: Agarose-Gel, M: Marker, Spur 1: 2 µg RNase A, Spur 2: 2 µg rAra h 8, Spur 3: 2 µg rOleosin 8, Spur 4: Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser  
rechts: Bestimmung der RNA-Konzentration und der OD<sub>260</sub> nach Inkubation und anschließender Reinigung, sowie Abschätzung des prozentualen RNA-Abbaus und der RNase-Aktivität.

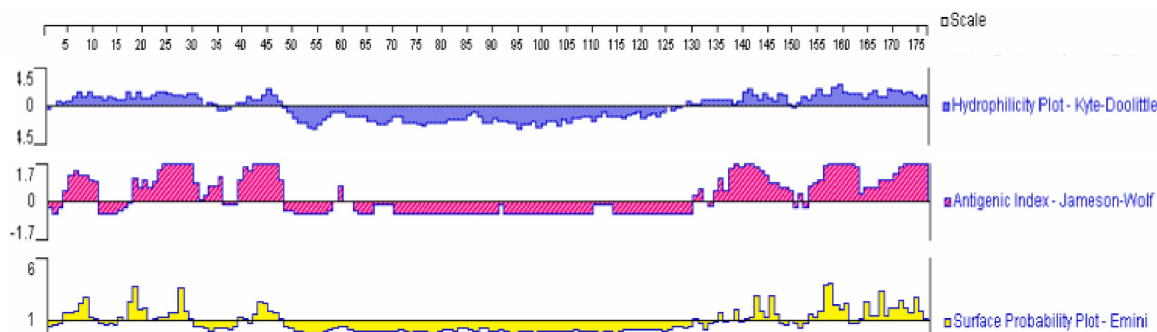
Die Oleosin-Kontrolle belegt, dass während der Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine keine RNasen verschleppt worden sind. Die höhere RNA-Konzentration im Vergleich zu der H<sub>2</sub>O-Kontrolle lässt sich durch den Reinigungsschritt nach der Inkubation erklären. Eindeutig konnte in diesem wie auch im vorherigen Experiment die RNase-Aktivität von rAra h 8 bestätigt werden.

## 3.2 Oleosin

Das in Ölkörperchen vorkommende Oleosin konnte bereits aus der Erdnuss isoliert werden. Zudem gelang die Bestimmung der Gensequenz, wodurch die Primärstruktur bestimmt werden konnte. Erdnuss-Oleosin wurde als potentiell allergen eingestuft, jedoch konnte diese Beobachtung nicht ausreichend gefestigt werden. Daher sollte die IgE-Reaktivität des Oleosins überprüft werden. Zu diesem Zweck sollte das Protein rekombinant dargestellt und gereinigt werden. Zur Ermittlung der IgE-Prävalenz sollte das natürliche Protein als Referenzprotein mitgeführt werden.

### 3.2.1 Herstellung von Antiserum gegen Oleosin

Zur Detektion des potentiellen Erdnuss-Allergens Oleosin im Erdnussextrakt und zur Kontrolle der im Folgenden näher beschriebenen Reinigungsschritte war es notwendig, Antikörper herzustellen, die gegen dieses Protein gerichtet sind. Dies sollte mit der Herstellung von „multiplen antigenen Peptiden“ (MAP) erreicht werden. Zur Immunisierung wurden chemisch synthetisierte Peptide zur Steigerung der Immunogenität als peptidfunktionalisierte Dendrimere eingesetzt. Die hierfür erforderlichen Peptide wurden so konstruiert, dass sie nicht im hydrophoben Bereich des Oleosins und somit nicht innerhalb des Ölkörperchens liegen, sondern im Cytosol, in den außen liegenden hydrophilen N- und C-terminalen Bereichen. Zudem sollten die Peptide einen hohen antigenen Index aufweisen. Die Analyse der Oleosin-Proteinsequenz zur Bestimmung der Hydrophilizität erfolgte nach Kyte und Doolittle (1982). Der antigenen Index wurde nach Jameson und Wolf (1988) und die Oberflächenwahrscheinlichkeit nach Emini *et al.* (1985) berechnet (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Analyse der Oleosin-Proteinsequenz (AY605694).**

Darstellung der Hydrophilizität nach Kyte und Doolittle, des Antigenen Indexes nach Jameson und Wolf sowie der Oberflächenwahrscheinlichkeit nach Emami.

Die für die zelluläre Immunantwort des zu immunisierenden Kaninchens notwendigen T-Zell-Epitope konnten nicht direkt vorausgesagt werden. Unter Zuhilfenahme des Programms ProPred wurden jedoch MHC-Klasse II bindende Peptide des Oleosins bestimmt, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit im Kaninchen T-Zell-Epitope bilden. Für die Peptidsynthese wurden schließlich zwei Sequenzen bestimmt, die die genannten Kriterien erfüllten: MAP 1 aus dem N-terminalen Bereich mit der Aminosäurefolge VQVHTPTTQRVDVPR (MW 7 333 Da) und MAP 2, ausgehend vom C-terminalen Bereich, mit der Sequenz MADYVGQKTKDAGQ (MW 6 961 Da) (Abbildung 16).

```

1- MATATDRAPH QVQVHTPTTQ RVDVPRRGYD VSGGGIKTLL PERGPSTSQI
50- IAVLVGVPTG GTLLLLSGLS LLGTIIGLAI ATPVFTFFSP VIVPAVVTIG
100- LAVTGILTAG ACGLTGLMSL SWMINFIRQV HGTTVPDQLD SVKRRMADMA
150- DYVGQKTKDA GQEITKAQDV KRSSS

```

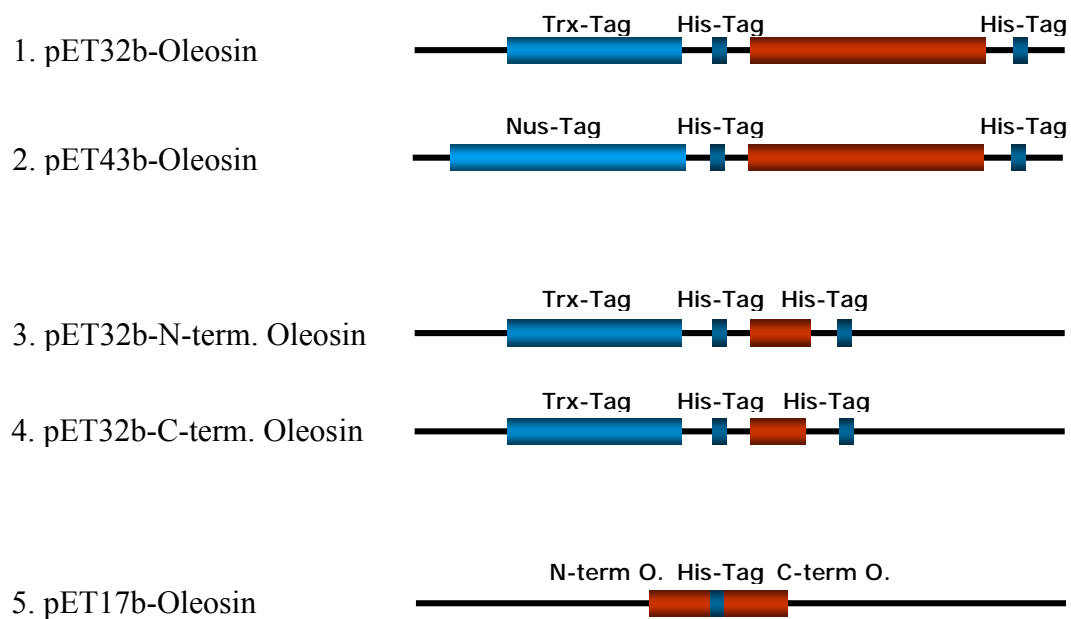
**Abbildung 16: Darstellung der Oleosin-Proteinsequenz mit den ermittelten T-Zell-Epitopen und den ausgewählten Sequenzen zur MAP-Synthese.**

Blau: Sequenz der synthetisierten MAPs, unterstrichen: vorhergesagte T-Zell-Epitope.

Die Peptide wurden über die Aminogruppen an einem Kern aus drei Lysinen generiert, so dass eine verzweigte, multiantigene Struktur entstand. Zur Herstellung der Antikörper wurde ein Kaninchen mit den erzeugten Peptiden immunisiert. Dieses wurde in der BGFA in Bochum durchgeführt. Nach Austestung der Seren konnte ein Titer von 1:1000 bestimmt werden.

### 3.2.2 Strategien zur Herstellung und Klonierung von Oleosin

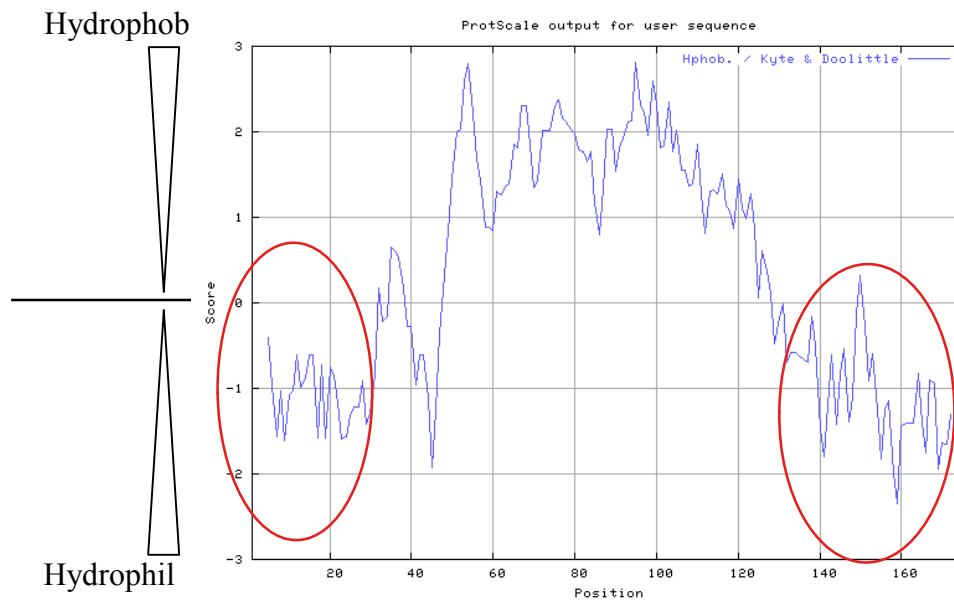
Zur Untersuchung und Charakterisierung von Oleosin war zunächst die Herstellung eines rekombinanten Konstruktes erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Klonierungsstrategien angewendet. Eine schematische Übersicht der verschiedenen hergestellten Expressionskonstrukte mit den durch den jeweiligen Vektor eingefügten Tags ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Übersicht zur Klonierung der verschiedenen Oleosin-Konstrukte.**

Rot dargestellt sind die Oleosinsequenzen, die über die *Bam*H I/*Eco*R I-Schnittstellen in die Vektoren pET32b und pET43b bzw. über die *Nde* I/*Eco*R I-Schnittstellen in den Vektor pET17b kloniert wurden. Blau dargestellt sind die Tags, die den Oleosinsequenzen angefügt wurden.

Als Expressionsvektor wurde zunächst der pET32b-Vektor verwendet, der eine kodierende Sequenz für einen N- und C-terminalen His-Tag besitzt, die die Reinigung des exprimierten Proteins erleichtern sollten. Da das Oleosin einen hohen hydrophoben Anteil aufweist (Abbildung 18), könnte dies Probleme bei der Löslichkeit des Proteins hervorrufen. Der zusätzliche Thioredoxin (Trx)-Tag soll deshalb die Faltung unterstützen und damit Löslichkeit verbessern. Als zweiter Expressionsvektor für die Oleosin-Volllänge wurde der Vektor pET43b ausgewählt. Dieser besitzt statt des Trx-Tags einen Nus-Tag, der ebenfalls die cytoplasmatische Löslichkeit des exprimierten Proteins erhöhen soll.

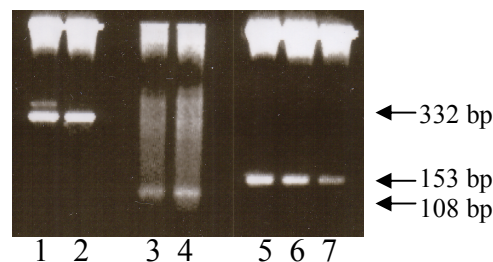


**Abbildung 18:** Hydrophobizitätsdiagramm des Oleosins nach Kyte und Doolittle.

Zur Klonierung der Gensequenz wurde RNA aus der Erdnuss isoliert und mithilfe des Oligo d(T)<sub>15</sub>-Primers die Erststrangsynthese der cDNA durchgeführt. Für die weitere Klonierung der Vollängen-Gensequenz wurden genspezifische Oligonukleotide (Oleo.f/Oleo.r) entworfen, die von der veröffentlichten Oleosinsequenz (GenBank Acc No. AY605694) abgeleitet worden waren. An den 5'-Enden der Oligonukleotide wurden Restriktionsschnittstellen angehängt, die sowohl eine Klonierung in den Leserahmen des pET32b- als auch des pET43b-Vektors ermöglichten. Die amplifizierte Gensequenz wurde deshalb mit der Restriktionsschnittstelle *Bam*HI am 5'-Ende und *Eco*R I am 3'-Ende verlängert. Das Amplifikat von 537 bp entsprach der erwarteten Größe und konnte direkt aus dem PCR-Ansatz in den Vektor pGEMT-Easy (3021 bp) kloniert und in *E.coli* transformiert werden. Die Plasmide wurden isoliert, über Restriktion mit *Eco*R I kontrolliert (siehe Abbildung 19) und vor der Klonierung in den Expressionsvektor pET32b und pET43b durch Sequenzierung überprüft.

Neben der Klonierung der Vollängensequenz wurden Teilsequenzen amplifiziert, die nur den hydrophilen N-terminalen Bereich (AS 1-31) bzw. den hydrophilen C-terminalen (AS 128-176) Bereich kodieren. Dies sollte die eventuell durch den hydrophoben zentralen Proteinanteil aufkommenden Solubilisierungsschwierigkeiten umgehen. Für die Amplifikation des N-terminalen Fragments wurde der Oleo.f-Primer verwendet und ein

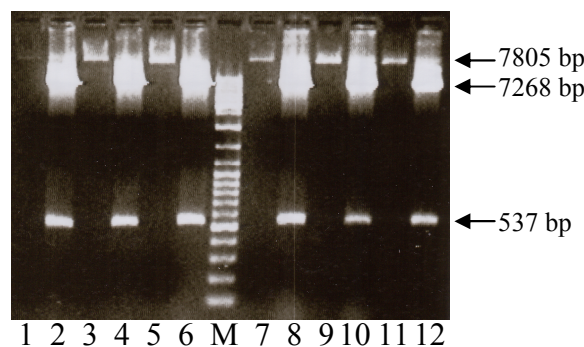
Rückwärtsprimer (NOleo.r) entworfen, dessen Bindungsort im N-terminalen Bereich liegt und für die Klonierung eine *EcoR* I-Schnittstelle am 5'-Ende beinhaltet. Für das C-terminale Fragment konnte dementsprechend auf den Oleo.r-Primer zurückgegriffen werden. Der Vorwärtsprimer, dessen Bindungsort im C-terminalen Bereich angesiedelt ist, wurde mit einer *BamH* I-Schnittstelle am 5'-Ende entworfen und als COleo.f bezeichnet. Das N- und C-terminale Fragment konnte mit der erwarteten Größe von 108 bp bzw. 153 bp amplifiziert und in den pGEMT-Easy-Vektor zwischenkloniert werden. Mit Restriktionsanalysen bestätigte Konstrukte wurden durch Sequenzierung analysiert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Restriktionsanalyse verschiedener Oleosin Konstrukte: Verdau mit *EcoR* I.**

Spur 1 und 2: pGEMT-Oleosin, Spur 3 und 4: pGEMT-N-terminales Oleosinfragment, Spur 5-7: pGEMT-C-terminales Oleosinfragment.

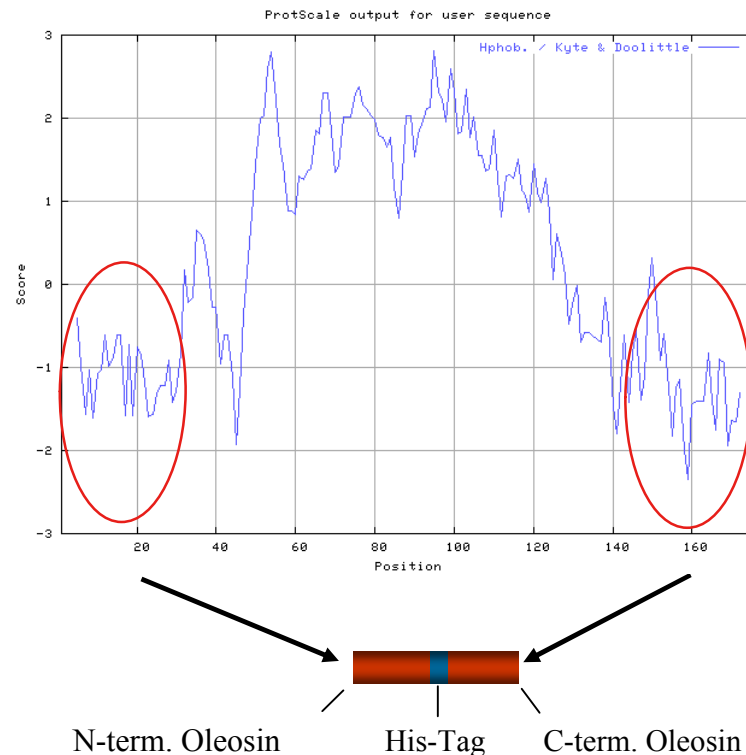
Nach einer präparativen Gelelektrophorese erfolgte die Ligation der Oleosinsequenzen in den ebenfalls mit den gleichen Enzymen restringierten Vektor pET32b bzw. pET43b. Nach Transformation in *E.coli* wurden die erhaltenen Klone entweder durch Restriktionsverdau (Abbildung 20) und/oder PCR überprüft. Ausgewählte, positiv getestete Klone wurden sequenziert.



**Abbildung 20: Überprüfung der pET43b-Oleosin Konstrukte durch Minipräparation und Restriktionsanalysen mit *EcoR* I und *BamH* I.**

Spur 1 und 2: Klon 1, Minipräparation und Verdau, Spur 3 und 4: Klon 2, Minipräparation und Verdau, Spur 5 und 6: Klon 3, Minipräparation und Verdau, M: peqGold DNA-Marker, Spur 7 und 8: Klon 1, Minipräparation und Verdau, Spur 9 und 10: Klon 2, Minipräparation und Verdau, Spur 11 und 12: Klon 3, Minipräparation und Verdau

Neben den vier beschriebenen Plasmiden wurde eine weitere Gensequenz synthetisiert. Diese sollte die Vorteile der N- und C-terminalen Klone mit der Struktur des natürlichen Oleosins vereinen. Dazu wurde der hydrophobe Anteil des Oleosins eliminiert und die N- und C-terminalen Fragmente miteinander verbunden. Als Abstandshalter der beiden Fragmente wurde ein His-Tag gewählt, der zudem der späteren Reinigung des heterolog exprimierten Proteins dienen sollte (Abbildung 21).



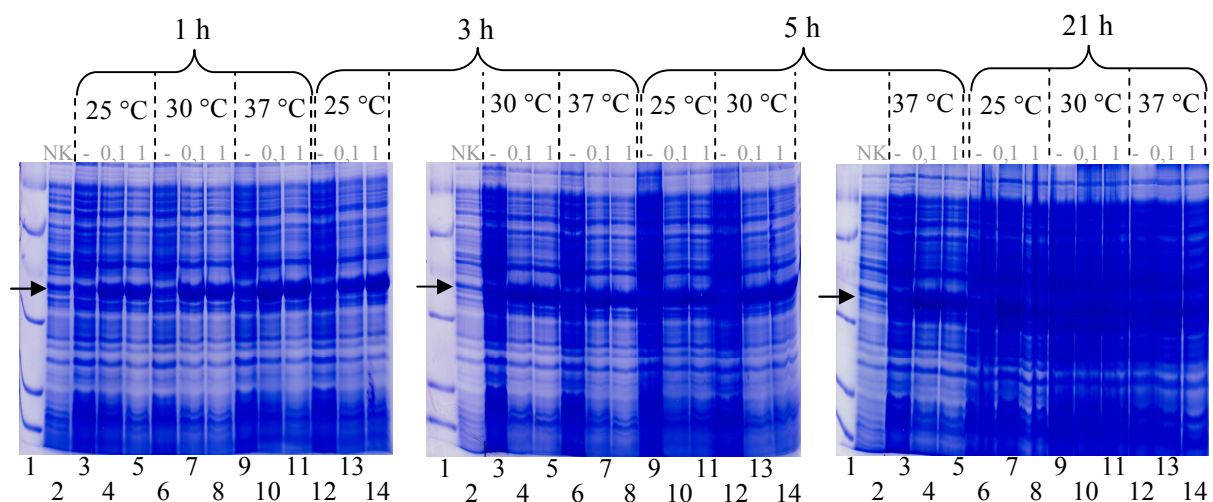
**Abbildung 21: Hydrophobizitätsdiagramm des Oleosins nach Kyte und Doolittle zur Bestimmung der für die Synthese eines hydrophilen Konstruktes wichtigen Bereiche.**

Die angepasste DNA-Sequenz wurde von der Firma Genart synthetisiert, wobei die Codons zur Expression in *E. coli* optimiert wurden. Das heißt, in *E. coli* selten vorkommende Codons wurden in häufige Codons umgeändert, um eine optimale Expression mit hohen Ausbeuten und geringen Translationsabbrüchen zu erhalten. Die Sequenz wurde im Leseraster über die mitsynthetisierten Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Eco*R I aus dem gelieferten Vektorkonstrukt herausgeschnitten und in den Vektor pET17b ligiert. Durch Verwendung der *Nde* I-Schnittstelle und das Einfügen von zwei Stoppcodons zwischen dem Ende der Sequenz und der *Eco*R I-Schnittstelle wurden keine zusätzlichen Tags oder Aminosäuren an das 5'- und 3'-Ende der Sequenz angefügt. Das Konstrukt wurde zunächst mittels Verdau und anschließender Sequenzierung überprüft.

Die fünf verschiedenen Oleosinkonstrukte wurden wie beschrieben angefertigt und konnten anschließend für die Transformation in *E. coli* Zellen zur rekombinanten Darstellung verwendet werden.

### 3.2.3 Expression und Reinigung von Oleosin

Zur heterologen Expression von Oleosin bzw. von Oleosin-Fragmenten wurden die sequenzierten Konstrukte in den *E. coli* Stamm Origami transformiert und auf Selektivmedium inkubiert. Von einzelnen ausgewählten Kolonien wurde eine Expression im kleinen Maßstab über eine standardmäßige Induktionsdauer von 3 Stunden durchgeführt, um eine erfolgreiche Expression im großen Maßstab abzusichern. Die optimale Expressionsdauer und -temperatur, sowie die Auswirkung verschiedener IPTG-Konzentrationen wurde mit einem positiv getesteten Klon ermittelt. Während verschiedene Konzentrationen von IPTG (0,1 mM und 1 mM) und unterschiedliche Temperaturen (25 °C, 30 °C und 37 °C) zu den gleichen Ergebnissen führten, konnten Unterschiede in Abhängigkeit zur Expressionsdauer festgestellt werden. Nach 5 bis 21 Stunden Expression war ein starker Anstieg der bakterieneigenen Proteine zu beobachten, während die Konzentration des exprimierten Proteins im Vergleich zu 1 h und 3 h konstant blieb. In Abbildung 22 ist dies am Beispiel von pET32b-Oleosin zu sehen.



**Abbildung 22: Expression des Oleosins aus dem Konstrukt pET32b-Oleosin.**

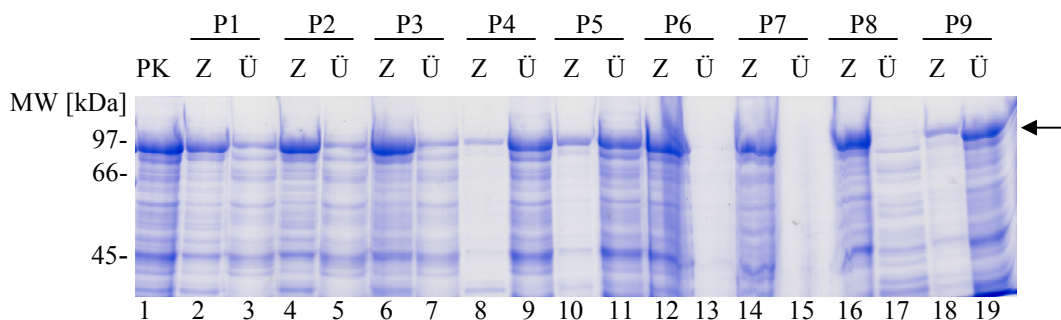
(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

Getestet wurden verschiedene Expressionszeiten (1 h, 3 h, 5 h und 21 h), Temperaturen (25 °C, 30 °C und 37 °C) und IPTG Konzentration (graue Zahlen: 0,1 M und 1 M). NK: Negativkontrolle zum Zeitpunkt 0. Die Bande des exprimierten Oleosins (38,4 kDa) ist durch einen Pfeil markiert.

Neben der Expressionsrate wurde die Löslichkeit der exprimierten Proteine der einzelnen Konstrukte überprüft. Während die Konstrukte mit der Volllängengensequenz sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Harnstoff kaum löslich waren, ließen sich die Proteine der Oleosinfragmente (N-terminales Oleosin-, C-terminales Oleosin- und Geneart-Konstrukt) unter nativen Bedingungen in Lösung bringen. Für das Konstrukt aus pET43b-Oleosin wurde eine ausführliche Löslichkeitsstudie durchgeführt, bei der die Bakterienzellen mit verschiedenen Puffern, Detergentien und Verfahren behandelt wurden. Es wurden neun Ansätze zur Lyse der Zellen und Solubilisierung des Oleosins gewählt:

- P1: denaturierender Lysispuffer
- P2: denaturierender Lysispuffer, Lyse bei 4 °C
- P3: Inkubation bei 4 °C, anschließend Lyse mit nativem Puffer
- P4: SB3-10-Puffer
- P5: SB3-10-Puffer mit NP-40
- P6: Guanidinhydrochlorid-Puffer mit EDTA
- P7: Guanidinhydrochlorid-Puffer ohne EDTA
- P8: nativer Lysispuffer
- P9: SDS-Puffer

Nach 30 min Lyse wurden die Zellen pelletiert, so dass das Sediment und der Überstand im SDS-PAGE analysiert werden konnte (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Austestung von verschiedenen Puffern bzw. Methoden zur Untersuchung der Löslichkeit von Oleosin aus Zellpellets.**

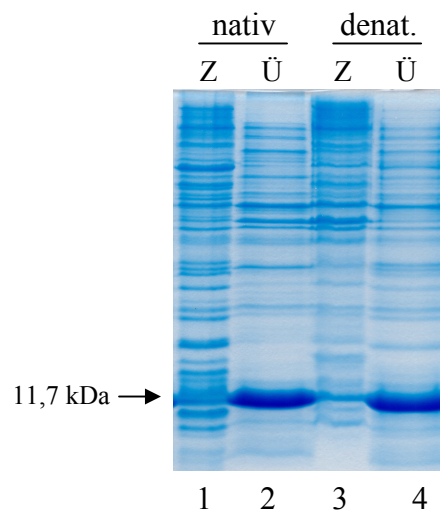
(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

P1-P9: Puffer bzw. Methoden 1-9, PK: Positivkontrolle (Zellpellet ohne Lyse) Z: Zellpellet nach Lyse, Ü: Überstand des Lysates.

Exprimiert wurde das Oleosin aus dem Konstrukt pET43b-Oleosin. Das rekombinante Protein hat ein Molekulargewicht von 85 kDa (Pfeil).

Eine erfolgreiche Solubilisierung konnte ausschließlich den das Detergens SB3-10 enthaltenen Puffern (Puffer 4 und 5) sowie mit dem SDS-Puffer (Puffer 9) erreicht werden. Zur weiteren Reinigung über Metallchelate-Affinitätschromatographie war jedoch eine Umpufferung notwendig, um die für die Reinigung störenden Detergentien zu entfernen bzw. in der Konzentration zu mindern. Dies wurde mittels Dialyse gegen den denaturierenden Standard-Puffer durchgeführt. Während der Dialyse fiel jedoch ca. 90 % des Proteins aus. Die Reinigung der restlichen Proteine über Metallchelate-Affinitätschromatographie führte zudem zu sehr schlechten Ausbeuten und einem nicht sauberen Endprodukt.

Aufgrund dieser schlechten Löslichkeiten und der aufwendigen Handhabung wurde auf das pET17b-Oleosin Geneart Konstrukt zurückgegriffen. In Abbildung 24 ist die Löslichkeitsstudie des Oleosins aus dem Konstrukt pET17b-Oleosin Geneart mit den Standard-Puffern unter nativen und denaturierenden Bedingungen zu sehen. Wie auch bei den Klonen des N- und C-terminalen Oleosinfragmentes war das exprimierte Protein zu fast 100 % unter nativen Bedingungen löslich.



**Abbildung 24: Löslichkeitsstudie des exprimierten Oleosins aus dem Konstrukt pET17b-Oleosin Geneart.**

(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

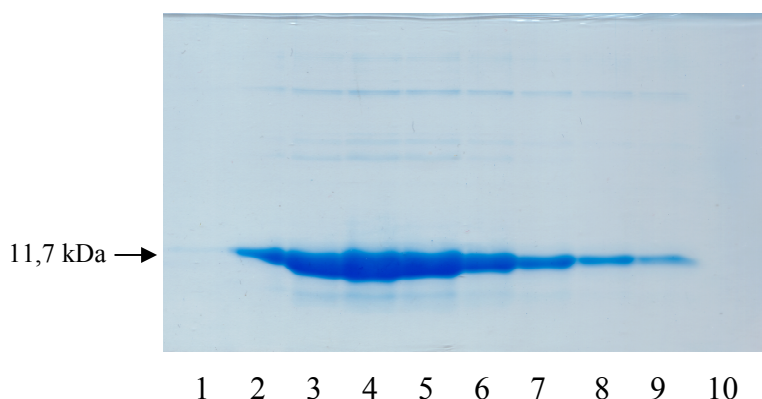
Spur 1: Zellpellet, nativ lysierte Zellen, Spur 2: Lysat, nativ lysierte Zellen, Spur 3:

Zellpellet, denat. lysierte Zellen, Spur 4: Lysat, denat. lysierte Zellen

Das exprimierte Oleosin hat ein Molekulargewicht von 11,7 kDa (Pfeil).

Mit den gewonnenen Erkenntnissen wurden Expressionen im großen Maßstab durchgeführt, um ausreichend Material für die Reinigung und die weiteren Versuche zu gewinnen. Aufgrund der Löslichkeit und Affinität war eine Isolierung des Oleosins über eine Talon-

Säule unter nativen Bedingungen mit hohen Ausbeuten möglich (Abbildung 25). Im Durchschnitt konnten 16 mg gereinigtes Protein pro Liter Bakterienkultur gewonnen werden.



**Abbildung 25: Reinigung von Oleosin aus dem Konstrukt pET17b-Oleosin über  $\text{Co}^{2+}$ -Chelat Affinitätschromatographie.**

(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

Spuren 1-10: Elutionsfraktionen 1-10. Das exprimierte Protein hat ein Molekulargewicht von 11,7 kDa.

In Tabelle 9 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich der Versuche zur Expression, Löslichkeit und Reinigung der verschiedenen rekombinanten Konstrukte aufgelistet.

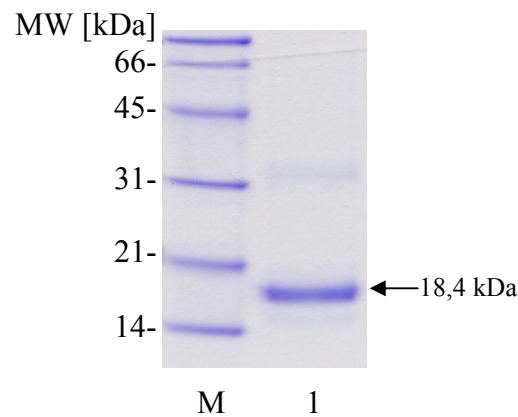
**Tabelle 9: Übersicht zur Eignung der rekombinanten Konstrukte aus der Expression von Oleosin.**

Konstrukt	Größe [kDa]	Expression	Löslichkeit	Reinigung
pET32b-Oleosin	38,4	+	-/+	-/+
pET43b-Oleosin	85,0	+	-/+	-/+
pET32b-N-terminales Oleosinfragment	23,5	+	++ (nativ)	++
pET32b-C-terminales Oleosinfragment	25,3	+	++ (nativ)	+
pET17b-Oleosin Geneart	11,7	+	+++ (nativ)	+++

### 3.2.4 Gewinnung und Reinigung von natürlichem Oleosin

Um die Extraktionsmethode des natürlichen Oleosins zu optimieren, wurde das Protein aus Erdnussöl und nicht aus wässrigem Erdnussextrakt isoliert. Zur Gewinnung von Oleosin-haltigem Erdnussöl wurde Erdnussmehl unter der Zugabe von Aceton entfettet. Aus dem Aceton-Erdnussöl-Gemisch konnte Oleosin durch Reinigung der Ölkörperchen mittels Zentrifugation über einem Saccharosekissen und anschließender Entfettung mit Hexan isoliert

werden (Abbildung 26). Die Analyse nach SDS-PAGE zeigt eine nahezu reine Oleosin-Bande bei 18,4 kDa. Die Gewinnung von Oleosin aus nicht entfettetem Erdnussmehl nach derselben Methode führte nicht zum Erfolg.



**Abbildung 26: Reinheitsprüfung des isolierten natürlichen Oleosins aus Erdnussöl**

(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

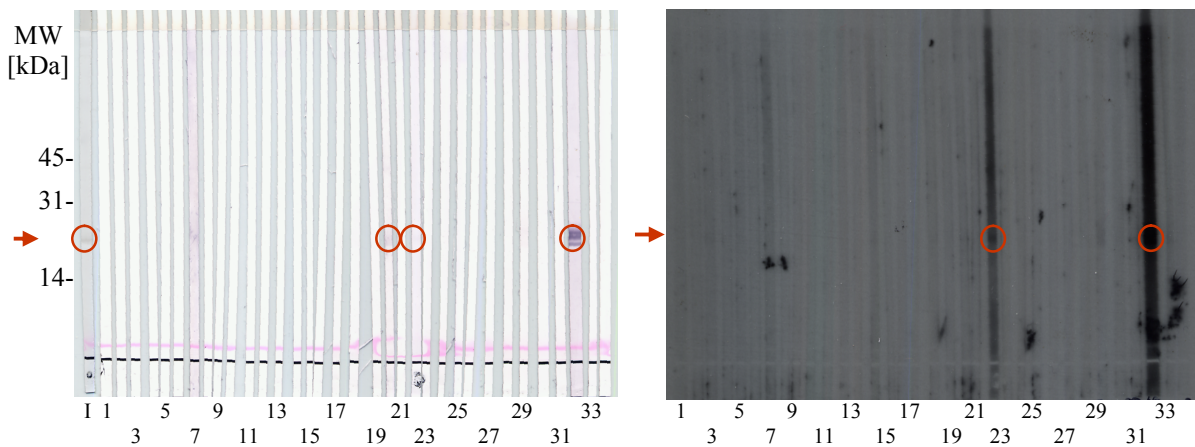
M: Molekulargewichtsmarker, Spur 1: isoliertes Protein.

### 3.2.5 IgE-Reaktivität von Oleosin

Aufgrund der vermuteten allergenen Wirkung von Oleosin wurden sowohl das rekombinante Oleosin (nach pET17b-Oleosin Geneart) als auch das natürliche Protein mit Patientenseren auf IgE-Reaktivität überprüft. Es wurden 33 Seren von Neurodermitikern mit bestehender Erdnussallergie eingesetzt.

Für den Immunoblot wurden in der SDS-PAGE 20 µg natürliches Oleosin bzw. 10 µg rekombinantes Oleosin pro cm aufgetragen. Da die Ergebnisse von Vorversuchen keine oder nur sehr schwache Reaktivitäten zeigten, wurde die sensitivere Chemilumineszenz-Methode verwendet. Zur Kontrolle wurde anschließend die Membran mit dem NBT/BCIP-System angefärbt. Als Positivkontrolle wurde jeweils das monospezifische MAP-Kaninchenserum (siehe 3.2.1) mitgeführt. Wie in Abbildung 27 und Abbildung 28 zu sehen ist, sind das nOleosin (18,4 kDa) und das rOleosin (11,7 kDa) jeweils in der India Ink-Färbung nachweisbar und werden von dem MAP-Kaninchenserum erkannt. Eindeutige IgE-Reaktivität konnte beim nOleosin im Immunoblot mit dem Patientenserum 20 nachgewiesen werden. Jedoch war hier keine korrespondierende Bande im Chemilumineszenz-Nachweis zu

erkennen. Dagegen zeigte das Patientenserum 22 nur eine sehr schwache IgE-Reaktivität im Immunoblot, die im Chemilumineszenz-Nachweis verstärkt wurde.



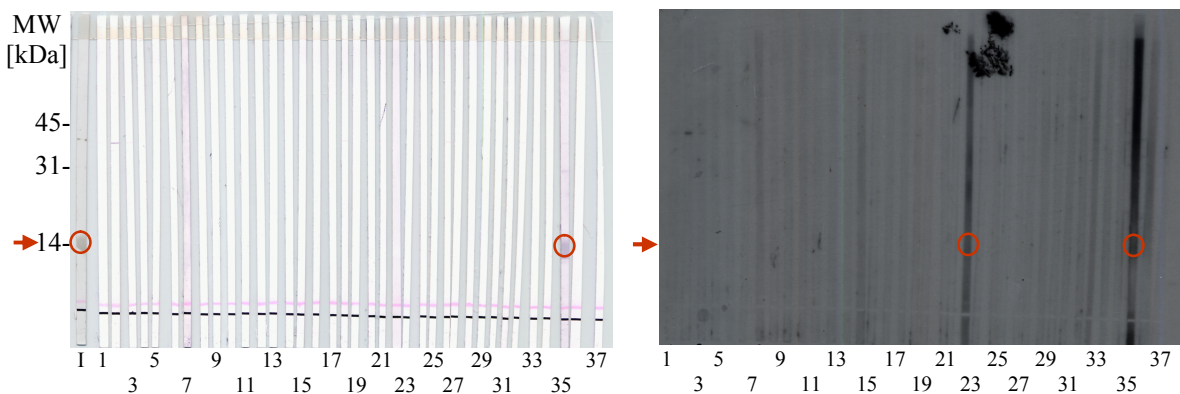
**Abbildung 27: Untersuchung der IgE-Reaktivität von natürlichem Oleosin.**

(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, 20 µg/cm Oleosin, NC-Membran)

links: Immunoblot-Nachweis, rechts: Chemilumineszenz-Nachweis

Spur I: India Ink-Färbung, Spur 1-31: Patientenseren K1-K31, Spur 32: Kaninchen anti-Oleosin (MAP) Antikörper, Spur 33: Negativkontrolle anti-Human Antikörper, Spur 34: Negativkontrolle anti-Kaninchen Antikörper.

In den Nachweisen mit dem rOleosin konnten schwache IgE-Reaktivitäten nur im Chemilumineszenz-Versuch mit dem Patientenserum 22 nachgewiesen werden (Abbildung 28). Das Kaninchenserum reagierte hier im Vergleich zum natürlichen Oleosin deutlich schwächer.



**Abbildung 28: Untersuchung der IgE-Reaktivität von rekombinantem Oleosin.**

(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, 10 µg/cm Oleosin, NC-Membran)

links: Immunoblot-Nachweis, rechts: Chemilumineszenz-Nachweis

Spur I: India Ink-Färbung, Spur 1-34: Patientenseren K1-K34, Spur 35: Kaninchen anti-Oleosin (MAP) Antikörper, Spur 36: Negativkontrolle anti-Human Antikörper, Spur 37: Negativkontrolle anti-Kaninchen Antikörper.

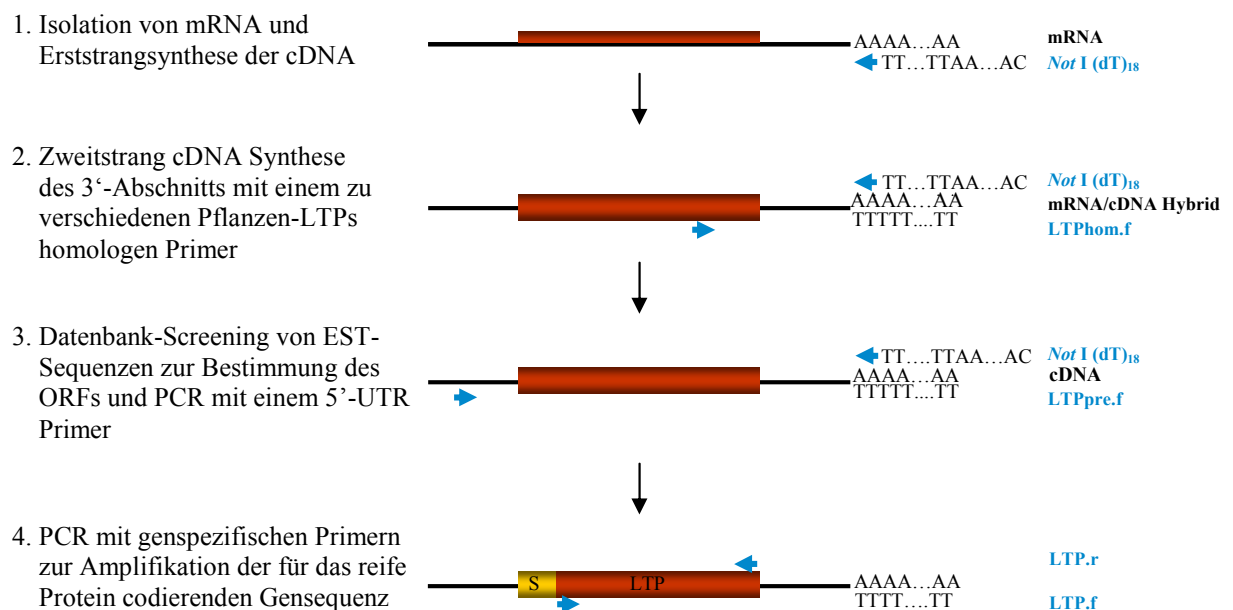
Die IgE-Reaktivität von Oleosin konnte im Immunoblot nachgewiesen werden. Lediglich das Patientenserum 22 reagierte übereinstimmend mit dem rekombinanten und dem natürlichen Protein im Chemilumineszenz-Versuch. Die niedrige Prävalenz lässt im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Zuordnung des Oleosins zu der Gruppe der Allergene zu.

### 3.3 LTP

Das ubiquitäre Lipidtransferprotein (LTP) konnte bereits als Panallergen in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen werden. Erste Hinweise deuten das Vorkommen von LTP in der Erdnuss an. Daher sollte zunächst das Erdnuss-LTP auf DNA-Ebene identifiziert und kloniert werden. Die IgE-Reaktivität sollte sowohl am rekombinanten als auch am natürlichen Protein ermittelt werden.

#### 3.3.1 Klonierung der LTP-Gensequenz

Durch Anwendung und Kombination verschiedener molekularbiologischer Methoden sollte die cDNA-Sequenz des LTPs der Erdnuss ermittelt werden. Abbildung 29 gibt eine schematische Übersicht über die verschiedenen Schritte, die zur Identifikation der Gensequenz führten und im Folgenden näher erläutert werden.



**Abbildung 29: Schematische Darstellung der Strategie zur Ermittlung der vollständigen LTP-Gensequenz der Erdnuss.**

1. Herstellung des ersten Stranges der cDNA durch reverse Transkription mit dem *Not I* (dT)<sub>18</sub>-Primer.
2. PCR zur Teilsynthese des Zweitstranges mittels *Not I* (dT)<sub>18</sub>-Primer und des LTP<sub>hom.f</sub>-Primers, der auf der Basis bekannter LTPs synthetisiert wurde. Dies ermöglichte die Identifizierung des 3'-Bereiches.
3. Durch Datenbank-Screening konnten homologe EST-Sequenzen gefunden werden, von denen ausgehend ein 5'-UTR-Primer erstellt wurde.
4. Zur Klonierung wurden Primer entworfen, die durch interne Schnittstellen eine Klonierung in den ORF eines Expressionsvektors erlauben.

Zur Klonierung der LTP-Gensequenz wurde zunächst Gesamt-RNA aus der Erdnuss isoliert und die mRNA mit Hilfe des *Not I* (dT)<sub>18</sub>-Primers in cDNA umgeschrieben. Da die LTP-Gensequenz der Erdnuss nicht bekannt war, wurden zur Primerkonstruktion zunächst die LTP-Sequenzen anderer Pflanzen verglichen, um homologe Bereiche zu identifizieren. Für das Alignment wurden auf Gensequenzen bekannter LTP-Allergene aus der Kirsche, dem Pfirsich, der Erdbeere und der Haselnuss zurückgegriffen. Zudem wurde die Sequenz der Erbse hinzugezogen, die wie die Erdnuss zu den Leguminosen zählt, bei der jedoch das LTP nicht als Allergen nachgewiesen ist. Vor allem im 3'-Ende war eine hohe Sequenzhomologie vorhanden (Abbildung 30).

```

Kirsche (AF221501)   ATG--GCTTGCTCTGCAATGACTAAGCTTGCCTTTG-GTGGTGGCCCTTGTGCATGGTTGTG
Pfirsich (AF221501) ATG--GCTTGCTCTGCAATGACTAAGCTTGCCTTTG-GTGGTGGCCCTTGTGCATGGTTGTG
Linse (AY793556)   ATGAAGTTAGCA-TGTG-----TTGTTTTG-GTG-----ATGTGTATGATAGTT
Erdbeere (DQ066732) ATG--GCC---TCTGCAGTGTGAAGCTTGCCTTTG-GTTGCTCTCATTTGCATTTGTGGTA
Haselnuss (AF329829) ATG--GGT----AGCCTT----AAG-TTGGTATGCGCGGTCCTCTTGTGCATGATGGT
*** *          *          *** * * * *          * * * * *

Kirsche (AF221501)   AGCGTGCCCATTTGCTCAA---GCCCTAACATGTGGCCAAGTGTCCAGCAACCTTGCACCA
Pfirsich (AF221501) AGCGTGCCCATTTGCTCAA---GCCCTAACATGTGGCCAAGTGTCCAGCAACCTTGCACCA
Linse (AY793556)   ---GCGCCTATGGCAGAAGGTGCAATCTCCTGTGGAGCTGTAACCTGGTGACCTTAGTCCA
Erdbeere (DQ066732) GCCGTCCCCGTGCGCCAAGCCGCCATCACTTGGCGCAAGTGACCACAACGTGGCACC
Haselnuss (AF329829) GCCGCACCCGTTGCCCGGCGCTCCCTGCATGCCACAGATAAAAGGCAACCTCACGCCA
* ** * **          * * * **          *          ** * **

Kirsche (AF221501)   TGCATAGCCTACGTGAGAGGCGGTGGAGCTGTGCCTCCAGC---TTGCTGCAACGGCATT
Pfirsich (AF221501) TGCATAGCCTACGTGAGAGGCGGTGGAGCTGTGCCTCCAGC---TTGCTGCAACGGCATT
Linse (AY793556)   TGCCTTACGTATCTTACAGGTGGT---CCTGGTCCCTTACCACAATGCTGTGGAGGAGTG
Erdbeere (DQ066732) TGCTTCAACTACGTCAAGAGTGGTGGCGCTGTCCCTGCCGC---TTGCTGCAAGGAGTT
Haselnuss (AF329829) TCGCTGCTCTACCTGAAGAACGGCGGCTTCTTCCCTCCCTC---TTGCTGCAAGGCGT
*** *   * * * *   **          *   * * * *   *   * * * *

Kirsche (AF221501)   AGGAACATCAACAACCTG-----GCAAAGACCACCGCTGACCGCCAGACCGCTTGCAACT
Pfirsich (AF221501) AGGAACATCAACAACCTG-----GCAAAGACCACCGCTGACCGCCAGACCGCTTGCAACT
Linse (AY793556)   AAGAA-----GCTTCTTGCTGCCCAACACACCGCCTGATCGTCAGGCTGCGTGTAACT
Erdbeere (DQ066732) AGCAACCTCAACAGCATG-----GCCAAGACCACCGCTGACCGCCAGCAAACCTTGCAATT
Haselnuss (AF329829) AGGGCTGTAACGACGCC-----TCCAGGACCACGTCCGACCGCCAGTCCGCTTGCAACT
*          * *          * *   * * * * *   * * * * *

Kirsche (AF221501)   GCCTGAAA-CAGCTTTCGCCAGCG---TCCCGGAGTCAATGCTAACAAATGCCGCAGCG
Pfirsich (AF221501) GCCTGAAA-CAGCTTTCGCCAGCG---TCCCGGAGTCAATGCTAACAAATGCCGCAGCG
Linse (AY793556)   GCATGAAATCAG----CAGCCAGTTCTATTACTAAATGAATACTAACAAATGCTGTGCT
Erdbeere (DQ066732) GCCTGAAGAG---TGCAGCTGGAAGCATCAAGGGACTTAACGCTAACCTCGCAGCCGGT
Haselnuss (AF329829) GCTTGAAAGA----TACAGCCAAAGGCATCGCTGGCTCAACCCTAATCTTGTGCTGGC
** * * * *          * *          *          * * * * *

Primer LTPhom.f          CATTCCTTACAAGATCAGCACCTC
Kirsche (AF221501)   CTTCCCGGCAAGTGTGGAGTTAAATGTTTCCTTACAAGATCAGCCCCTCCACCAACTGCGCC
Pfirsich (AF221501) CTTCCCGGCAAGTGTGGAGTTAAATGTTTCCTTACAAGATCAGCCCCTCCACCAACTGCGCC
Linse (AY793556)   CTCCCTGGCAAATGTGGTGTCAACATTTCCTTACAAGATCAGTACCTCCACCAACTGTAAT
Erdbeere (DQ066732) CTTCCCGGCAAGTGTGGTGTCAACCGTTCCCTTACAAGATCAGCACCTCCACCAACTGCAAC
Haselnuss (AF329829) CTCCCGGCAAGTGTGGTGTCAACATTTCCTTACAAGATCAGCCCCTCCACCAACTGCAAC
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Kirsche (AF221501)   ACCGTGAAGTGA
Pfirsich (AF221501) ACCGTGAAGTGA
Linse (AY793556)   ACAGTTAAGTAA
Erdbeere (DQ066732) AATGTGAAATGA
Haselnuss (AF329829) AACGTGAAGTGA
* * * * *

```

**Abbildung 30: Alignment von LTP-Gensequenzen verschiedener Pflanzen.**

Markiert ist der Bereich, der im Sequenzvergleich die größte Übereinstimmung zwischen den LTPs aufweist und der zum Entwurf des Primers LTPhom.f diente.

\*: homologe Basenpaare in allen Sequenzen.

Diese homologe Region diente als Grundlage für den Entwurf eines Vorwärts-Primers (LTP<sub>hom.f</sub>). Dabei wurden bei ungleichen Basenpaaren die Sequenzen ausgewählt, die einen höheren Verwandtschaftsgrad zur Erdnuss aufwiesen (Basenpaar 1, 2, 7 und 20). Mit dem LTP<sub>hom.f</sub>-Primer und dem zur cDNA-Synthese verwendeten *Not* I (dT)<sub>18</sub>-Primer gelang es, eine LTP-ähnliche Teilsequenz aus der Erdnuss zu amplifizieren und neu zu sequenzieren. Aufbauend auf die Ergebnisse konnte ein spezifischer Rückwärts-Primer (LTP.r) zur Amplifikation der Volllänge sequenz synthetisiert werden, der am 3'-Ende der LTP-Sequenz lokalisiert ist.

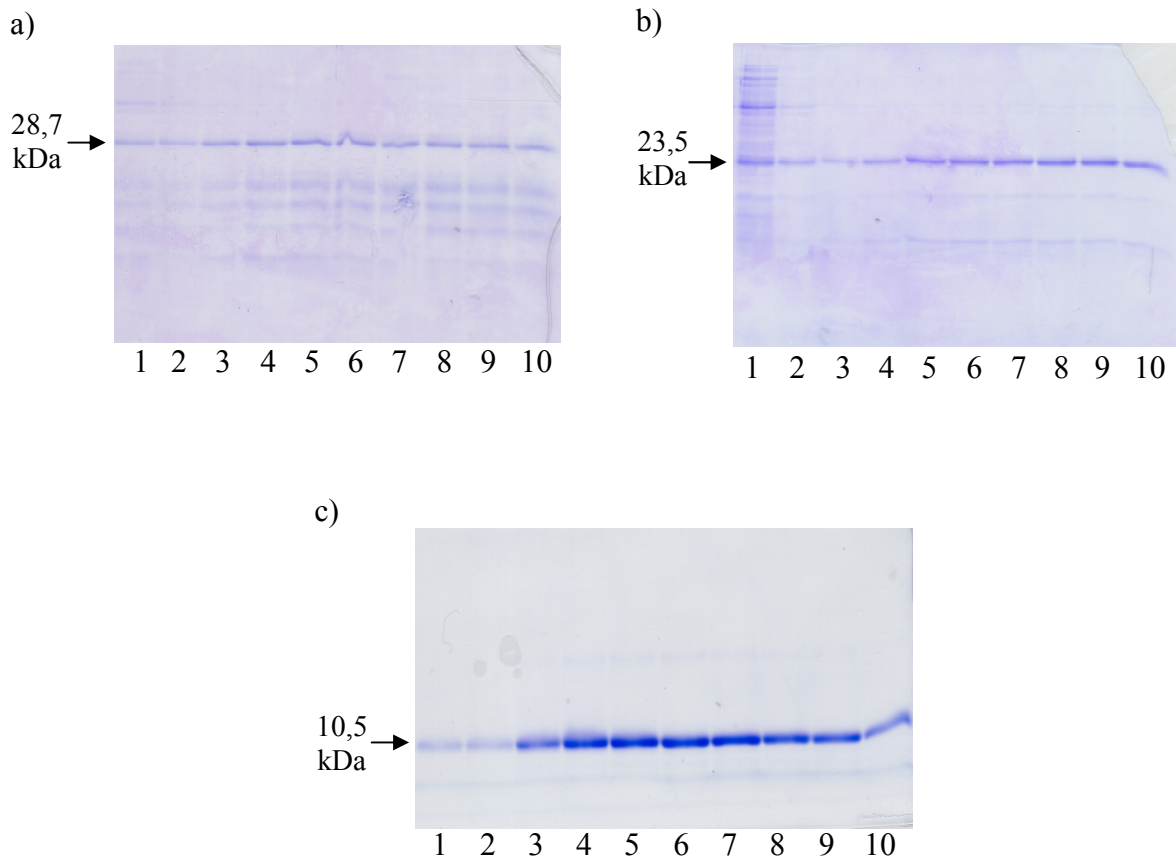
Da das 5'-Ende weiterhin unbekannt war, sollte für dessen Bestimmung eine 5'RACE unter Verwendung des LTP.r-Primers durchgeführt werden. Diese war jedoch nicht erfolgreich. Die Gendatenbank wurde daher erneut analysiert und mit der bereits erhaltenen Teilsequenz abgeglichen. Die Sequenzen, die zu 100 % mit der Teilsequenz übereinstimmten und zudem einem Volllänge-LTP entsprachen, wurden genutzt, um einen Primer zu entwerfen, der vor dem Startsignal in der 5'-UTR ("untranslated region") Region des LTP binden sollte (LTP<sub>pre.f</sub>). Eine PCR mit den Primern LTP<sub>pre.f</sub> und LTP.rev lieferte Produkte von ca. 434 bp. Nach Ligation dieser PCR-Fragmente in den pGEM-T Vektor und Sequenzierung konnten durch *in silico* Translation der verschiedenen ORFs zwei Erdnuss-LTP Isoformen (LTP-1 und LTP-2) identifiziert werden.

Die abgeleiteten Proteinsequenzen der beiden LTP Isoformen besitzen eine Länge von 92 AS. Eine Analyse der Primärsequenz zeigte die Existenz eines 24 AS langen Signalpeptids und dessen voraussichtliche Spaltungsposition. Um das reife Protein zu erhalten, wurde für die rekombinante Darstellung des LTPs ein Oligonukleotid für den entsprechenden 5'-Bereich entworfen.

### 3.3.2 Expression und Reinigung von LTP

Zur Expression der LTP-1 Gensequenz wurde diese an den Primer-internen Schnittstellen *EcoRI* und *EcoRV* aus dem pCR2.1TOPO-Vektor herausgeschnitten und in den gleichermaßen vorbereiteten Expressionsvektor pET32b kloniert. Dieser wurde gewählt, da das LTP vier Cysteine aufweist und durch den Thioredoxin-Tag die Bildung von Disulfidbrücken und damit die Löslichkeit des Proteins erhöht werden soll. Nach Überprüfung durch Sequenzierung wurde das Konstrukt in BL21(DE3)-Zellen mittels Hitzeschock transformiert. Die LTP-2 Sequenz wurde durch das Paul-Ehrlich-Institut (Langen) an die Firma Genentec übermittlelt, die die Codons für die Expression in *E. coli* Codon optimieren. Von dieser Sequenz wurden zwei Expressionskonstrukte hergestellt. Die Gensequenz für das erste Konstrukt wurde über die *MscI* und *XhoI* Schnittstellen in den Expressionsvektor pET32b kloniert. Für das zweite Konstrukt wurde die Sequenz über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pET23b ligiert. Beide Konstrukte exprimierten ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen His-Tag. Nach der Synthese wurden die Konstrukte zur Verfügung gestellt und ebenfalls in BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Bakterienzellen wurden nach der Expression im großen Maßstab unter denaturierenden Bedingungen lysiert und die LTP-Isoformen über Talon-Säulen gereinigt (Abbildung 31). Unter den Bedingungen der nativen Lysatherstellung war keins der rekombinanten LTP-Proteine löslich.

Wie in Abbildung 31 a und b zu sehen ist, war es nicht möglich, die Proteine aus dem pET32b-LTP-1 und pET32b-LTP-2 zu reinigen. Die Ausbeuten lagen nach der Reinigung und der anschließenden Dialyse nur bei 0,6 mg/l Expressionskultur. Das exprimierte Protein des pET23b-LTP-2 Konstrukts konnte dagegen erfolgreich in hohen Ausbeuten gereinigt werden (Abbildung 31 c). Allerdings fiel während des darauffolgenden Dialysevorganges ein Teil des Proteins aus, so dass nur eine endgültige Ausbeute von 1,5 mg/l Expressionskultur erreicht werden konnte.



**Abbildung 31: Untersuchung zur Reinigung der LTP-Isoformen exprimiert aus pET32b-LTP-1 pET32b-LTP-2 und pET23b-LTP-2.**

Bild a) pET32b-LTP-1 (SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

Spur 1-10: Elutionsfraktionen 1-10

Bild b) pET32a-LTP-2 (SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

Spur 1-10: Elutionsfraktionen 1-10

Bild c) pET23b-LTP-2 (SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

Spur 1-10: Elutionsfraktionen 1-10

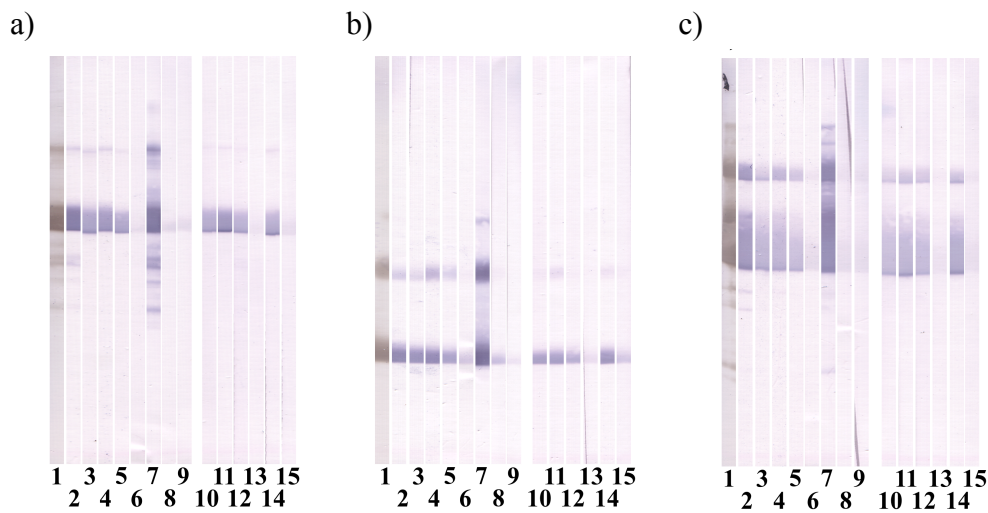
Die gereinigten LTP-Isoformen wurden auf ihre Reaktivität mit ausgewählten Patientenseren getestet (Abbildung 32). Dabei handelte es sich um Seren, die in drei Reaktionsgruppen eingeteilt wurden:

Gruppe 1 (n=25): Erdnuss- und Pfirsichallergiker (Pru p 3 + / Erdnuss +)

Gruppe 2 (n=17): Erdnussallergiker (Pru p 3 - / Erdnuss +)

Gruppe 3 (n=24): Pfirsichallergiker (Pru p 3 + / Erdnuss -)

Für erste Untersuchungen wurden 7 Seren aus Gruppe 1 und 3 Seren aus der Gruppe 3 verwendet. IgE-Reaktivität konnte bei 100 % der Gruppe 1 (Pru p 3 + / Erdnuss +) und bei 33 % der Gruppe 3 (Pru p 3 - / Erdnuss +) nachgewiesen werden.



**Abbildung 32: Immunoblots der exprimierten Proteine von den LTP-1 und LTP-2-Konstrukten.**

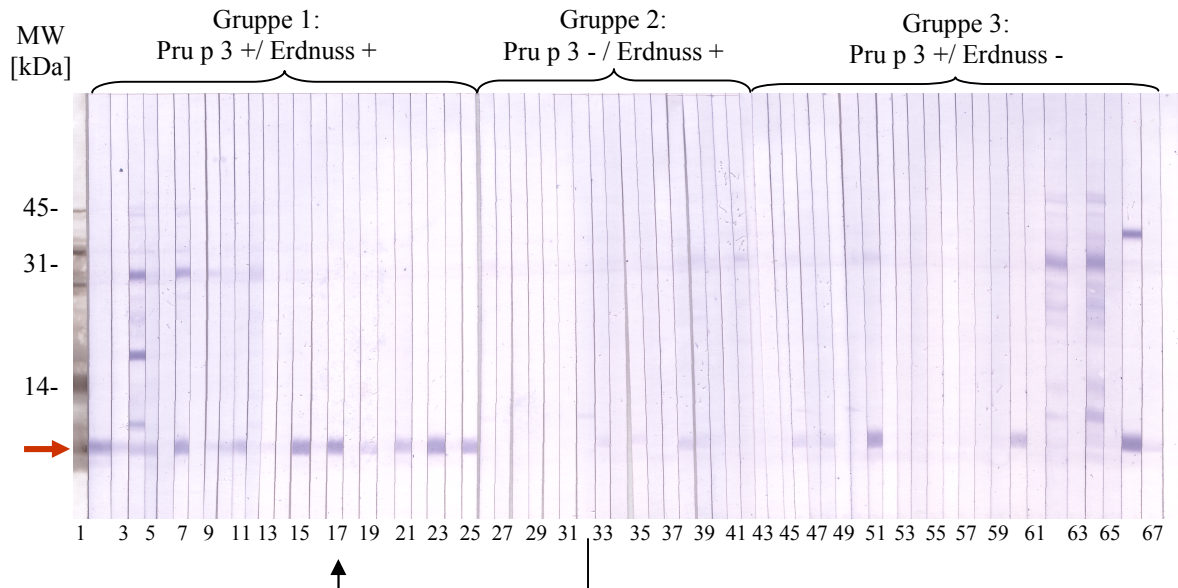
**a) pET32b-LTP-1, b) pET23b-LTP-2, c) pET32b-LTP-2**

Spur 1-5 und 10-12: Patientenserum Pru p 3 + / Erdnuss +, Spur 6 und 13-14: Patientenserum Pru p 3 + / Erdnuss -, Spur 7: anti-His Ak, Spur 8 und 15: Negativkontrolle anti-Human IgE, Spur 9: Negativkontrolle anti-Maus IgG+IgM

Die beiden LTP-Isoformen LTP-1 und LTP-2 wurden in der GenBank-Datenbank aufgenommen und als EU159429 bzw. EU161278 bezeichnet. Aufgrund der Reaktivität mit Patientenserum wurde das Erdnuss-LTP als neues Erdnussallergen Ara h 9 klassifiziert. Ara h 9.0101 entspricht dabei der Isoform LTP-1 und Ara h 9.0201 der Isoform LTP-2.

### 3.3.3 Nachweis des natürlichen LTPs

Nachdem das neue Erdnussallergen Ara h 9 auf DNA-Ebene identifiziert werden konnte, sollte seine Existenz als natürliches Protein nachgewiesen werden. Für diesen Nachweis wurde der standardmäßig eingesetzte basische Erdnussextrakt hergestellt. Mit diesem Extrakt wurde ein Immunoblot mit den kompletten der bereits unter 3.3.2 erwähnten Seren durchgeführt. Jedoch detektierte keines der Seren eine dem LTP entsprechende Bande bei 9 kDa. Da die LTPs einen basischen pI besitzen, wurde auf die saure Extraktionsmethode der Erdnuss zurückgegriffen und der Immunoblot mit den Seren wiederholt. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, konnte in diesem Extrakt eine Bande bei 9 kDa (roter Pfeil) von mehreren Patienten detektiert werden.



**Abbildung 33: Immunoblot zur Identifizierung von Ara h 9. Der Erdnussextrakt wurde unter sauren Bedingungen hergestellt und mit verschiedenen Patientenseren getestet.**

Spur 1: India Ink, Spur 2-25 und 32 Patientenseren Pru p 3 + / Erdnuss +, Spur 26-31 und 33-43:

Patientenseren Pru p 3 - / Erdnuss +, Spur 44-67: Patientenseren Pru p 3 + / Erdnuss -, Spur 68:

Negativkontrolle anti-Human IgE.

Der rote Pfeil kennzeichnet die Position des Erdnuss-LTPs. Der schwarze Pfeil ordnet den Streifen 32 in die Gruppe 1 ein.

Insgesamt zeigten 68 % der Erdnuss- und Pfirsichallergiker IgE-Reaktivität mit diesem Protein und 24 % der Pfirsichallergiker. Bei 29 % der Erdnussallergiker konnte nur eine sehr schwache Reaktivität detektiert werden.

Das IgE-reaktive Protein mit einem Molekulargewicht von 9 kDa wurde durch N-terminale Sequenzierung untersucht und konnte als Ara h 9 eindeutig identifiziert werden (Abbildung 34). Zudem bestätigten die Sequenzierungsergebnisse das Vorhandensein des in Kapitel 3.3.1 vorhergesagten Signalpeptids und dessen Spaltungsposition.

<i>N-Seq. 1</i>		L	S	A	P	Y	V	N	S	A	L	A	P																																						
<i>N-Seq. 2</i>		K	S	A	G	Q	V	N	D	A	L	A	P																																						
Ara h 9.0101	1-	I	S	C	G	Q	V	N	S	A	L	A	P	C	I	P	F	L	T	K	G	G	A	P	P	A	C	C	S	G	V	R	G	L	L	G	A	L	R	T	T	A	D	R	Q	A	A	C	N	C	
Ara h 9.0201	1-	L	S	C	G	Q	V	N	S	A	L	A	P	C	I	T	F	L	T	K	G	G	V	P	S	G	P	C	C	S	G	V	R	G	L	L	G	A	A	K	T	T	A	D	R	Q	A	A	C	N	C
Ara h 9.0101	51-	L	K	A	A	A	G	S	L	R	G	L	N	Q	G	N	A	A	A	L	P	G	R	C	G	V	S	I	P	Y	K	I	S	T	S	T	N	C	A	T	I	K	F								
Ara h 9.0201	51-	L	K	A	A	A	G	S	L	H	G	L	N	Q	G	N	A	A	A	L	P	G	R	C	G	V	S	I	P	Y	K	I	S	T	S	T	N	C	A	T	I	K	F								

**Abbildung 34: Alignment der reifen LTP-Proteinsequenzen Ara h 9.0101 und Ara h 9.0201 und Vergleich zu den N-terminalen Sequenzen des nLTPs.**

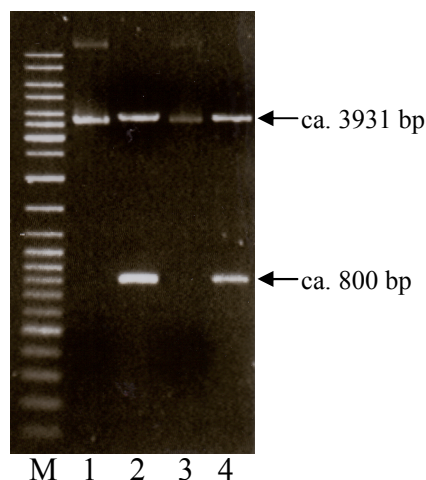
Die Identität der beiden Ara h 9 Sequenzen beträgt 90 %, die identischen Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Mithilfe der N-terminalen Sequenzierungen konnten jeweils 9 der 12 Aminosäuren bestätigt werden.

### 3.4 Ara h 7

Das Erdnussallergen Ara h 7 war über eine cDNA Phagen-Display-Bibliothek identifiziert und die IgE-Reaktivität am rekombinanten Protein nachgewiesen worden (Kleber-Janke *et al.* 1999). Im Gesamtextrakt konnte das natürliche Allergen nicht identifiziert werden. Das Ziel in dieser Arbeit war es, die Gensequenz aus der cDNA mit Ara h 7-spezifischen Primern zu amplifizieren und zu analysieren. Die Identifikation neuer Isoformen sollte zum Nachweis des natürlichen Proteins führen.

#### 3.4.1 Klonierung der Ara h 7 Gensequenz

Zur Klonierung wurde RNA aus der Erdnuss isoliert und mithilfe des *Not I* d(T)<sub>18</sub>-Primers in den ersten Strang der cDNA umgeschrieben. Für einen ersten Überblick wurde die cDNA mit einem Primer (7.f) amplifiziert, der nach der veröffentlichten Sequenz (GenBank Acc No. AF091737) entworfen wurde und in der Startregion des Ara h 7 bindet. Um wenige Basenpaare durch Einfluss der Primer zu verfälschen, wurde auf den *Not I* d(T)<sub>18</sub>-Primer als Rückwärtsprimer zurückgegriffen. Da die veröffentlichte Ara h 7 Gensequenz eine Länge von 483 bp besitzt und die Sequenz vom Start-Codon bis zum Poly(A)-Schwanz 712 bp lang ist, wurde eine ähnliche Größe des Amplifikates erwartet. Nach Klonierung des ca. 800 bp großen Amplifikates in pCR2.1-TOPO (3931 bp) wurden die ligierten Konstrukte in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Zur Überprüfung der Insertgröße wurden die Plasmide isoliert und mit *EcoR I* verdaut (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Minipräparation und Restriktionsanalyse des pCR2.1-Vektors (3931 bp) mit dem Ara h 7-Amplifikat (Primer: 7.f/*Not I* d(T)<sub>18</sub>).**

M: Marker, Spur 1: Minipräparation Klon 1, Spur 2: Klon 1 nach Restriktion, Spur 3: Minipräparation Klon 2, Spur 2: Klon 2 nach Restriktion.

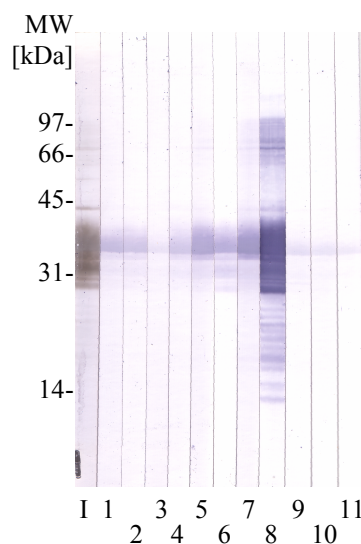
Durch ein Alignment der publizierten Ara h 7 Gensequenz (AF091737) mit der cDNA-Sequenz konnten 16 Substitutionen sowie eine Deletion eines Guanins am Basenpaar 383 bestimmt werden. Letzteres hat eine Verschiebung des Leserasters zur Folge, so dass sich die abgeleitete Primärsequenz im C-terminalen Ende unterscheidet (Abbildung 36). Durch Analyse der Proteinsequenzen konnte zunächst ein Signalpeptid vorhergesagt werden, dessen Spaltungsstelle zwischen AS 21 und 22 liegt. Die weiteren Untersuchungen beschränkten sich deshalb auf die reifen Proteine. Die Verschiebung des Leserasters wirkt sich auf die Größe und den isoelektrischen Punkt des Proteins aus. Während AF091737 eine Länge 139 AS, ein errechnetes Molekulargewicht von 16,4 kDa und einen pI von 5,57 ausweist, ist das neu gefundene Ara h 7 142 AS lang, hat ein Molekulargewicht von 17,1 kDa und einen deutlich höheren pI von 7,7. Eine Suche in der GenBank Datenbank wies außerdem eine weitere Ara h 7 Isoform (AY722691) von 138 AS auf. Dieses Protein hat eine Größe von 16,5 kDa und einen pI von 6,2. Diese Isoform wurde in der Datenbank lediglich als 2S Protein bezeichnet. Ein Vergleich der drei Isoformen mit dem für die Prolamin-Superfamilie typischen Cysteinmuster zeigt, dass nur die in dieser Arbeit gefundene Isoform dieses Muster erfüllt. Die Gensequenz dieser Isoform wurde in die GenBank unter der Acc No. EU046325 aufgenommen.

	1		Xn	-	C	-	Xn	-	C		-	50
AF091737	TRWDPDRGSR		GSRWDAPSRG		DDQCQRQLQR		ANLRPCEEHM		RRRVEQEQQEQ			
EU046325	TRWDPDRGSR		GSRWDAPSRG		DDQCQRQLQR		ANLRPCEEHI		RORVEKEQQEQ			
AY722691	TRWDPDRGSR		GLRWDAPSRG		DDQCQRQLQR		ANLRPCEEHI		RORVEQEQQEQ			
	51		Xn	-	CC	-	Xn	-	CXC		-	100
AF091737	EQDEYPYSRR		GSRGRQPGES		DENQEQRCCN		ELNRFQNNQR		CMCQALQQIL			
EU046325	EQDEYPYIQR		GSRGRQPGES		DEDQEQRCCN		ELNRFQNNQR		CMCQALQQIL			
AY722691	EQDEYPYSQR		GSRGRRPGES		DEDQEQRCCN		ELNRFQNNQR		CMCQALQQIL			
	101		Xn	-	C	-	Xn	-	C			142
AF091737	QNQSFVWPAG		QEPVADGEG		AQELAPELRV		QVTKPLRPL		..			
EU046325	QNQSFVRFQD		RSQLHQMERE		LRNLPQNCGF		RSPSRCDLSS		RT			
AY722691	QNQSFVRFQD		RSQLHQNGEG		AQELAPELRV		QVTKPLRP		..			

**Abbildung 36: Alignment der abgeleiteten Proteinsequenzen des publizierten Ara h 7 (AF091737) mit neu gefundenen Ara h 7 (EU046325) und dem 2S Protein AY722691.**

Grau unterlegt sind die Aminosäuren, die mindestens in zwei Sequenzen identisch sind; schwarz unterlegt sind die Aminosäuren, die in allen drei Sequenzen gleich sind. Über der Sequenz ist das für 2S Albumine typische Cysteinmuster angegeben, das mit der Sequenz EU046325 übereinstimmt. Die Bezeichnung Xn steht dabei für beliebige lange Sequenzabschnitte zwischen den Cysteinresten.

Um zu überprüfen, ob die ermittelte Isoform EU046325 IgE-reaktiv ist, wurde die Gensequenz, die das reife Protein kodiert, von der Firma Genesart auf die Expression in *E. coli* optimiert. Aufgrund der vorhandenen Cysteine wurde die Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *EcoR* I und *EcoR* V in den Expressionsvektor pET32b kloniert. Durch den vektoreigenen Thioredoxin-Tag sollte die Löslichkeit des Ara h 7 gesteigert werden. Zur Reinigung über Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde ein N- und C-terminaler His-Tag angefügt. Die Expression in BL21(DE3) Zellen und die Herstellung des Lysates erfolgte unter nativen Standardbedingungen. Die Reinigung sowohl über Ni<sup>2+</sup>-, als auch Co<sup>2+</sup>-Säulen führte zu einem vorgereinigten, aber nicht sauberen Produkt. Die IgE-Reaktivität des exprimierten Proteins wurde mit Seren von Erdnussallergikern im Immunoblot überprüft (Abbildung 37). Es konnte gezeigt werden, dass auch diese Isoform, wie die bereits veröffentlichte (AF091737) IgE-Reaktivität aufweist. Sie wurde als Ara h 7.0201 in die Allergendatenbank aufgenommen.



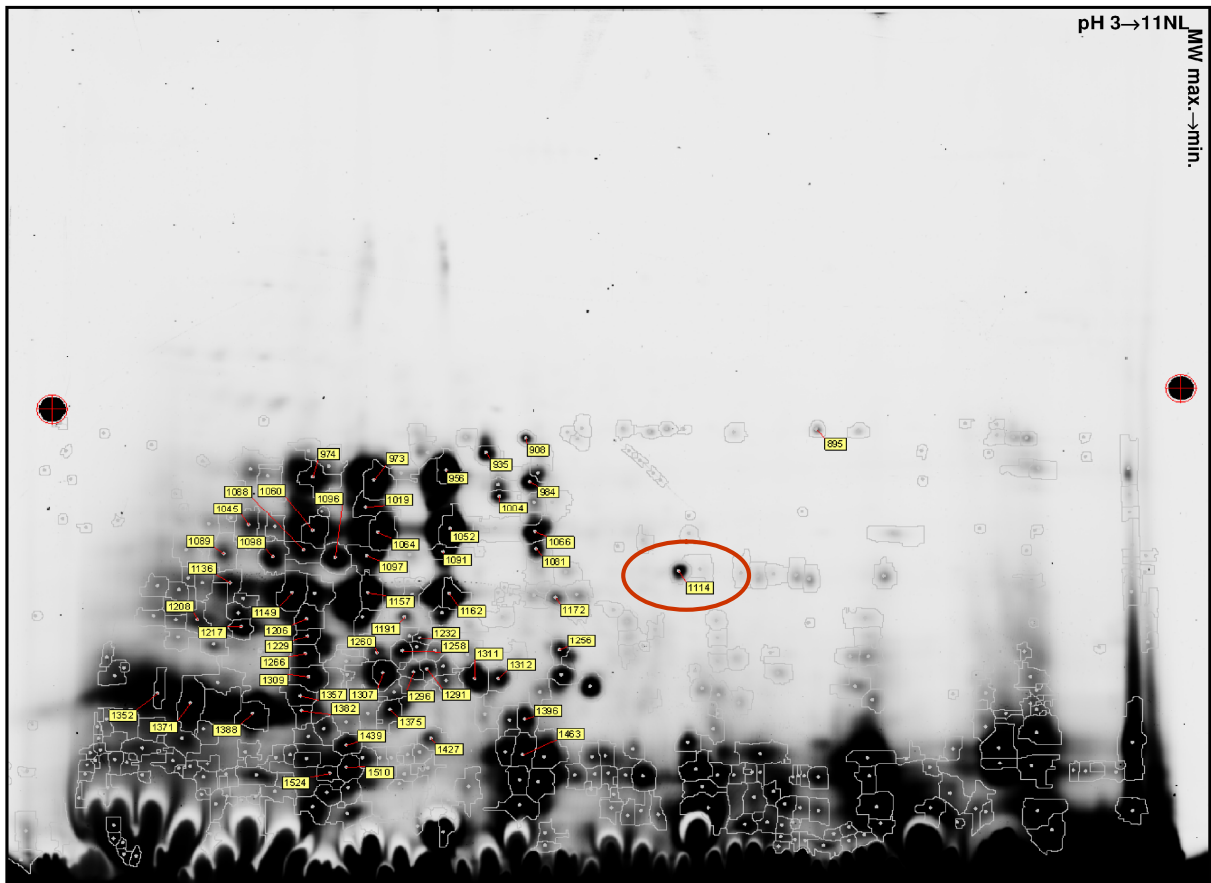
**Abbildung 37: Immunoblot des exprimierten Ara h 7 aus dem Konstrukt pET32b-Ara h 7 zum Nachweis der IgE-Reaktivität.**

I: India Ink, Spur 1-5: Patientenserum 1-6, Spur 6: Kaninchen anti-Ara h 7 pAk, Spur 7: Patientenserum JG3, Spur 8: anti-His Antikörper, Spur 9: Negativkontrolle anti-Human Antikörper, Spur 10: Negativkontrolle anti-Kaninchen Antikörper, Spur 11: Negativkontrolle anti-Maus Antikörper.

### 3.4.2 Identifizierung des natürlichen Ara h 7

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie der Universität Kiel wurden verschiedene Erdnussextrakte mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) analysiert. Dabei wurden Erdnussextrakte mit einem fluoreszierenden Farbstoff

(Cy5) markiert und in einem zweidimensionalen Gel aufgetrennt. Eine große Anzahl von Spots wurde anschließend mittels Trypsin-Fingerprinting untersucht und durch Analysen mit dem Programm Mascot bekannten Proteinen zugeordnet (Latendorf 2007). Abbildung 38 zeigt das Ergebnis der 2D-DIGE von basisch extrahiertem Erdnussextrakt mit einem Molekulargewicht kleiner als 25 kDa (Fraktion 3 aus Abbildung 5).



**Abbildung 38: 2D-DIGE von einer Fraktion des Standard-Erdnussextrakts < 25 kDa (Abbildung von Thies Latendorf, Universität Kiel, zur Verfügung gestellt).**

Aufgetragen wurden 150 µg Gesamtprotein, von denen 50 µg Cy5 markiert waren (1. Dimension: IPG 3-11 NL (non-linear) 24 cm, 2. Dimension: 15 % Gel). Schwarz-Weiss-Darstellung des Cy5-Kanals.

Aufgrund der neu gewonnenen molekularbiologischen Kenntnisse über das Ara h 7 wurden die Ergebnisse vom Trypsin Fingerprinting des basischen Erdnussextraktes mit Komponenten unter 25 kDa gezielt auf Ara h 7 gescreent. Der in Abbildung 38 markierte Spot (Nr. 1114) wurde hierbei ursprünglich einem 2S Albumin zugeordnet, das zu dem abgeleiteten Protein der Gensequenz AY722691 (Abbildung 36) identisch ist. Da die Sequenz von Ara h 7.0201 nicht in den Datenbanken vorhanden war, wurden die Fragmente des Trypsin-Fingerprintings mit dieser Sequenz nachträglich verglichen. Dabei konnten vier Fragmente dem Ara h 7.0201

zugeordnet werden und ein weiteres, das jedoch eine Abweichung von zwei Aminosäuren zeigt. Mit diesen fünf Fragmenten wurden 54 % des Ara h 7.0201 abgedeckt (Abbildung 39) und somit erstmalig als natürliches Protein im Erdnussextrakt nachgewiesen. Zudem wurde das C-terminale Ende von Ara h 7.0201 bestätigt, das sich durch die Deletion eines Nukleotids von Ara h 7.0101 und dem 2S Protein 2 unterscheidet.

```

                                ANLRPCEEHIR  VEQEQQEQ
                                1                                50
Ara h 7.0101 TRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHMRRRVEQEQQEQ
Ara h 7.0201 TRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHMRORVEKEQQEQ
2S Protein 2 TRWDPDRGSRGLRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHMRORVEQEQQEQ

EQDEYPYSQR  QRPGESDEDQEQR                                CMCQALQQIL
51                                100
Ara h 7.0101 EQDEYPYSRGRGSRGRQRPGESDENQEQRCCNELNRFQNNQRCMCQALQQIL
Ara h 7.0201 EQDEYPYIQRGSRGQRPGESDEDQEQRCCNELNRFQNNQRCMCQALQQIL
2S Protein 2 EQDEYPYSQRGSRGRRRPGESDEDQEQRCCNELNRFQNNQRCMCQALQQIL

QNQSFR  SQLHQMERELRNLPQNCGFR
101                                142
Ara h 7.0101 QNQSFWVPAGQEPVSDGEGAQELAPELRVQVTKPLRPL. . .
Ara h 7.0201 QNQSFRFQQDRSQLHQMERELRNLPQNCGFRSPSRCDLSSRT
2S Protein 2 QNQSFRFQQDRSQLHQNGEGAQELAPELRVQVTKPLRP. . .

```

**Abbildung 39: Alignment der Ara h 7 Isoformen Ara h 7.0101 und Ara h 7.0201 und des 2S Proteins (AY722691).**

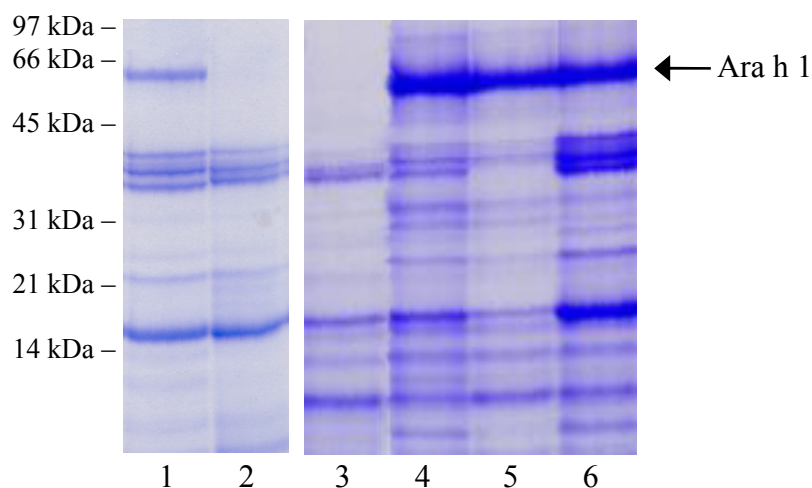
Schwarz markiert sind die Aminosäuren, die in allen Sequenzen identisch sind, grau diejenigen, die nur in zwei Sequenzen identisch sind. Die aus dem Trypsin Fingerprinting erhaltenen Fragmente sind über den Sequenzen angegeben.

### 3.5 Erdnussvarietäten aus Südostasien

Weltweit wird derzeit versucht hypoallergene Nahrungsmittel, einschließlich der Erdnuss, herzustellen, indem die Majorallergene gentechnisch ausgeschaltet oder vermindert werden. Unter diesem Aspekt sollten Erdnüsse analysiert werden, die von Natur aus in ihrer Allergenzusammensetzung von der Standard-Erdnuss abweichen.

#### 3.5.1 Untersuchung von Extrakten verschiedener Varietäten

Erdnüsse verschiedener Herkunftsorte und Sorten wurden extrahiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse zweier Gelelektrophoresen vom Extrakt der Standard-Erdnuss im Vergleich mit Erdnüssen aus Südostasien; und zwar drei Varietäten aus Indonesien (Indonesien, Bali-1 und Bali-2) und eine aus Thailand. In der Coomassie-Färbung sind deutliche Unterschiede erkennbar, die das Bandenmuster und die Konzentration einzelner Proteine betreffen. Besonders hervorzuheben ist, dass eine Bande in beiden Bali-Erdnussextrakten (Bali-1 und Bali-2) bei ca. 63 kDa fehlt.



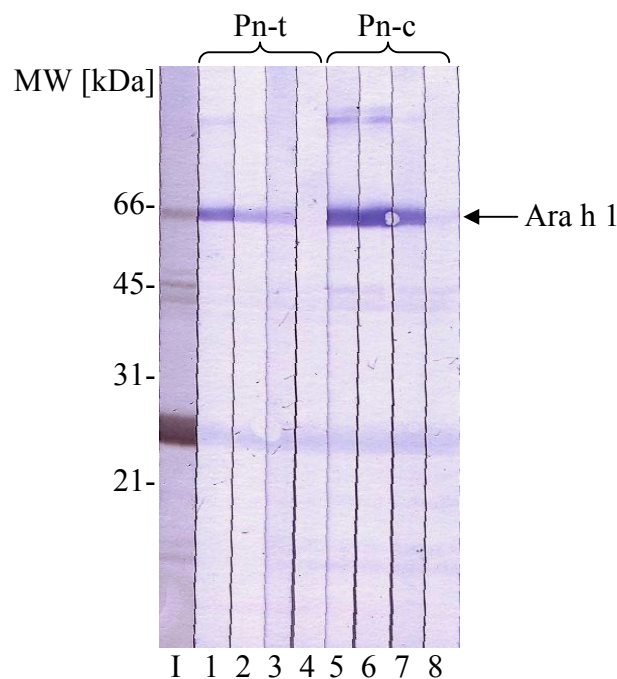
**Abbildung 40: Analyse von Erdnussextrakten verschiedener Varietäten bezüglich ihrer Proteinzusammensetzung.**

(SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung)

Spur 1 und 6: Standard-Erdnussextrakt, Spur 2: Bali-1 Erdnussextrakt, Spur 3: Bali-2 Erdnussextrakt, Spur 4: Thailand-Erdnussextrakt, Spur 5: Indonesien-Erdnussextrakt.

Mittels Immunoblotanalyse konnte unter Verwendung von zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen Ara h 1 (Pn-t und Pn-c) bei beiden Bali-Erdnussextrakten das Fehlen von Ara h 1 bestätigt werden.

Zur Absicherung wurde ein Inhibitionsversuch durchgeführt. Dazu wurde Standard-Erdnussextrakt auf eine Membran geblottet. Die monoklonalen Antikörper gegen Ara h 1 (Pn-t und Pn-c) wurden mit Bali-1 und Bali-2 Erdnussextrakt präinkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Antikörper ohne Inhibition direkt eingesetzt und als Positivkontrolle wurden die Antikörper mit herkömmlichem Erdnussextrakt präinkubiert. Während der Ara h 1-haltige Standard-Erdnussextrakt die monoklonalen Antikörper komplett absorbiert, geschieht dies nicht unter der Verwendung der Bali-Erdnussextrakte (Abbildung 41). Lediglich der Inhibitionsversuch von Pn-t mit den Bali-Erdnussextrakten weist auf eine geringe Vorabsorption des Antikörpers hin, was auf einen geringen Ara h 1 Gehalt in diesen Extrakten hindeutet. Dies wurde jedoch nicht beim Einsatz von Pn-c bestätigt, die Bandenintensität ist im Vergleich zum ungehemmten Antikörper gleichstark. Somit wurde auch im Inhibitionsversuch das Fehlen von Ara h 1 in dem Bali-1 Erdnussextrakt belegt.



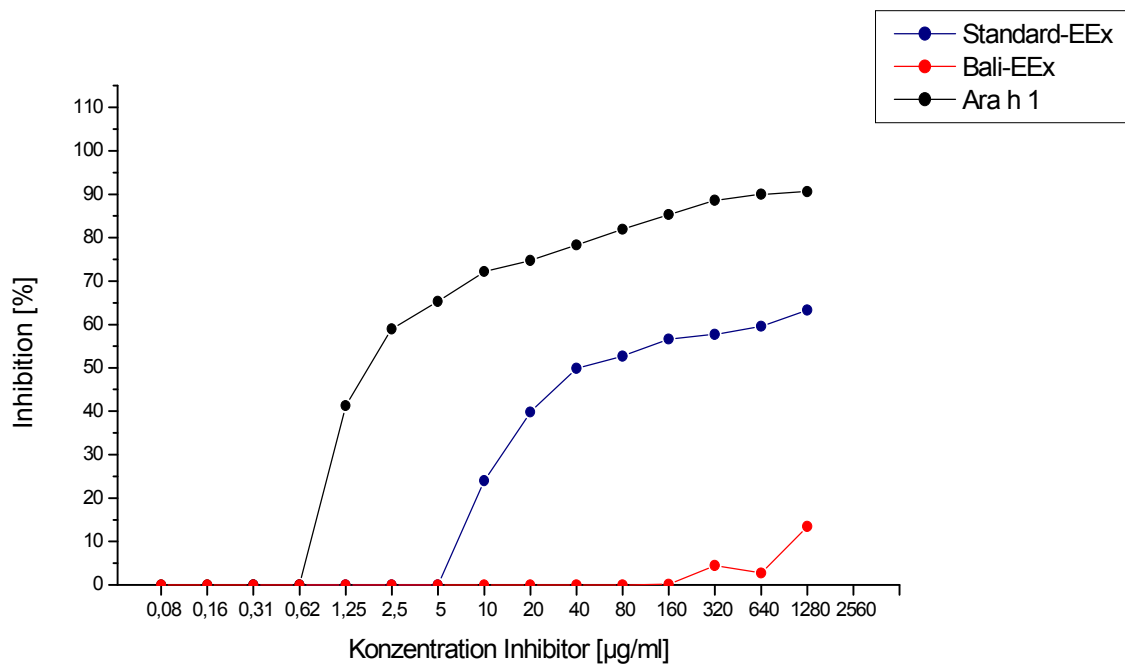
**Abbildung 41: Immunoblot-Inhibition der Ara h 1-spezifischen monoklonalen Antikörper Pn-t bzw. Pn-c mit verschiedenen Erdnussextrakten zum Nachweis des Vorhandenseins von Ara h 1.** (SDS-PAGE, reduzierende Bedingungen, 15 µg/cm Standard-Erdnussextrakt, Blot auf NC-Membran) I: India Ink, Spur 1: Pn-t (ungehemmt), Spur 2: Pn-t mit Bali-1 Extrakt, Spur 3: Pn-t mit Bali-2 Extrakt, Spur 4: Pn-t mit Standard-Extrakt präinkubiert, Spur 5: Pn-c (ungehemmt), Spur 6: Pn-c mit Bali-1 Extrakt, Spur 7: Pn-c mit Bali-2 Extrakt, Spur 8: Pn-c mit Standard-Extrakt präinkubiert.

### 3.5.2 Etablierung eines Ara h 1-ELISAs

Da mit dem Ara h 1 ein wichtiges Majorallergen in dem Bali-1 Erdnussextrakt stark vermindert war bzw. völlig fehlte, sollte dessen Gehalt quantitativ mittels ELISA bestimmt werden.

Zur Entwicklung eines Ara h 1-spezifischen Assays standen nur die beiden monoklonalen Antikörper Pn-c und Pn-t zur Verfügung. Daher wurde zunächst ein indirektes kompetitives System entwickelt, indem die Antikörper ohne vorherige Reinigung unmittelbar eingesetzt werden konnten.

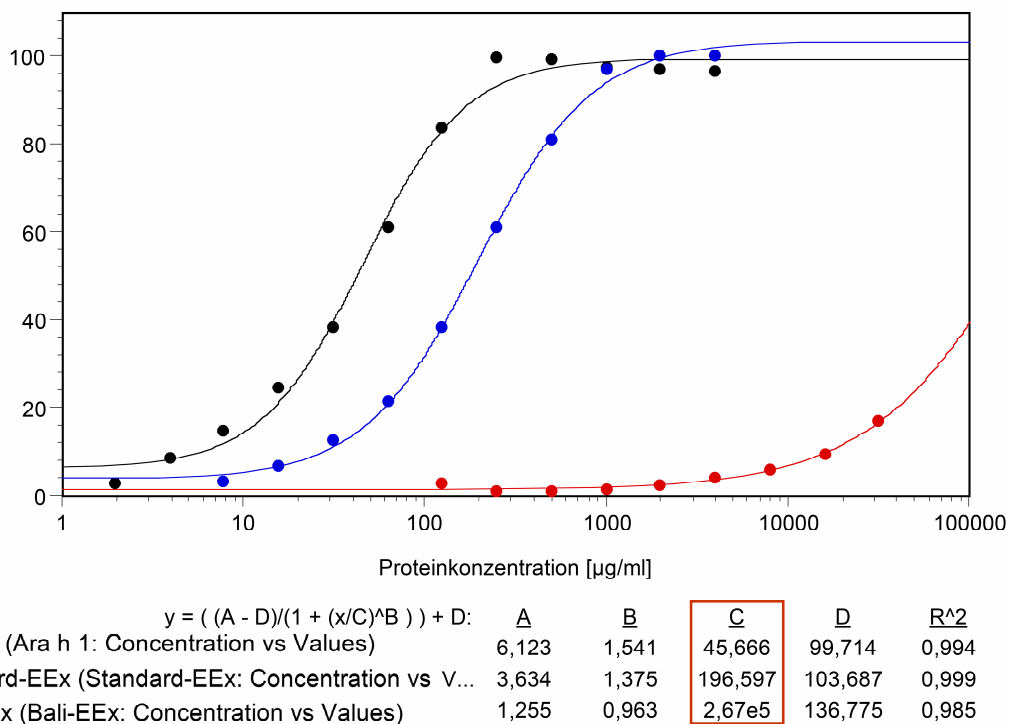
In ersten Vorversuchen wurden die Coating-Bedingungen für das Ara h 1 und die Konzentration der eingesetzten Reaktionspartner austitriert. Hierzu stand gereinigtes Ara h 1 zur Verfügung, dem die Ara h 1 Konzentration der verschiedenen Extrakte gegenübergestellt werden konnte. Das Ziel war, die bestmögliche Nachweisempfindlichkeit mit dem Einsatz von möglichst niedrigen Konzentrationen an Proteinlösungen und Antikörpern zu erreichen. Nachdem diese Parameter ermittelt worden waren, wurde der monoklonale Antikörper mit Ara h 1, Standard-Erdnussextrakt und Bali-Erdnussextrakt in aufsteigenden Konzentrationen präinkubiert. Durch Inhibition des Antikörpers konnte eine Abschätzung des Ara h 1 Gehaltes der verschiedenen Erdnussvarietäten gemacht werden. In Abbildung 42 ist das Ergebnis eines ELISAs dargestellt, bei dem Ara h 1 an die Platte gekoppelt und der monoklonale Antikörper Pn-c eingesetzt wurde. Durch Vorversuche wurde der Guanidinhydrochlorid-Puffer (pH 9,6) als optimaler Coating-Puffer für Ara h 1 ermittelt, das in einer Konzentration von 5 µg/ml an die Platte gekoppelt wurde. Deutlich zu erkennen ist, dass Pn-c durch Präinkubation mit Ara h 1 nahezu komplett gehemmt wurde. Beim Einsatz vom Standard-Erdnussextrakt konnte eine starke Inhibition des Antikörpers detektiert werden, während der Bali-Erdnussextrakt in den eingesetzten Konzentrationen kaum inhibitorische Auswirkungen auf den Antikörper hat (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Indirekter Inhibitions-ELISA zur semiquantitativen Bestimmung von Ara h 1 in Erdnussextrakten.**

Inhibition des monoklonalen Antikörpers gegen Ara h 1 (Pn-c) durch Präinkubation mit Standard-Erdnussextrakt, Bali-Erdnussextrakt und Selbstinhibition mit gereinigtem Ara h 1, Nachweis der Inhibition an einer Ara h 1 gecoateten Platte.

Da die Extrakte aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht in höheren Konzentrationen als 1,28 mg/ml eingesetzt werden konnten, wurde für die Etablierung eines sensitiveren Sandwich-ELISAs ein polyklonaler Antikörper gegen Gesamt-Erdnussextrakt (K7) verwendet. Dieser wurde über eine Protein G-Säule affinitätschromatographisch gereinigt und an die 96-Well-Platte gekoppelt. Nach Zugabe der verschiedenen Extrakte konnte der Ara h 1 Gehalt durch den Nachweis der an das K7-Serum gebundene Protein mit dem Ara h 1-spezifischen monoklonalen Antikörper Pn-t bestimmt werden. Abbildung 43 zeigt einen sigmoidialen Verlauf der eingesetzten Ara h 1- und Erdnussextrakt-Konzentrationen. Im Bali-Erdnussextrakt waren auch mit diesem Versuchsaufbau nur Spuren von Ara h 1 nachweisbar.



**Abbildung 43: Sandwich-ELISA zur semiquantitativen Bestimmung von Ara h 1 in Erdnussextrakten.**

Coating von K7 (Kaninchenserum gegen Gesamt-Erdnussextrakt), Inkubation der verschiedenen Proben, Nachweis des Ara h 1 Gehalts mit dem monoklonalen Antikörper gegen Ara h 1 Pn-t.

A: unteres Plateau, B: Steigung, C: EC<sub>50</sub>, D: oberes Plateau, R<sup>2</sup>: Korrelationskoeffizient.

Um die Sensibilität und Spezifität des Testsystems zu erhöhen, wurde ein Kaninchen mit Ara h 1 immunisiert und das erhaltene Serum (KB) für den Einsatz im ELISA mittels einer Protein G-Säule gereinigt. An die 96-Well-Platte wurde diesmal der Protein G-gereinigte monoklonale Antikörper (Pn-t) gecoatet. Nach Bindung des Ara h 1 aus der Probe wurde dieses mit dem KB-Kaninchenserum nachgewiesen. Abbildung 44 zeigt, dass die Verdünnungsreihe vom konventionellen Standardextrakt im ELISA parallel zur Ara h 1 Standardkurve verläuft. Vergleicht man die Wendepunkte dieser beiden Kurven lässt sich der Ara h 1 Gehalt im Standard-Erdnussextrakt bestimmen. Der Wendepunkt wird beim Einsatz von 0,029 µg/ml Erdnussextrakt erreicht, während nur 0,009 µg/ml gereinigtes Ara h 1 eingesetzt werden muss. Das bedeutet, dass in 0,029 µg/ml Erdnussextrakt 0,009 µg/ml, also 31 % Ara h 1 vorhanden ist. Hingegen ist die Ara h 1 Konzentration des Bali-1 Erdnussextraktes nicht auswertbar. Selbst bei hohen eingesetzten Proteinkonzentrationen wurde eine Extinktion von 30 % nicht erreicht. Daraus konnte eine Ara h 1 Konzentration von weniger als 0,2 % im Bali-1 Erdnussextrakt abgeleitet werden.



**Abbildung 44: Sandwich-ELISA zur semiquantitativen Bestimmung von Ara h 1 in Erdnussextrakten.** Coating von Pn-t (monoklonaler Antikörper gegen Ara h 1), Inkubation der verschiedenen Proben, Nachweis des Ara h 1 Gehalts in den verschiedenen Proben mit dem anti-Ara h 1 Kaninchenserum KB. Die Pfeile markieren die Proteinkonzentration des Wendepunktes.

A: unteres Plateau, B: Steigung, C: EC<sub>50</sub>, D: oberes Plateau, R<sup>2</sup>: Korrelationskoeffizient.

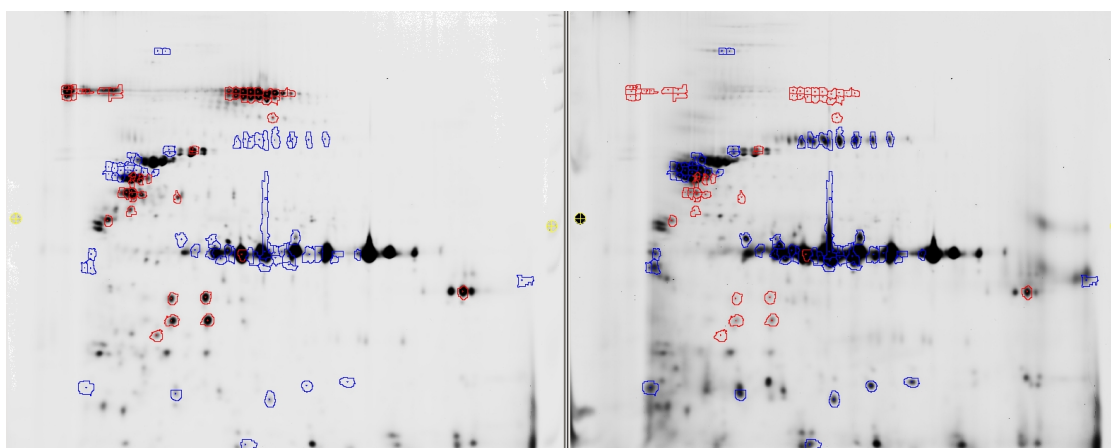
### 3.5.3 Extraktanalyse mittels der 2D-DIGE Technik

In Kooperation mit dem Institut für Immunologie der Universität Kiel wurden der Bali-1 und der Standard-Erdnussextrakt mit der zweidimensionalen Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) analysiert. Der Bali-1 Erdnussextrakt wurde mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Cy5 markiert, der Standard-Erdnussextrakt mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Cy3. Die Extrakte wurden in einem Gel zweidimensional aufgetrennt, die Farbstoffe visualisiert und einzelne Spots mittels Trypsin-Fingerprinting analysiert. Im Vergleich der Spotintensität wurde nicht nur eindeutig das Fehlen des Ara h 1 bestätigt, sondern auch die Reduktion anderer Proteine, wie das Ara h 2 nachgewiesen. Hingegen war das Vorkommen anderer Proteine bzw. Allergene, wie Ara h 3/4, deutlich verstärkt. Abbildung 45 zeigt das

zweidimensionale Proteinmuster, bei dem die verstärkte Expression („Hochregulierung“) von Proteinen gegenüber dem Bali-1 Erdnussextrakt blau dargestellt ist, die verminderte Expression („Herunterregulation“) ist in Rot dargestellt. Proteine, die in beiden Extrakten in gleichen Konzentrationen vorhanden waren, erschienen durch die Überlagerung der beiden Farbstoffe in Gelb.

Standard-Erdnussextrakt

Bali-1 Erdnussextrakt



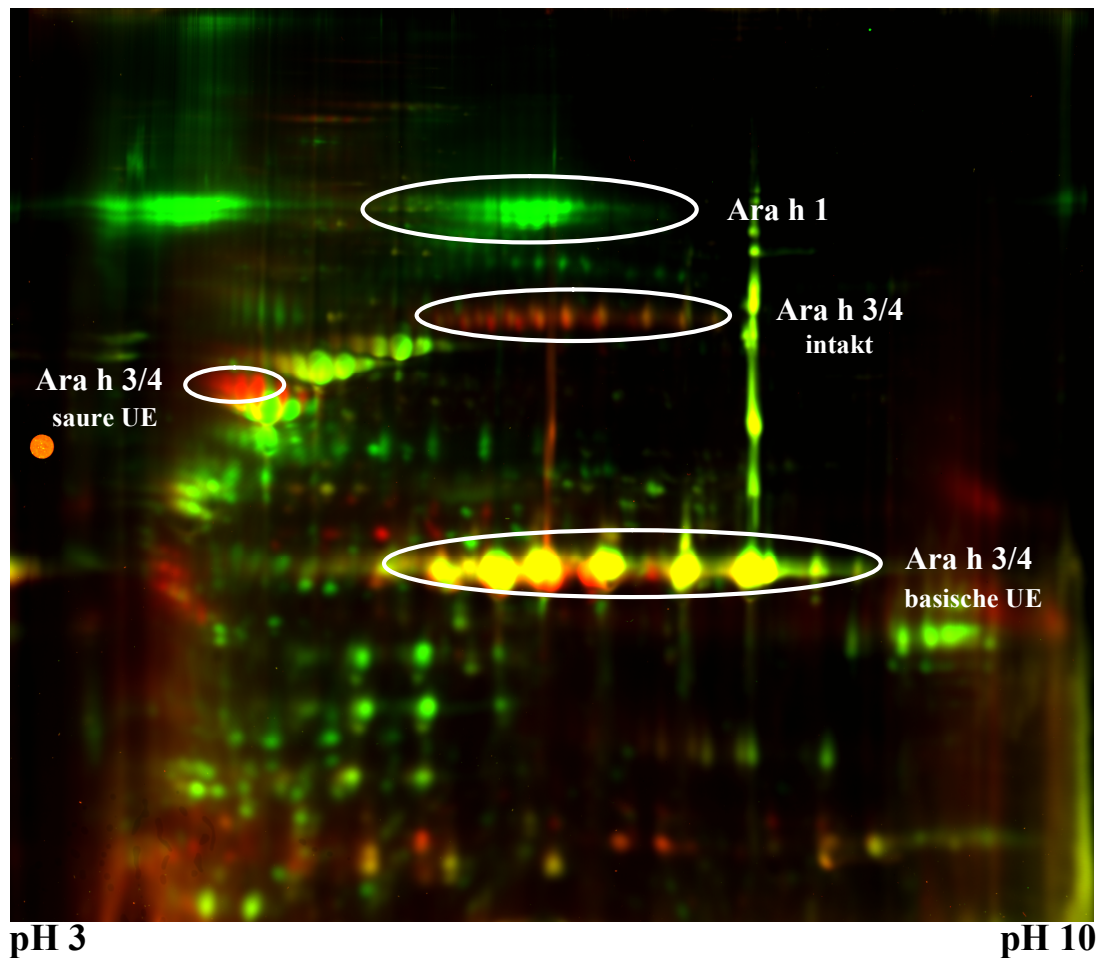
rote Spots:  
Herunterregulation von links nach rechts



blaue Spots:  
Hochregulierung von links nach rechts

**Abbildung 45: Analyse des Standard- und Bali-1 Erdnussextraktes mittels 2D DIGE (Abbildung von Hendrik Schmidt, Universität Kiel, zur Verfügung gestellt).**

Der direkte, übereinandergelagerte Vergleich der untersuchten Erdnussextrakte ist in Abbildung 46 dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass Ara h 1 nur im Standard-Erdnussextrakt vorhanden ist und daher als grüne Spots erscheint. Die Ara h 3/4 Isoformen, die rot erscheinen, sind nur im Bali-Erdnussextrakt nachweisbar. Dabei handelt es sich um Isoformen der sauren und basischen Untereinheit sowie um das komplette Ara h 3/4, das posttranslational nicht in die saure und basische Untereinheit gespalten wurde.



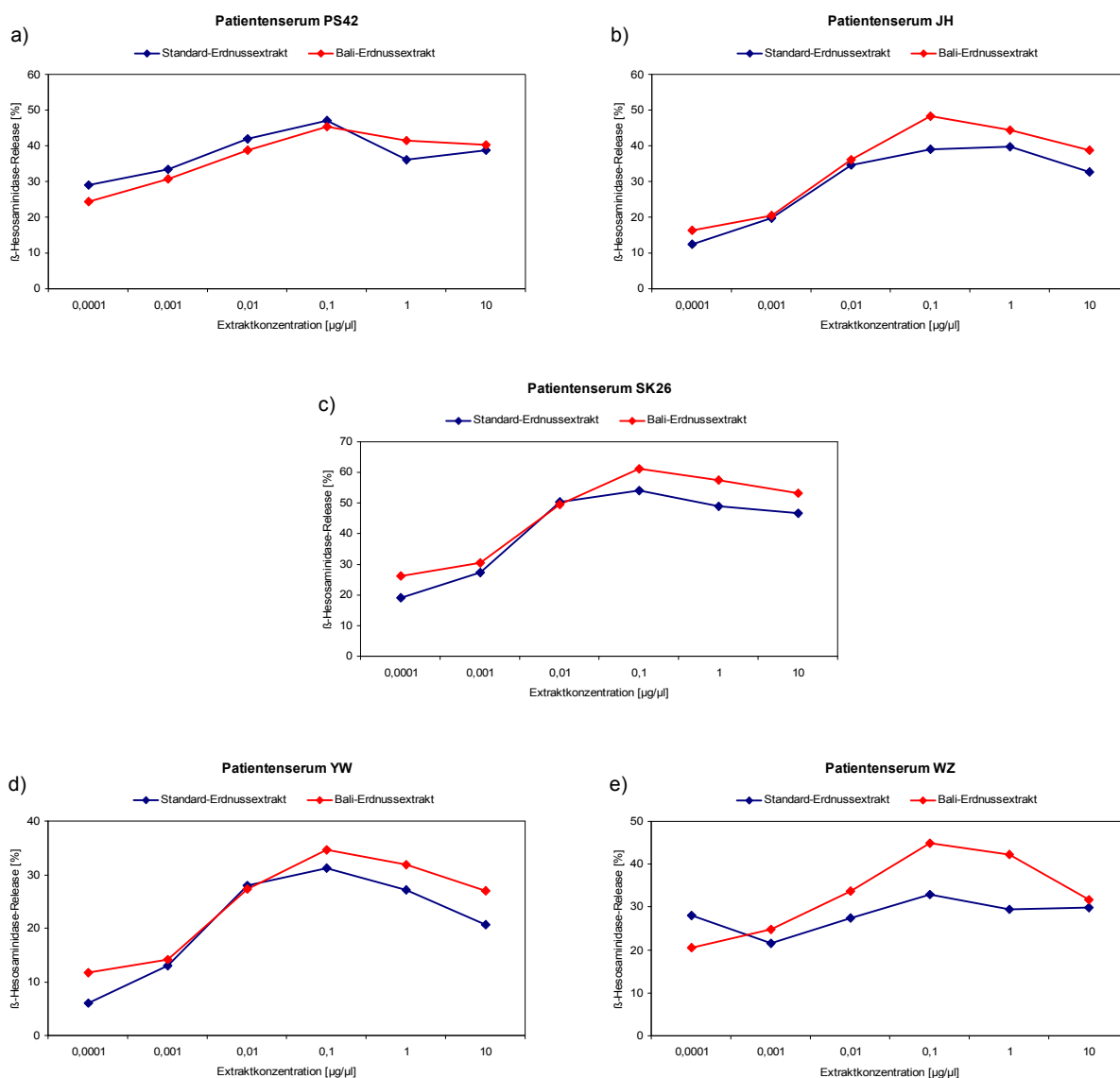
**Abbildung 46: 2D DIGE zum Vergleich der Proteinzusammensetzung des Standard- und des Bali-1 Erdnussextraktes.**

Der Standard-Erdnussextrakt wurde mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Cy3 markiert, der Bali-1 Erdnussextrakt mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Cy5. Die gelbe Farbe entsteht aus Überlagerung der beiden Farbstoffe (Abbildung von Hendrik Schmidt, Universität Kiel, zur Verfügung gestellt).  
UE: Untereinheit.

### 3.5.4 Vergleich der biologischen Reaktivität

Aufgrund des Fehlens des Majorallergenes Ara h 1 im Bali-1 Erdnussextrakt wurde die biologische Reaktivität dieses Extraktes im Vergleich zum Standard-Erdnussextrakt im humanisierten RBL-Test überprüft. Dazu wurden fünf Seren von Erdnussallergikern verwendet, mit denen die RBL-Zellen sensibilisiert wurden. Durch Zugabe der Extrakte erfolgte die Kreuzvernetzung der Antikörper mit den Allergenen und die Freisetzung des Mediators  $\beta$ -Hexosaminidase. Graphisch ausgewertet wurde die Mediator-Ausschüttung in

Abhängigkeit der Proteinkonzentration (Abbildung 47). Festzustellen ist, dass die Kurvenverläufe bei der Verwendung der Patientenserum PS42, JH, SK26 und YW sehr ähnlich sind. Dies deutet auf eine gleich hohe biologische Aktivität des Standard- und des Bali-1-Erdnussextraktes hin.



**Abbildung 47: Messung der  $\beta$ -Hexosaminidase-Ausschüttung im RBL-Test durch Standard- und Bali-1-Erdnussextrakt.** Für die Sensibilisierung wurden Seren der Patienten PS42 (a), JH (b), SK26 (c), YW (d) und WZ (e) eingesetzt.

Um einen quantitativen Vergleich durchzuführen, wurden die Extraktkonzentrationen ermittelt, die eine Mediatorfreisetzung von 30 % herbeiführen (Tabelle 10). Die Konzentrationen sind bei den Patienten PS42, JH, SK26 und YW ähnlich. Bei der Patientin WZ ist aber deutlich zu erkennen, dass hier eine 10-fach höhere Konzentration an Standard-Erdnussextrakt eingesetzt werden musste, um eine gleiche Mediatorfreisetzung zu erzielen.

**Tabelle 10: Berechnung der im RBL-Test eingesetzten Erdnussextrakt-Konzentrationen, um eine Mediatorfreisetzung von 30 % zu erreichen.**

Patientenseren	Erdnussextrakt-Konzentration	
	Standard [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Bali-1 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
JH	0,0048	0,0041
SK26	0,0013	0,0010
YW	0,0415	0,0237
PS42	0,3017	0,3077
WZ	0,0303	0,0039

Die Ergebnisse des RBL-Tests zeigen, dass die biologische Reaktivität der Bali-Erdnuss, in der Ara h 1 als wichtiges Majorallergen fehlt bzw. stark reduziert ist, sich nicht von der biologischen Reaktivität der Standard-Erdnuss unterscheidet.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Allergenspektrum der Erdnuss charakterisiert, wobei der Fokus auf den niedermolekularen Proteinen unter 25 kDa lag. Die Allergene Ara h 7 und Ara h 8, dem Homologen des Birken-Majorallergens Bet v 1, konnten erstmalig als natürliche Proteine nachgewiesen werden und in diesem Zusammenhang wurde jeweils eine neue Isoform entdeckt. Die IgE-Reaktivität von Oleosin wurde am natürlichen und rekombinanten Protein gezeigt, jedoch konnte die allergene Wirkung nicht eindeutig belegt werden. Das Allergenspektrum der Erdnuss wurde weiter vervollständigt, indem das Panallergen LTP nachgewiesen und in der Erdnuss als neues Allergen beschrieben werden konnte.

Die Charakterisierung der einzelnen Erdnussallergene ist für die Optimierung der Diagnostik und zur Entwicklung von Therapieansätzen unabdingbar. Denn die Erdnussallergie stellt aufgrund des Schweregrades der von ihr ausgelösten allergischen Reaktionen, der Chronizität und der Verbreitung von erdnusshaltigen Lebensmitteln ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar. Da zurzeit wegen des unzulänglichen Wissensstandes keine kausale Therapieform existiert, besteht der einzige Weg, eine allergische Reaktion zu umgehen, in der Vermeidung erdnusshaltiger Lebensmittel. Die Deklarationspflicht dieser Nahrungsmittel erleichtert es dem Patienten, dem unabsichtlichen Verzehr vorzubeugen, jedoch kommt es während der industriellen Produktionswege oft zu Verschleppung von Erdnussallergenen in nicht deklarierte Lebensmittel.

Spezifische Immuntherapien für Erdnussallergiker, wie sie zum Beispiel bei Allergien gegen Hausstaubmilben oder Graspollen angewendet werden, sind derzeit nicht verfügbar. Nur einige Studien erforschten den Einsatz einer spezifischen Immuntherapie mit Erdnussextrakt. Die ersten Versuche, die 1992 mittels subkutaner Injektionen steigender Allergendosen durchgeführt wurden, mussten abgebrochen werden, nachdem einem Patienten aus der Placebogruppe versehentlich eine Erhaltungsdosis appliziert wurde und dieser aufgrund eines anaphylaktischen Schocks verstarb (Oppenheimer *et al.* 1992). In dieser, wie auch in der Studie von Nelson *et al.* (1997), wurde außerdem eine hohe Rate an systemischen Reaktionen beobachtet. Da der derzeitige Wissensstand nicht ausreicht, um diese Reaktionen einzudämmen, wird die klassische spezifische Immuntherapie zu einer unkalkulierbaren und risikoreichen Behandlungsmethode. Mittels Desensibilisierung über den oralen Weg konnte

ein Patient erfolgreich behandelt werden, dieser litt jedoch nur unter vergleichbar milden Symptomen (Patriarca *et al.* 2006). Ein Therapieansatz, bei dem anti-IgE Antikörper verwendet werden, wurde in einer Studie erfolgreich abgeschlossen (Leung *et al.* 2003). Hier konnte der Schwellenwert soweit erhöht werden, dass die Folgen bei einem unbeabsichtigten Verzehr von Erdnüssen abgeschwächt werden konnten. Allerdings sind auch hier Nebenwirkungen zu verzeichnen und es fehlen weitere Studien, um eine Langzeitwirkung nachzuweisen. Zudem muss bei dieser Therapieform alle drei Monate erneut anti-IgE verabreicht werden, so dass lediglich eine Symptombekämpfung und keine Heilung stattfindet.

Die Heilung erdnussallergischer Patienten ist ein derzeit unerreichbares Ziel. Das gegenwärtige Ziel muss es sein, zumindest für hochallergische Patienten die Auslöseschwelle für eine allergische Reaktion anzuheben. Eine Voraussetzung für diesen Ansatz ist die Erfassung des kompletten Allergenspektrums der Erdnuss. Dadurch können standardisierte und optimierte Impfstoffe entwickelt werden, mit denen im Gegensatz zum Erdnussextrakt eine Risikoabschätzung möglich ist. Außerdem können durch eine Komponenten-aufgelöste Diagnostik auf das Sensibilisierungsmuster der Patienten maßgeschneiderte Therapieansätze entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Voraussetzung zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie das Allergenrepertoire der Erdnuss näher aufgeklärt. Dies wurde durch die Identifizierung von Allergenen erreicht, die aufgrund verwandtschaftlicher Ähnlichkeit zwischen den Leguminosen in der Erdnuss vermutet wurden, oder durch den Nachweis von natürlichen Allergenen, die bereits auf DNA-Ebene identifiziert worden waren.

## 4.1 Reinigung von nAra h 8 deckt eine neue Isoform auf

In der vorliegenden Arbeit gelang es, Ara h 8 als natürliches Protein aus der Erdnuss zu isolieren. Durch die Identifikation einer neuen Isoform auf cDNA-Ebene konnte das natürliche Protein in seiner Struktur charakterisiert werden. Ara h 8 war zuvor nur als rekombinantes Protein hergestellt und untersucht worden. Seine Existenz in natürlichem Erdnussextrakt wurde durch Inhibitionsversuche mit dem homologen Protein der Birke, dem Bet v 1, indirekt nachgewiesen (Mittag *et al.* 2004). Die Isolation des natürlichen Proteins liefert ein Referenzmolekül für die Charakterisierung von rekombinanten Allergenen, die ihren Einsatz in der Diagnostik und Therapie finden.

### 4.1.1 Reinigung von Ara h 8 aus Erdnussextrakt

Bislang ist keine Reinigungsmethode beschrieben worden, um natürliches Ara h 8 aus der Erdnuss zu isolieren. Lediglich die Herstellung und Reinigung des rekombinanten Proteins aus einem heterologen Expressionssystem wurde publiziert (Mittag *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu steht das Bet v 1, das dem Ara h 8 homologen Protein aus der Birke. Dieses Hauptallergen der Birke wurde nicht nur rekombinant dargestellt (Hoffmann-Sommergruber *et al.* 1997), sondern auch als natürliches Protein aus Birkenpollen isoliert (Jarolim *et al.* 1989, Elsayed und Vik 1990, Bollen *et al.* 2007) und in zahlreichen Studien charakterisiert. Gegen Bet v 1 sind die meisten Baumpollenallergiker sensibilisiert, ca. 100 Millionen Menschen sind davon weltweit betroffen (Vrtala *et al.* 2001). Das Besondere dabei ist, dass dieses Allergen für die Ausbildung von Kreuzallergien zu verschiedenen Pollen und Nahrungsmitteln verantwortlich ist. Dazu zählen hauptsächlich Äpfel, Karotten, Nüsse, aber auch Soja und Erdnuss, wie es am rekombinanten Protein gezeigt wurde (Mittag *et al.* 2004).

Die erste Identifikation von Ara h 8 im Erdnussextrakt gelang in dieser Arbeit mithilfe eines kreuzreaktiven Kaninchenantisera, das mit dem Bet v 1-homologen Protein der Soja (Gly m 4) hergestellt wurde (Mittag *et al.* 2005). Für die Ara h 8 Isolation wurden zunächst die Bedingungen für die Erdnussextraktion optimiert. Bei der Extraktion unter sauren Bedingungen wurde eine Konzentrierung des Ara h 8 erreicht, einhergehend mit der Reduktion anderer Allergene. So wurde im sauren Extrakt keine Verunreinigung mit Ara h 3/4 detektiert. Die Konzentration von Ara h 2 war im Vergleich zum basischen Extrakt

so sehr abgeschwächt, dass es nur noch mit dem sensitiveren Patientenserum nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht mit dem monospezifischen Kaninchenserum. Allerdings blieb die Menge an Ara h 1 und Ara h 6 unverändert. Westphal *et al.* (2004) zeigten bereits, dass die Verwendung verschiedener Extraktionspuffer an identischen Ausgangsmaterialien zu quantitativen und qualitativen Unterschieden der extrahierten Proteine führten. Da die Konzentration an Ara h 8 weiterhin so gering war, dass zu der als Ara h 8 detektierten Bande kein Proteinkorrelat in der India Ink-Färbung zu sehen war, erfolgte eine weitere Konzentrierung mittels Größenausschlusschromatographie. Dadurch wurde Ara h 8 nicht nur angereichert, sondern es wurde eine Abtrennung des 63 kDa großen Allergens Ara h 1 erreicht, so dass lediglich Ara h 6 als weiteres Allergen in der Ara h 8 Fraktion nachzuweisen war. Elsayed und Vik (1990) schlossen im Falle der Reinigung von Bet v 1 nach der Größenausschlusschromatographie eine Ionenaustauschchromatographie an, um die Bet v 1 enthaltende Fraktion von Kontaminationen zu befreien. Auf Ara h 8 angewendet war diese Vorgehensweise nicht erfolgreich, da Kontaminationen mit Ara h 6 festgestellt wurden. Als Ursache für die schlechte Abtrennung wurde der sehr ähnliche pI von Ara h 8 (pI 5,0) und Ara h 6 (pI 5,2) vermutet. Ein Vergleich der Proteinsequenzen zeigte deutliche Unterschiede im Cysteingehalt dieser Proteine. Während Ara h 8 keine SH-Gruppen aufweist, sind im Ara h 6 fünf Cystine vorhanden. Daher war die Strategie den isoelektrischen Punkt von Ara h 6 in den sauren Bereich zu verschieben, indem die SH-Gruppen mit Iodessigsäure alkyliert werden, um dadurch eine Trennung von Ara h 8 zu ermöglichen. Die anschließende Ionenaustauschchromatographie bestätigte die theoretischen Überlegungen und führte zu reinem Ara h 8.

Die Charakterisierung des isolierten Allergens durch N-terminale Sequenzierung zeigte Abweichungen von vier der zwölf analysierten Aminosäuren im Vergleich zur veröffentlichten Ara h 8-Sequenz (GenBank Accession Nummer AY328088, I.U.I.S Ara 8.0101) von Mittag *et al.* (2004). Ferner konnte die Abspaltung des initialen Methionins nachgewiesen werden. Diese Modifikation wurde entsprechend auch am natürlichen Bet v 1 (Swoboda *et al.* 1995) und dem Homologen der Kirsche Pru av 1 (Neudecker *et al.* 2001) gefunden.

### 4.1.2 Bestätigung einer neuen Ara h 8 Isoform

Da das Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung des nAra h 8 von der Proteinsequenz der veröffentlichten Ara h 8-Sequenz Ara h 8.0101 (Mittag *et al.* 2004) abwich, wurde die Ara h 8 Gensequenz analysiert. Dabei war das Ziel, einen ORF zu identifizieren, dessen abgeleitete Proteinsequenz dem N-Terminus des nAra h 8 entspricht. Dazu wurden zunächst Ara h 8.0101-spezifische Primer genutzt, anschließend wurde das Gen auf Ebene der genomischen DNA amplifiziert. Die abgeleitete Primärsequenz zeigte Substitutionen zum Ara h 8.0101 in 11 Aminosäuren, die sich hauptsächlich im C-terminalen Ende befanden. Im N-terminalen Bereich konnte lediglich an der 14. Aminosäure ein Austausch nachgewiesen werden. Daher war diese Strategie nicht geeignet, um eine zum natürlichen Protein homologe Isoform zu identifizieren. Jedoch wurde auf diesem Weg ein Intron in der Gensequenz mit der Länge von 90 bp entdeckt. Dies stimmt überein mit Befunden der homologen Proteine der Birke (Schenk *et al.* 2006), der Erdbeere (Musidlowaska-Persson *et al.* 2007) und des Apfels (Gao *et al.* 2005). Die Charakteristika des Introns in der Ara h 8 Gensequenz entsprechen einem typischen Pflanzenintron. Es ist reich an Adenosin (A) und Thymin (T) (Goodall und Filipowicz 1989, Csank *et al.* 1990, Ko *et al.* 1998) und besitzt eine 5'-GT-3' Splicingstelle am 5'-Ende und eine 5'-AG-3' am 3'-Ende (McCullough und Schuler 1997). Dies wurde ebenfalls an den Majorallergenen der Erdnuss Ara h 1 (Viquez *et al.* 2003) und Ara h 3 (Viquez *et al.* 2004) gezeigt.

Im weiteren Verlauf wurde aufgrund des vorhandenen Introns der Gensequenz auf cDNA-Ebene gearbeitet. Dabei wurde beim Screenen verschiedener Klone eine dem N-Terminus des nAra h 8 entsprechende Gensequenz von 462 bp identifiziert, die im Anschluss kloniert und exprimiert wurde. Neben dem ermittelten N-Terminus wurde durch Trypsin-Fingerprinting-Analysen am nAra h 8 die abgeleitete Proteinsequenz des klonierten Gens bestätigt. 94 % der Sequenz wurde mit den Fragmenten des tryptisch verdauten Proteins abgedeckt. Die Ara h 8.0101-Sequenz konnte dagegen nicht bestätigt werden.

Die IgE-Reaktivität des rekombinanten Proteins wurde mit fünf Patientenseren nachgewiesen, die anhand ihres positiven Ergebnisses im CAP-Test mit Ara h 8.0101 ausgewählt wurden. Beide Isoformen, die nur zu 51,3 % identisch sind, zeigten die gleiche Reaktivität mit den getesteten Patientenseren im Immunoblot. Eine Suche in der Datenbank ergab eine höhere Identität von 85,1 % zwischen der neuen Ara h 8.0201 Isoform und dem kürzlich

veröffentlichten AhPR10-Protein (GenBank Accession Number AY726607) (Chadha und Das 2006). Verschiedene Isoformen von Bet v 1-homologen Proteinen konnten bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. Nicht nur beim Birkenpollenallergen Bet v 1 selber konnten Isoformen identifiziert werden (Swoboda *et al.* 1995, Schenk *et al.* 2006), sondern auch beim Car b 1, dem Majorallergen der Hainbuche (Larsen *et al.* 1992), beim Pru av 1 aus dem Pfirsich (Reuter *et al.* 2005) und beim Cor a 1, dem Hauptallergen der Haselnuss (Breiteneder *et al.* 1993). Die unterschiedlichen Isoformen eines Allergens können verschiedene IgE-Reaktivitäten aufweisen (Larsen *et al.* 1992, Ferreira *et al.* 1997, Reuter *et al.* 2005). Beim Bet v 1 wurden sogar drei Isoformen nachgewiesen, die keine bzw. nur sehr schwache IgE-Reaktivität besitzen (Feirrer *et al.* 1996). Das gilt nach ersten immunologischen Untersuchungen für Ara h 8.0101 und Ara h 8.0201 nicht. Zwar scheint die Reaktivität von Ara h 8.0101 schwächer zu sein, aber beide Isoformen sind eindeutig IgE-reaktiv und werden mit der gleichen Spezifität erkannt.

#### 4.1.3 Funktionelle Charakterisierung von Ara h 8

Ara h 8 gehört zu den Proteinen der PR-10 Familie, die in höheren Pflanzen vorkommen und wahrscheinlich eine Rolle in der Abwehrreaktion der Pflanze als Antwort auf Pathogene oder verschiedenste abiotische Stressfaktoren spielen (Van Loon und Van Strien 1999, Liu *et al.* 2003, Kav *et al.* 2004). Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von PR-10 Proteinen unter Stressbedingungen hochreguliert ist; dennoch ist die genaue biologische Funktion von PR-10 Proteinen bislang nicht bekannt. Einige Studien lassen auf eine Ribonukleaseaktivität schließen, wie es an Birkenpollen (Bet v 1) (Bufe *et al.* 1996), Ginseng (Moiseyev *et al.* 1994), Paprika (Park *et al.* 2004), Lupinen (LaPR10) (Bantignies *et al.* 2000) und dem AhPR10 der Erdnuss (Chadha und Das 2006) gezeigt werden konnte. Da Ara h 8.0201 und AhPR10 zu 85 %, bis zur Aminosäure 130 sogar zu 100 % identisch sind, ist es wahrscheinlich, dass das Ara h 8.0201 ebenfalls eine RNase Aktivität aufweist. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Existenz des konservierten Motivs (G-X-G-X-X-G) einer Phosphat-Binde-Schleife (P-Loop), das von Lys33 und Lys70 flankiert ist. Dieses Motiv ist für Nukleotid-Bindeproteine charakteristisch und ermöglicht die Bindung von RNA, indem die Ribose in der Glycin-reichen Region und die Phosphate an die Lysinreste der konservierten Region binden (Saraste *et al.* 1990, Hoffmann-Sommergruber *et al.* 1997, Bantignies *et al.* 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit verschiedenen Testsystemen für Ara h 8.0201 die RNase-Aktivität nachgewiesen und bestätigt werden. Dass diese Aktivität in der Pflanze eine große Aufgabe in der Bekämpfung von Pathogenen hat, zeigten Chadha und Das (2006), die als Folge der RNase-Aktivität eine antifungale Funktion des AhPR10 Proteins beschrieben. Die Expression der Gene der PR-10-Familie ist während der adaptiven Mechanismen hochreguliert. Jain *et al.* (2006) demonstrierten am Beispiel von salztoleranten Erdnüssen eine erhöhte Expression des Ara h 8. Wie die Expression in den verschiedenen Situationen reguliert wird, ist derzeit nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass eine Expression durch das Vorkommen von Introns und Exons in Verbindung mit einem starken Promotor verstärkt wird (Lorkovic *et al.* 2000). Da in dieser Arbeit in der Ara h 8 Gensequenz ein Intron entdeckt wurde, könnte durch dieses die Expression des PR-10 Proteins intensiviert werden.

Weitere interessante Aspekte zur biologischen Funktion der PR-10 Proteine konnten in verschiedenen Studien über die Eigenschaft zur Ligandenbindung beschrieben werden (Mogensen *et al.* 2002, Markovic-Housley *et al.* 2003). Untersuchungen am Bet v 1 konnten es als mögliches Membranbindeprotein identifizieren (Mogensen *et al.* 2007). Mogensen *et al.* stellten dabei die Hypothese auf, dass die Bindung von Bet v 1 an eine Membran mit einer Strukturveränderung des Proteins einhergeht und dadurch die Ligandenbindung ermöglicht wird. Außerdem zeigten sie die 3D Struktur eines Komplexes, der aus einem Molekül Bet v 1 und zwei Molekülen eines Pflanzensteroides besteht. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass Bet v 1 die Funktion eines Pflanzensteroidcarriers hat. Während der Etablierung einer Reinigungsstrategie wurde für das nAra h 8 ein untypisches hydrophobes Verhalten beobachtet, welches nicht von der Proteinstruktur abzuleiten war. Dies könnte auf Adduktbildung mit einem Pflanzensteroid hindeuten, die dem Protein hydrophobe Eigenschaften verleiht. Zudem zeigte die massenspektroskopische Analyse des gereinigten Ara h 8 neben dem Molekülmassenpeak von 16281 Da einen zweiten Peak, der um 1163 Da größer war. Markovic-Housley *et al.* (2003) demonstrierten, dass die Bindung von einem Molekül Brassionolide an Bet v 1 im Massenspektrum eine Verschiebung des Molekülpeaks um 481 Da verursacht, von zwei Molekülen Brassionolide um 964 Da. Die Erdnuss enthält als Ölfrucht einen Lipidanteil von ca. 37 %, davon entfallen pro Gramm Öl 1,7 mg auf Phytosterole (Maguire *et al.* 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass Ara h 8 ein oder mehrere Moleküle bindet und als Sterol-Carrier agiert. Diese Hypothese wäre in weiteren Untersuchungen zu überprüfen und der Ligand zu identifizieren.

Durch die Etablierung einer Strategie zur Isolation von Ara h 8 aus der Erdnuss und der rekombinanten Darstellung des natürlichen Pendant ist es in dieser Arbeit gelungen, Ausgangsmaterial für weiterführende Untersuchungen herzustellen. Dies ermöglicht die weitere Aufklärung der biologischen Funktion zum Verständnis der Wirkungsweise.

## 4.2 Oleosin

In dieser Arbeit wurde die mögliche Rolle von Oleosin als Allergen in der Erdnuss untersucht. Das Protein wurde in einer löslichen Form exprimiert und gereinigt und mit dem natürlichen Protein hinsichtlich der IgE-Reaktivität von Erdnussallergikerseren verglichen. Die IgE-Reaktivität des Erdnuss-Oleosins wurde nachgewiesen, jedoch reichte die Anzahl der reagierenden Patienten nicht aus, um das Protein als Allergen zu klassifizieren. Dies entspricht den Ergebnissen von Pons *et al.* (2002), jedoch bleibt die Rolle als Allergen weiterhin unklar.

### 4.2.1 Allergencharakterisierung: Expression von Oleosin

Obwohl Oleosin in mehreren Pflanzen wie Mais, Sonnenblume, Mandel und Reis identifiziert worden ist und Gegenstand zahlreicher Studien zur Aufklärung der Struktur und Funktion war, ist dessen heterologe Expression bislang kaum beschrieben worden. In der Literatur ist dazu vorrangig die Darstellung von rekombinanten Formen für *Arabidopsis thaliana* (Roux *et al.* 2004), Haselnuss (Akkerdaas *et al.* 2006), Sesam (Chen *et al.* 1997, Peng *et al.* 2007) und Erdnuss (Pons *et al.* 2002, Pons *et al.* 2005) zu finden. Diese basieren vor allem auf *E. coli*-, aber auch auf Insektenzell-Expressionssystemen. Als Allergen konnte Oleosin lediglich in Sesam (Leduc *et al.* 2006) nachgewiesen und als potentielles Allergen in der Erdnuss (Pons *et al.* 2002) und Haselnuss (Akkerdaas *et al.* 2006) beschrieben werden.

Um die allergene Wirkung des Oleosins näher zu untersuchen, sollte es im Rahmen dieser Arbeit in löslicher Form exprimiert und das natürliche Protein gereinigt werden. Für die heterologe Expression galt es dabei zu beachten, dass Oleosine aus 3 Molekülabschnitten, einem hydrophilen N-, einem hydrophilen C-terminalen Abschnitt und einem zentralen, stark hydrophoben Bereich bestehen. Der zentrale Teil stellt oft ein starkes Hindernis für die

Expression von rekombinanten Oleosinen dar. Er senkt die Löslichkeit des Proteins in wässrigem Milieu, so dass Oleosin fast ausschließlich als „inclusion bodies“ synthetisiert wurde (Chen *et al.* 1997, Roux *et al.* 2004), die auch unter stark denaturierenden Bedingungen nicht lösbar sind. Im Fall der Erdnuss und der Haselnuss wurde das Problem der „inclusion bodies“ ignoriert, indem auf eine weitere Reinigung verzichtet wurde und alle weitergehenden Untersuchungen mit dem Zellpellet durchgeführt wurden (Pons *et al.* 2002, Akerdaas *et al.* 2006).

Um eine Nachweisgrenze für die Detektion des rekombinanten und vor allem des natürlichen Oleosins zu haben, wurde spezifisches Kaninchenserum mit „multiplen antigenen Peptiden“ (MAPs) hergestellt (Tam 1988). Dazu wurde im ersten Schritt die Oleosin Proteinsequenz auf die Verteilung von Epitopen hin untersucht. Wie die *in silico* Analyse zeigte, liegen die B-Zell-Epitope ausschließlich in den N- und C-terminalen Bereichen, so dass der hydrophobe Mittelteil zum Nachweis der IgE-Reaktivität zu vernachlässigen ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutungen von Pons *et al.* (2002), die bereits aufgrund der hohen Hydrophobizität das Mittelteilstück als Epitop ausgeschlossen haben. Für die Auswahl der MAPs wurden die N- und C-terminalen Bereiche zusätzlich auf T-Zell-Epitope hin analysiert. Zwei Peptide, die B- und T-Zell-Epitope aufwiesen, wurden mithilfe der MAP-Technik synthetisiert und Oleosin-spezifische Kaninchenserum hergestellt. Im Gegensatz zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist dies eine schnelle und vor allem Allergenspezifischere Methode. Innerhalb kurzer Zeit wurden mit einem sauberen, definierten Produkt Oleosin-spezifische Seren produziert, da es sich bei den MAPs um ein einheitliches Antigen handelt und dies keine Protein-Kontaminationen mit anderen Allergenen oder nicht allergenen Proteinen aufweist. Durch die Verzweigung der Peptide am Lysin-Gerüst wurde eine Erhöhung des Molekulargewichtes und damit der Immunogenität erreicht.

Aufgrund der zu erwartenden Löslichkeitsprobleme bei der Expression des Oleosins angesichts der großen hydrophoben Region, wurden mehrere Klonierungsstrategien verfolgt. Neben der gesamten Gensequenz wurden die einzelnen hydrophilen Fragmente des Oleosins kloniert, der N-terminale und der C-terminale Bereich. Bereits 1993 wurde von Li *et al.* die N-terminale Region des Oleosins aus der Sonnenblume erfolgreich rekombinant in *E. coli* dargestellt, um es strukturell zu untersuchen. Außerdem wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem der N- und der C-terminale Bereich durch einen His-Tag als Abstandshalter miteinander verbunden wurde. Die Codons des zusammengesetzten Konstruktes wurden zudem für die

---

Expression in *E. coli* optimiert, so dass mögliche Probleme durch die in *E. coli* unterrepräsentierten tRNAs umgangen werden konnten (Ikemura 1981).

Die verschiedenen Oleosin-Konstrukte konnten in hohen Ausbeuten in *E. coli* exprimiert werden. Unterschiedliche Temperaturen, IPTG-Konzentrationen sowie die Expressionsdauer hatten keine starke Auswirkung auf die Ausbeute. Die Vollängenkonstrukte wirkten trotz des hydrophoben Bereiches nicht toxisch auf die Bakterienzellen. Jedoch waren sie selbst unter stark denaturierenden Bedingungen kaum löslich, wie in Gegenwart von 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinhydrochlorid. Diese Bedingungen wurden zuvor in der Literatur für Oleosine aus *Arabidopsis thaliana* (Roux *et al.* 2004) und Sesam (Chen *et al.* 1997) beschrieben und konnten dort erfolgreich angewendet werden. Für die Expression wurden zudem verschiedene *E. coli* Stämme verwendet, die die Löslichkeit des Proteins unterstützen sollten. Neben Origami, Rosetta gami und BL21(DE3) Stämmen wurde der Stamm Arctic Express verwendet. Dieser erhöht die Löslichkeit von Proteinen, indem deren Faltung durch die Koexpression von Chaperonen und eine niedrige Expressionstemperatur von 16 °C unterstützt wird. Trotz der vielen Variationen gelang es nicht, das Protein in löslicher Form herzustellen. Wang (2004) untersuchte ausführlich die Löslichkeit von natürlichem Soja-Oleosin. Sie zeigte, dass der Einsatz von 4 M Urea, 2 M Thiourea und 2,5 % des zwitterionischen Detergens SB3-10 das Oleosin in Lösung brachte und es damit für weitere Untersuchungen verwendbar war. SB3-10 ist ein Sulfobetain und wird vor allem für die Solubilisierung von hydrophoben Membranproteinen genutzt. Durch die Verwendung dieses Puffers konnten die rekombinanten Proteine der Oleosin-Vollängenkonstrukte in Lösung gebracht werden. Da das SB3-10 vor der säulenchromatographischen Reinigung entfernt werden musste, wurde die Probe schrittweise dialysiert. Hierbei fiel allerdings das zuvor solubilierte Protein zum großen Teil aus. Der Fokus wurde daher auf die N- und C-terminalen Oleosinkonstrukte und auf das zusammengesetzte Konstrukt aus dem N- und C-terminalen Bereich, das mit einem His-Tag verbunden ist, gelegt. Die drei exprimierten Oleosinfragmente waren unter nativen Bedingungen löslich. Dies bestärkt die Vermutung, dass der hydrophobe Mittelteil für die Solubilisierungsschwierigkeiten verantwortlich ist. Peng *et al.* (2007) demonstrierten am rekombinanten Sesam-Oleosin, dass die Löslichkeit wesentlich gesteigert wurde, wenn die hydrophobe Region zuvor um die Hälfte reduziert wurde. Das zusammengesetzte Konstrukt aus dem N- und C-terminalen Bereich bietet dabei gegenüber den einzelnen Fragmenten den Vorteil, dass es sich um ein Antigen handelt, das beide auf der Oberfläche liegenden

Bereiche, die die B-Zell-Epitope enthalten, miteinander vereint sind. Diese liegen dadurch verglichen zum natürlichen Oleosin in einer ähnlichen räumlichen Anordnung zueinander.

Da für den Nachweis der IgE-Reaktivität nur begrenzte Mengen an Patientenseren zur Verfügung standen, wurden die weiteren Versuche nur mit dem zusammengesetzten Konstrukt und parallel mit dem natürlichen Oleosin durchgeführt, das aus der Erdnuss isoliert worden war.

#### **4.2.2 Reinigung von natürlichem Oleosin**

Um das Erdnussoleosin in authentischer Form zu erhalten, sollte die Isolation unter möglichst milden und nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden. Die publizierten Arbeiten über das Erdnussoleosin kombinierten die Reinigung der Ölkörperchen aus Erdnussextrakt mit einem bzw. zwei hintereinander durchgeführten präparativen SDS-PAGEs (Pons *et al.* 1998, Pons *et al.* 2002, Pons *et al.* 2005). Tzen *et al.* (1997) beschrieben die Olesosin-Reinigung von wässrigen Soja-, Sonnenblumen-, Raps- und Sesamextrakten durch Zentrifugation über Sucrosekissen. Da das Oleosin im Erdnussöl vorkommt, wurde auf eine wässrige Extraktion verzichtet. Stattdessen wurde das Erdnussmehl mit Aceton entfettet und mit dem Aceton-Erdnussöl Gemisch weitergearbeitet. Dadurch wurde die Oleosinkonzentration im Ausgangsmaterial erhöht und somit die Methode von Tzen *et al.* (1997) optimiert. Durch die anschließende Reinigung des Aceton-Öl Gemisches über Sucrosekissen und anschließende Teilentfettung konnte das Erdnuss-Oleosin erfolgreich isoliert werden. Weitere Reinigungsschritte waren aufgrund des sauberen Endproduktes überflüssig.

#### **4.2.3 Nachweis der IgE-Reaktivität**

Für den Nachweis der allergenen Wirkung des Erdnussoleosins sollte die IgE-Reaktivität des rekombinanten Konstruktes, das den N- und C-terminalen Bereich des Oleosins über einen His-Tag verbindet, und des natürlichen Oleosins nachgewiesen werden. Da Erdnussöl in verschiedenen Salben und Kosmetikprodukten verwendet wird, darunter auch Fettsalben zur

Hauptpflege von Neurodermitikern, wurde diese Patientengruppe zur Analyse herangezogen. Studien zeigen, dass allergische Reaktionen auf Erdnussöl durch Oleosin ausgelöst werden können (Olszewski *et al.* 1998, Pons *et al.* 2002). In Vorversuchen wurden verschiedene Patientenseren im Immunoblot eingesetzt, von denen jedoch keines mit rekombinantem noch mit natürlichem Oleosin reagierte. Pons *et al.* (2002) verwendeten in ihrer Arbeit den sensitiveren IgE-Radioimmunoassay (IgE-RIA) zum Nachweis der IgE-Reaktivität und zeigten, dass drei der 14 getesteten Seren stark positiv reagierten. Zwei dieser positiven Seren setzten sie zudem im Immunoblot ein und fanden dort nur schwache Reaktivität. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Immunoblotversuche mit dem sensitiveren Chemilumineszenz-Nachweis und einem größeren Repertoire an Patientenseren (n=33) wiederholt. Dabei reagierten zwei Seren mit dem natürlichen Oleosin und eines schwach mit dem rekombinanten, so dass die IgE-Reaktivität des Oleosins bestätigt werden konnte. Als Kontrolle diente das MAP-Kaninchenantiserum, das mit dem natürlichen und rekombinanten Protein sowohl im Immunoblot unter der Verwendung des chromogenen Substrates als auch im Chemilumineszenz-Nachweis Reaktivität zeigte. Entgegen der theoretisch höheren Nachweisempfindlichkeit der Chemilumineszenz-Methode zeigte Patient Nr. 20 bei der Austestung des natürlichen Oleosins dort keine IgE-Reaktivität, sondern nur bei der anschließenden Anfärbung der Membran mittels des chromogenen Substrates. Die im Vergleich zum natürlichen Oleosin schwächere Reaktivität des rekombinanten Proteins könnte durch konformationelle Epitope bedingt sein, die durch das Entfernen des hydrophoben Mittelteils nicht mehr korrekt zueinander orientiert sind. Sollten ausschließlich konformationelle Epitope für die IgE-Reaktivität des Oleosins verantwortlich sein, ist die korrekte Faltung und Orientierung der Epitope notwendig. Diese Hypothese könnte in einem Epitopmapping untersucht werden, mit dem zumindest lineare Epitope des Oleosins identifiziert werden können.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist das Oleosin aufgrund seiner strukturellen Besonderheiten ein schwer zu solubilisierendes Protein. Trotz der Verwendung verschiedener rekombinanter Konstrukte und des Einsatzes des natürlichen Oleosins konnte in dieser Arbeit die von Pons *et al.* (2002) gezeigte IgE-Reaktivität zwar bestätigt, aber nicht an 5 Patientenseren nachgewiesen werden, die erforderlich wären, um es als Allergen zu klassifizieren. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde das Oleosin aus Sesam eindeutig als Allergen nachgewiesen (Leduc *et al.* 2006). Dies wurde im Immunoblot mit 32 Patientenseren gezeigt, von denen 30 Seren mit dem Sesam-Oleosin aus Sesam-Extrakt und aus gereinigten

Ölkörperchen reagierten. Die beiden nachgewiesenen 17 kDa und 15 kDa großen Oleosine wurden als Ses i 4 und Ses i 5 bezeichnet. Den Untersuchungen zum Erdnuss-Oleosin entsprechend konnte das Haselnuss-Oleosin zwar als IgE-reaktives Protein, aber nicht als Allergen nachgewiesen werden (Akkerdaas *et al.* 2006). Die IgE-Reaktivität des rekombinanten Oleosins wurde von Akkerdaas *et al.* (2006) lediglich im Dotblot mit Gesamtzellysate mit einem Patientenserum gezeigt. Die fehlende Reaktivität im ebenfalls durchgeführten Immunoblot begründeten sie mit den Bedingungen der reduzierten und nicht reduzierten SDS-PAGE, wobei aber auch die denaturierenden Bedingungen dies beeinflussen könnten. Um zukünftig die Rolle des Oleosins in der Hasel- und Erdnussallergie eindeutig zu klären, sind korrekt gefaltete rekombinante Proteine eine zwingende Voraussetzung für eine sichere Diagnostik. Vorteilhaft könnten dabei eukaryotische Expressionssysteme wie die etablierten Hefe-, Säuger- oder Insektzellkulturen sein. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit angewandten Expression in *E. coli* werden dort durch intrazelluläre Organellen wie z.B. das endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat posttranslationale Modifikationen ermöglicht. Dazu zählen neben der korrekten Faltung der Proteine auch Glykosylierungen und Phosphorylierungen (Koolman und Röhm, 1998).

### 4.3 LTP

Das nicht-spezifische Lipid Transfer Protein (nsLTP) wurde nach seiner Entdeckung als Hauptallergen im Pfirsich (Pastorello *et al.* 1999) in weiteren Pflanzen nachgewiesen (Asero *et al.* 2000). Da das LTP hohe Kreuzreaktivitäten zu verschiedensten Nahrungsmitteln aufwies, die mit starken anaphylaktischen Reaktionen einher gehen können, wurde auch in der Erdnuss die Existenz von LTP vermutet (Asero *et al.* 2002). Dies konnte jedoch bisher nicht bewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit gelang es, das nsLTP in der Erdnuss auf DNA-Ebene und als natürliches Protein nachzuweisen.

#### 4.3.1 Identifizierung eines neuen Erdnussallergens

Da bisher keine Sequenzinformationen zum Erdnuss-LTP vorlagen, wurden anhand von Sequenzvergleichen verschiedener LTP Gensequenzen ein homologer Bereich im 3'-Ende bestimmt. Dieser und das Poly-A-Ende der mRNA dienten als Ausgangspunkt für die

Amplifikation des 3'-Endes. Die NCBI Gendatenbank wurde nach zu diesem Teilstück homologen Sequenzen aus EST-Sequenzierungen gescreent. Durch diesen Schritt gelang es erstmals, die komplette LTP-Gensequenz der Erdnuss zu amplifizieren und zwei Isoformen, die zu 90 % identisch zueinander sind, zu identifizieren. Das für die Mitglieder der Prolamin-Superfamilie charakteristische konservierte Cysteinmuster C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C, (Kreis *et al.* 1985, Shewry *et al.* 2006) konnte bei beiden Isoformen bestätigt werden. Außerdem konnte, wie zuvor am LTP vom Apfel und Pfirsich (Diaz-Perales *et al.* 2002, Zuidmeer *et al.* 2005) gezeigt wurde, an beiden Isoformen des Erdnuss-LTPs jeweils ein Signalpeptid bestimmt werden, das eine Länge von 24 AS besitzt. Es konnte also ein typisches LTP mit einem berechneten Molekulargewicht von 9 kDa (reifes Protein) in der Erdnuss identifiziert werden.

Für den Nachweis der IgE-Reaktivität wurden beide Isoformen als reifes Protein im *E. coli*-Expressionssystem rekombinant hergestellt. Zur heterologen Expression wurden die Vektoren pET23b und pET32b ausgewählt. Mithilfe des ersten Vektors wurde das LTP mit einem C-terminalen His-Tag versehen, während durch den pET32b-Vektor ein zusätzlicher Thioredoxin-Tag angefügt wurde. Das Protein Thioredoxin arbeitet als Antioxidans und unterstützt die Reduktion von anderen Proteinen durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen (Holmgren 1989). Dadurch sollte beim Erdnuss-LTP die Bildung der vier Disulfidbrücken unterstützt werden, um eine korrekte Faltung zu ermöglichen, die die Löslichkeit des LTPs erhöhen sollte. Zusätzlich wurden die Codons der beiden Isoformen auf die Expression in *E. coli* (Geneart, Regensburg) optimiert, um den Einsatz seltener *E. coli* tRNAs zu vermeiden (Ikemura 1981) und eine hohe Expressionsrate zu gewährleisten.

Entgegen den vorangestellten theoretischen Überlegungen erzielte das codonoptimierte Konstrukt im pET23b-Vektor hinsichtlich der Expressionsrate und der Löslichkeit die besten Ergebnisse. Allerdings konnte nur die Isoform LTP-2 erfolgreich exprimiert werden, während die Isoform LTP-1 kein rekombinantes Protein lieferte. Beide Isoformen wurden codonoptimiert und über dieselben Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor ligiert. Da die Sequenzen im richtigen Leserahmen kloniert waren und die Expressionsprozedur identisch war, bleibt als Grund für die unterschiedliche Expressionsausbeute nur die unterschiedliche Proteinsequenz. Eine Vermutung wäre, dass die erste Aminosäure einen starken Einfluss auf die Expression hat. Da es sich dabei beim LTP-1 um ein Isoleucin und beim LTP-2 um ein Leucin handelt, beides aliphatische Aminosäuren mit ähnlichen

Charakteristika, ist diese Vermutung jedoch eher unwahrscheinlich. Auch für die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die die Translation des Gens beeinflussen, konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden.

Untersuchungen zur Reinigung des Expressionsproduktes aus pET23b-LTP-2 zeigten, dass das Protein unter nativen Bedingungen nicht in löslicher Form gewonnen werden konnte: Das exprimierte Protein akkumulierte vollständig als "inclusion bodies". Erfolgreich war die Reinigung mittels denaturierender Lyse und Affinitätschromatographie über  $\text{Co}^{2+}$ -Chelatbindung. Es konnten 1,5 mg LTP pro Liter Expressionskultur gewonnen werden. Diese Ausbeute entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten der Expression von LTP aus der Haselnuss (Schocker *et al.* 2004) und aus der Kirsche (Scheurer *et al.* 2001). Die LTPs wurden dort, analog zum Erdnuss-LTP, im bakteriellen *E. coli* Expressionssystem als His-Tag-Fusionsprotein isoliert. Jedoch konnten dort bereits unter nativen Bedingungen die Ausbeuten von 1,5-3 mg gereinigtes Protein pro Liter Bakterienkultur erzielt werden. Da das Enzym Thioredoxin die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt, sollte durch die Verwendung des pET32b-Vektors und die daraus resultierende Expression eines Thioredoxin-Fusionproteins die Löslichkeit des Erdnuss-LTPs gesteigert werden. Das exprimierte Protein war zwar weiterhin unter nativen Bedingungen nicht löslich, aber die Löslichkeit unter denaturierenden Bedingungen wurde etwas gesteigert. In den folgenden Reinigungsschritten war es jedoch nicht möglich, das rekombinante Protein in entsprechend höheren Ausbeuten zu reinigen, so dass insgesamt die Verwendung des pET32b-Vektors keine Verbesserung brachte. Wahrscheinlich würde durch den Wechsel auf ein eukaryotisches Expressionssystem eine Steigerung der Löslichkeit und der Ausbeute erreicht werden. Für das LTP wurde dabei am häufigsten die Expression im *Pichia pastoris* System angewendet, wie es für das LTP aus Pfirsich (Diaz-Perales *et al.* 2002, Zuidmeer *et al.* 2005), Erdbeere (Zuidmeer *et al.* 2006), Apfel (Zuidmeer *et al.* 2005) und Orange (Ahrazem *et al.* 2005) beschrieben wurde. Beim Pfirsich-LTP wurden dabei hohe Ausbeuten von bis zu 20 mg pro l Expressionskultur beschrieben (Diaz-Perales *et al.* 2002).

Zum Nachweis der IgE-Reaktivität des Erdnuss-LTPs musste beachtet werden, dass die Sensibilisierung gegen nsLTP einer geographischen Verteilung unterliegt. So konnte es im mediterranen Raum als dominantes Allergen nachgewiesen werden, während in Zentral- und Nordeuropa keine oder nur milde Reaktionen gegen nsLTP verschiedener Früchte beobachtet wurden (Scheurer *et al.* 2001, Ballmer-Weber *et al.* 2002, Fernandez-Rivas *et al.* 2006, Reuter

*et al.* 2006). Für die Untersuchungen zur IgE-Reaktivität des Erdnuss-LTPs wurden daher Seren von Allergikern aus Italien verwendet, die gegen das Pfirsich-LTP sensibilisiert sind. Das LTP wurde mit diesen Seren als neues Erdnussallergen bestätigt und als Ara h 9 klassifiziert.

### 4.3.2 Charakterisierung des natürlichen LTPs

Durch eine Optimierung der Extraktionsbedingungen konnte das natürliche Erdnuss-LTP identifiziert werden. Während bei der Standard-Extraktion unter basischen Bedingungen kein LTP nachzuweisen war, wurde aufgrund des von der Gensequenz vorhergesagten pIs im basischen Bereich (9,4) eine Extraktion unter sauren Bedingungen durchgeführt und das LTP durch N-terminale Sequenzierung bestätigt. In der Immunoblotanalyse zeigten vor allem die Seren der Pru p 3 - und Erdnuss-positiven Patienten starke IgE-Reaktivitäten (56 %), aber auch die Pru p 3-negativen und Erdnuss-positiven Patientenseren. Dort lag die Reaktivität jedoch nur bei 23 %. Bei den reinen Erdnussallergikern war die IgE-Reaktivität nur sehr schwach nachweisbar und lag bei 20 %. Aufgrund der klinischen Daten liegt es nahe, dass die Sensibilisierung der Erdnussallergiker gegen Erdnuss-LTP vor allem durch die Kreuzreaktivität zu Pru p 3 ausgelöst wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Vermutungen überein, dass Pfirsich-LTP die primäre Sensibilisierung auslöst (Zuidmeer und van Ree 2007). Die genaue klinische Bedeutung von Erdnuss-LTP ist noch unklar und müsste durch klinische Studien aufgeklärt werden. Da es sich bei dem LTP um ein kreuzreaktives Protein handelt und die Symptome einer LTP-Allergie oft mit systemischen Reaktionen einhergehen, bedeutet die Entdeckung und Klassifizierung des Erdnuss-LTPs als Allergen für LTP-sensibilisierte Patienten eine Einordnung der Erdnuss als neues allergenes Lebensmittel.

Prinzipiell können drei Sensibilisierungswege angenommen werden. Erstens die primäre Sensibilisierung durch ein Nahrungsmittel ohne Vorliegen einer Pollenallergie. Dies war lange Zeit der wahrscheinlichste Weg, denn im Zusammenhang mit der Allergie gegen LTP war aufgefallen, dass diese nicht mit einer Birkenpollinosis einhergeht. Zweitens die primäre Sensibilisierung gegen ein Nahrungsmittelallergen in Verbindung mit einer Pollenallergie. So war in einigen Studien spekuliert worden, dass die Exposition mit Pollen im Mittelmeerraum, z.B. von Oliven und Plantanengewächsen, als Kofaktoren dienen und die Entwicklung einer LTP-Allergie unterstützen könnte (Fernandes-Rivas *et al.* 2006, Reuter *et al.* 2006). Drittens

die primäre Sensibilisierung ausschließlich gegen ein Pollenallergen (Lombardero *et al.* 2004). Zum Teil widersprechen sich die Ergebnisse einzelner Studien, aber es scheint immer wahrscheinlicher zu sein, dass Pfirsich-LTP nicht allein für eine Sensibilisierung verantwortlich ist. Sobald der Sensibilisierungsweg aufgeklärt ist, kann auch die geographische Verteilung der Allergie gegen LTP erklärt werden. Die Verfügbarkeit von natürlichem und rekombinantem LTP ermöglicht es, das Sensibilisierungsmuster von Patienten verschiedener Herkunft zu analysieren, dadurch den Sensibilisierungsweg und die Symptomauslösung aufzuklären und eine unumstrittene Einteilung in die echten oder pollenassoziierten Nahrungsmittelallergene vorzunehmen.

## 4.4 Ara h 7

Bisher konnte Ara h 7 nur auf cDNA-Ebene identifiziert und als Allergen nachgewiesen werden (Kleber-Janke *et al.* 1999), das natürliche Protein blieb unentdeckt. Durch erneute Klonierung wurde eine weitere IgE-reaktive Isoform gefunden und durch die neu gewonnenen Sequenzinformationen schließlich auch das natürliche Pendant im Erdnussextrakt.

### 4.4.1 Aufdeckung und Charakterisierung einer neuen Isoform

Analysen des Erdnussproteoms zur Identifizierung von Ara h 7 orientierten sich bislang an der Primärsequenz und den Charakteristika der publizierten Gensequenz (AF091737). Da Ara h 7 trotz dieser Informationen nicht im Erdnussextrakt detektiert werden konnte, wurde die Ara h 7 Gensequenz mit einem zur AF091737 Sequenz spezifischen Primer und einem Oligo(d)T-Primer aus der cDNA amplifiziert. Der erhaltene 495 bp große ORF zeigte einen großen Unterschied zur publizierten Ara h 7-Sequenz, der die Deletion eines Nukleotids am Basenpaar 378 betraf. Diese hat eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge, die sich ab der Aminosäure 126 auf die Proteinsequenz und somit auch auf die Größe (alt: 16,4 kDa, neu: 17,1 kDa) und den isoelektrischen Punkt (alt: 6,4, neu 7,7) auswirkt. Zur weiteren Analyse wurde die dem reifen Protein entsprechende Gensequenz kloniert und exprimiert. Die Codons wurden zunächst auf die Expression in *E. coli* optimiert (Genart, Regensburg), da bisherige Versuche zur Expression von 2S-Albuminen wie den Erdnussallergenen Ara h 2 und Ara h 6

in *E. coli* aufgrund von unterrepräsentierten tRNAs, aber auch wegen des hohen Cystein-gehalts von geringem Erfolg waren. Die exprimierten Proteine waren kaum löslich und akkumulierten vorrangig in unlöslicher Form. Untersuchungen an Ara h 6 hatten gezeigt, dass die *E. coli*-Expression eines Ara h 6 His-Tag Fusionsproteins zu unlöslichem Protein führte (Kleber-Janke und Becker 2000). Selbst eine Codonoptimierung reichte nicht aus, um das Protein in löslicher Form zu erhalten (Clement *et al.* 2005). Ähnliches wurde für Ara h 2 beschrieben. So zeigten Kleber-Janke und Becker (2000), dass eine Expression dieser Proteine ohne Koexpression unterrepräsentierter tRNAs kaum möglich war. Hohe Expressionsraten wurden dagegen durch den Einsatz eines *E. coli* Stammes, der zusätzliche *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA-Gene enthält, erzielt. Die unkorrekte Faltung führte allerdings zu unlöslichem Protein. Durch die Verwendung von Thioredoxin als Fusionspartner konnte unter zusätzlicher Koexpression der seltenen *E. coli* tRNAs die Löslichkeit gesteigert werden, so dass nur noch 50 % der exprimierten Proteine unlöslich waren (Lehmann *et al.* 2003).

Aufgrund dieser Studien am Ara h 2 und Ara h 6 wurden die Codons der Ara h 7 Sequenz zur Expression in *E. coli* optimiert und als Fusionsprotein mit Thioredoxin exprimiert. Ein zusätzlicher His-Tag sollte die Reinigung über eine Metallchelate-Affinitätssäule ermöglichen. Das rekombinante Protein konnte auf diese Weise problemlos exprimiert werden und war sogar bis zu 90 % unter nativen Aufreinigungsbedingungen löslich. Eine einfache Reinigung über eine  $\text{Co}^{2+}$ -Chelat-Säule führte zu einem vorgereinigten Protein, das allerdings noch Kontaminationen enthielt. Da jedoch nur die IgE-Reaktivität der neuen Isoform überprüft werden sollte, wurde auf eine zeitaufwendige Optimierung verzichtet. Durch den Nachweis der Reaktivität mit fünf Patientenseren von Erdnussallergikern konnte die Isoform als Ara h 7.0201 klassifiziert werden.

#### 4.4.2 Identifizierung von natürlichem Ara h 7

Die Analyse von Erdnussproteinen mittels 2D-DIGE Technik und Trypsin-Fingerprinting ausgewählter Proteinspots wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie an der Universität Kiel durchgeführt (Latendorf 2007). Mithilfe der Mascot-Datenbankanalyse (Perkins *et al.* 1999) konnten keine Peptide dem Ara h 7 zugeordnet werden. Eine genauere Betrachtung der Daten lenkte die Aufmerksamkeit auf einen Proteinspot (Spot 1114, DIGE 22 - 71598), bei dem vier Peptidfragmente einem 2S Protein zugeordnet worden waren.

Das Alignment dieser Proteinsequenz mit der Ara h 7.0101 und Ara h 7.0201 Sequenz zeigte hohe Identität untereinander. Da die Ara h 7.0201 Sequenz nicht in der Datenbank verfügbar war, wurden die Fragmente nachträglich mit dem Ara h 7.0201 verglichen. Die Auswertung der von dem Spot 1114 erhaltenen Peptide bestätigte das Ara h 7.0201. Erstmals konnte somit Ara h 7 als natürliches Protein im Erdnussextrakt nachgewiesen werden. 55 % der Ara h 7.0201 Sequenz wurden mit den erhaltenen Fragmenten abgedeckt. Dabei wurde auch ein 17 AS großes Fragment hinzugezogen, das in zwei Aminosäuren von der Sequenz abwich. Das C-terminale Ende von Ara h 7.0201, welches durch die Verschiebung des Leserahmens in seiner Proteinsequenz vom Ara h 7.0101 komplett abweicht, wurde eindeutig bestätigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Proteomanalyse mittels Trypsin-Fingerprinting sehr viele Daten liefern kann, die zurzeit nicht optimal ausgewertet werden können. Die Analyse scheitert an der Mikroheterogenität der Proteine wegen des Vorkommens mehrerer Isoformen. Der Austausch einer oder zweier Aminosäuren pro Fragment kann zur Folge haben, dass diese Fragmente über Datenbanken und Suchprogramme nicht identifizierbar sind, wie es hier der Fall war. Nur durch eine manuelle Auswertung konnte das Fragment zugeordnet werden. Außerdem erschweren Signalpeptide, die posttranslational abgespalten werden, eine Analyse. In den Datenbanken werden nur die prä-Proteine zur Analyse dargestellt, so dass die Signifikanz einer Zuordnung deutlich sinkt.

Die Kombination der Ergebnisse von molekularbiologischen und proteinbiochemischen Analysen brachte den Erfolg, das bisher im Erdnussextrakt nicht nachweisbare Ara h 7 zu identifizieren. Über die Klonierung einer weiteren Ara h 7 Isoform in Kombination mit der Proteomanalyse der Erdnuss konnte der Nachweis des natürlich vorhandenen Ara h 7 erbracht werden. Die Reaktivität des rekombinanten Ara h 7 mit Patientenserum zeigte, dass es sich bei dieser Isoform ebenfalls um ein Allergen handelt, es wurde daher als Ara h 7.0201 klassifiziert. Da die Charakterisierung des Allergenspektrums der Erdnuss als Grundlage für Diagnostik und Therapie dient, wäre das nächste Ziel, das natürliche Protein zu isolieren und strukturell zu charakterisieren. Damit stünde ein Referenzprotein zur Verfügung, das zur Überprüfung von rekombinanten Konstrukten, die hauptsächlich ihren Einsatz in der Forschung, Diagnose und Therapie finden, herangezogen werden kann.

## 4.5 Allergen-defiziente Erdnüsse aus Südostasien

Da zurzeit keine Therapiemöglichkeiten für Erdnussallergiker existieren, ist der Verzicht auf erdnusshaltige Lebensmittel der einzige Weg, eine allergische Reaktion zu umgehen. Dies ist aufgrund der vorhandenen Deklarationspflicht erdnusshaltiger Lebensmittel theoretisch einzuhalten, jedoch kommt es immer wieder zu Fällen von verschleppten Erdnussallergenen. Mithilfe von RNAi-Technik wird daher versucht hypoallergene Erdnüsse herzustellen, indem die Genexpression der einzelnen Allergene herunterreguliert bzw. abgeschaltet wird (Dodo *et al.* 2008). Dies warf die Frage auf, ob kommerziell erhältliche Erdnussorten existieren, die sich in ihrem Allergengehalt und damit in ihrer Allergenität unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Erdnussvarietäten entdeckt, in denen Ara h 1 als wichtiges Majorallergen stark reduziert war. Diese durch SDS-PAGE und Immunoblot erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe eines zu diesem Zweck entwickelten ELISA belegt. Die Allergen-defiziente Erdnuss zeigte in biologischen Testverfahren die gleiche Aktivität wie der Standard-Erdnussextrakt. Dies liefert wichtige Erkenntnisse zur Entwicklung von hypoallergenen Erdnüssen. Das Fehlen eines Allergens kann durch die anderen komprimiert werden und somit führt das Ausknocken von Majorallergenen möglicherweise nicht zum Erfolg.

### 4.5.1 Etablierung eines ELISAs zur Bestimmung von Ara h 1

Zur Quantifizierung des Ara h 1-Gehaltes in der Bali-Erdnuss wurde ein Ara h 1 spezifischer ELISA entwickelt. Kommerziell erhältliche Testsysteme sind für die Quantifizierung von Erdnussgehalt in Lebensmitteln entwickelt worden, in denen hauptsächlich polyklonale Kaninchenserum gegen Gesamt-Erdnussextrakt eingesetzt werden und daher nicht ausschließlich gegen das Zielallergen spezifisch sind (Nogueira *et al.* 2004). Die Etablierung eines sensitiven Ara h 1 spezifischen Nachweises wurde über drei Stufen erreicht. Zunächst wurde ein indirekter Inhibitions-ELISA entwickelt. Da hier ein monoklonaler anti-Ara h 1 Antikörper mit den Extrakten präinkubiert wurde, mussten die Extrakte höher konzentriert zur Antikörperlösung eingesetzt werden, um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen. Aufgrund der auftretenden Löslichkeitsprobleme wurde deshalb ein Sandwich-ELISA

entwickelt, in dem ein monoklonaler anti-Ara h 1 Antikörper und ein polyklonales anti-Erdnuss Serum eingesetzt wurden. Durch die Kombination von monoklonalen mit polyklonalen Antikörpern sollte eine hohe Spezifität und Sensitivität des Testsystems gewährleistet werden, die jedoch nicht erreicht wurde. Wahrscheinlich lässt sich dieser Befund auf das zum Coating verwendete Kaninchenserum zurückzuführen. Dadurch wurden nicht nur gegen Ara h 1, sondern auch gegen andere Allergene gerichtete Antikörper an die Mikrotiter-Platte gebunden. Daher wurde der Sandwich-ELISA weiter optimiert, indem statt des polyklonalen anti-Erdnuss Serums der monoklonale Antikörper zum Coaten eingesetzt wurde und für einen spezifischen Ara h 1-Nachweis mit höherer Empfindlichkeit ein extra hierfür hergestelltes polyklonales anti-Ara h 1 Kaninchenserum verwendet wurde. Mit diesem Testsystem konnte Ara h 1 bereits ab einer eingesetzten Konzentration von 10 ng/ml detektiert werden. Pomés *et al.* (2003) entwickelten einen Sandwich-ELISA, der mit zwei monoklonalen Ara h 1-Antikörpern durchgeführt wurde, und konnten Ara h 1-Konzentrationen erst ab 30 ng/ml nachweisen. Die Sensitivität des in dieser Arbeit etablierten ELISAs ist also höher als bei dem ELISA, der nur aus monoklonalen Antikörpern aufgebaut ist. Bezogen auf den Gesamtproteinanteil wurde in der Standard-Erdnuss ein Ara h 1-Gehalt von 30 % berechnet. Da die Erdnuss einen Proteinanteil von ca. 26 % besitzt (Koppelman *et al.* 2001) bedeutet dies, dass der Gehalt an Ara h 1 in der Standard-Erdnuss 7,8 % beträgt. Dies steht weitgehend im Einklang mit dem von Koppelman *et al.* (2001) durch biochemische Methoden bestimmten Ara h 1-Gehalt im Gesamtprotein von 12-16 %. Pomés *et al.* (2003) hatten dagegen einen Ara h 1-Gehalt in der Erdnuss von 0,05-1,5 % ermittelt. Trotz der Entwicklung eines empfindlichen Sandwich-ELISAs war es nicht möglich, den geringen Ara h 1 Gehalt in der Bali-Erdnuss zu bestimmen. Rechnerisch abgeschätzt liegt der Anteil in der Erdnuss unter 0,052 %. Mithilfe des ELISAs konnten die Ergebnisse der SDS-PAGE Analyse und der Immunoblot-Versuche bestätigt werden.

#### **4.5.2 Bestimmung der biologischen Reaktivität mittels RBL-Test**

Der Extrakt der Ara h 1 defizienten Bali-1 Erdnuss sollte in ihrer biologischen Aktivität mit dem Extrakt der Standard-Erdnuss verglichen werden. Aufgrund des Fehlens des Majorallergens war eine herabgesetzte Aktivität zu erwarten. Eine bewährte Methode, die biologische Aktivität zu messen, ist der „skin prick test“ (SPT), bei dem die Extrakte direkt am Patienten verglichen werden können. Aus ethischen Gründen kommt jedoch eine solche

Untersuchung nicht in Frage. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein *in vitro* Test mit humanisierten basophilen Leukämiezellen der Ratte (RBL-Zellen) als Effektorzellen etabliert (Vogel *et al.* 2005). Diese Zellen sind in der Lage, humanes IgE zu binden. Zur Verfügung standen hierfür Patientenserum verschiedener Erdnussallergiker, deren IgE-Antikörper zur Beladung der RBL-Zellen dienten. Der Grad der Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper nach Zugabe der Extrakte wurde über die Freisetzung des Mediators  $\beta$ -Hexosaminidase gemessen. In Vorversuchen wurden verschiedene Patientenserum von Erdnussallergikern mit dem Standard-Erdnussextrakt im RBL-Test getestet. Ein entscheidender Faktor, der die Auswahl an Patientenserum für diese Versuche limitierte, war hierbei die Menge der vorhandenen Patientenserum und die Reaktivität einzelner Serum. Palmer *et al.* (2005) beschrieben bereits, dass die eingesetzten Patientenserum eine hohe Konzentration von allergenspezifischem IgE, in diesem Fall Ara h 1-spezifisch, und einen relativ hohen Anteil von Gesamt-Erdnuss IgE aufweisen müssen. Serum, mit denen eine Freisetzung von weniger als 30 % im Vergleich zur totalen Lyse der Zellen erreicht wurde, wurden nicht für den Test eingesetzt. Als Kontrolle für die in dieser Arbeit durchgeführten Tests wäre der Einsatz eines Patientenserum interessant gewesen, welches monospezifisch mit Ara h 1 reagiert, das aber leider nicht verfügbar war.

Eine andere Möglichkeit, die biologische Reaktivität von Extrakten zu vergleichen, wäre es, einen Histamin-Freisetzungstest aus basophilen Granulozyten (Kleine-Tebbe 1993) durchzuführen. Das Prinzip beruht ebenfalls auf der Kreuzvernetzung von Patienten-IgE. Diese werden an Basophilen gebunden, die zuvor durch saure Abspaltung von IgE-Antikörpern befreit („gestrippt“) worden sind (Kleine Budde *et al.* 2001). Als Indikator der Reaktivität wird das freigesetzte Histamin gemessen. Der Nachteil bei der Verwendung von Primärzellen besteht darin, dass zum einen ein oder mehrere Spender vorhanden sein müssen und dass diese Zellen nicht standardisiert sind, so dass Ergebnisse nicht gut reproduzierbar sind. Beim direkten Vergleich des RBL- und des Histamin-Release-Tests von Kaul *et al.* (2007) konnten mit beiden Testverfahren die gleichen Ergebnisse erzielt werden, so dass die Argumente für die Verwendung des RBL-Tests sprachen.

#### **4.5.3 Reduzierter Allergengehalt korreliert nicht mit reduzierter Allergenität**

Obwohl die Bali-1 Erdnuss einen verminderten Ara h 1-Gehalt aufwies, konnten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Allergenität im Vergleich zur Standard-Erdnuss ermittelt

werden. Dies konnte an fünf Patientenseren gezeigt werden, die gegen mehrere Erdnussallergene sensibilisiert waren, u.a. gegen die Majorallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3/4. Obwohl dieses Ergebnis recht eindrucksvoll beweist, dass ein reduzierter Allergengehalt nicht unbedingt mit einer reduzierten Allergenität einhergeht, darf dieses Ergebnis nicht leichtfertig verallgemeinert werden. Die Spezifität der IgE-Antikörper verschiedener Individuen zu einzelnen Allergenen muss getrennt betrachtet werden. Seren von Patienten, die hauptsächlich gegen Ara h 1 sensibilisiert sind bzw. viel Ara h 1 spezifisches IgE besitzen, werden vermutlich im RBL-Test eine verminderte Degranulation auslösen. Um eine allgemeine Aussage machen zu können, wäre es notwendig, eine größere Auswahl an Patientenseren zu überprüfen. Außerdem machte die Analyse des Bali-1 Erdnussextraktes in der 2D-DIGE deutlich, dass in der Gegenüberstellung zum Standard-Erdnussextrakt zusätzliche Isoformen von Ara h 3/4 auftreten. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Gesamtallergenität durch die restlichen Allergene kompensiert wird, so dass dadurch das Fehlen eines Allergens die Gesamtreaktivität nicht beeinflusst.

Die für die natürlichen Erdnussorten gefundenen Ergebnisse über die Kompensation einzelner fehlenden Erdnussallergene durch andere Allergene lassen Versuche zur Ausschaltung von Allergenen wenig sinnvoll erscheinen. Da gegenwärtig keine Therapieansätze zur Behandlung von Erdnussallergie verfügbar sind, wird derzeit diese Methode angewendet, um durch Herstellung gentechnischer Knock-out Pflanzen die Expression einzelner Allergene abzuschalten. Ziel ist es, eine hypoallergene Erdnussorte herzustellen, in der sämtliche Allergene, die starke allergische Reaktionen auslösen, eliminiert sind. Dodo *et al.* (2008) reduzierten nachweislich die Expression des Majorallergens Ara h 2 durch RNA-Interferenz- (RNAi-) Technik. Die biologische Reaktivität wurde in dieser Studie nicht mithilfe eines Mediator-Freisetzungstests, sondern im indirekten ELISA an fünf Patientenseren bestimmt. Die transgenen Pflanzen sind in ihrer Allergenität signifikant abgeschwächt, jedoch ist hier keine Information zur Spezifität der Patientenseren zu finden. Die RNAi-Methode wurde ebenfalls angewandt, um Allergene in Reis (Tada *et al.* 1996), Sojabohne (Herman *et al.* 2003), Apfel (Gilissen *et al.* 2005) und Tomate (Lorenz *et al.* 2006) herunterzuregulieren. In diesem Zusammenhang ist die Beantwortung der Frage wichtig, welche Minimalmengen eines Allergens noch in der Lage sind, eine allergische Reaktion auszulösen. Außerdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Allergene in mehreren Isoformen vorkommen, die evtl. durch starke Sequenzunterschiede mit der RNAi-Methode nicht erfasst und ausgeschaltet werden. In der Erdnuss führen vor allem die

Majorallergene zu schweren allergischen Reaktionen. Diese haben einen Anteil an den Gesamtallergenen von 90 % (Boldt 2005). Das Ausschalten dieser Gene könnte zu dem Verlust dieser für die Pflanze wichtigen Samenspeicherproteine führen, so dass kritisch zu beachten ist, ob diese Pflanze zum einen noch lebensfähig ist, und zum anderen, ob der Geschmack nicht beeinflusst wird. Die Anwendung von knock-out Methoden scheint deshalb nur für allergene Lebensmittel sinnvoll zu sein, die allenfalls eine geringe Anzahl verschiedener Allergene besitzen.

#### **4.6 Einsatz von Allergenen in Diagnostik und Therapie**

Die Aufklärung des Allergenrepertoires der Erdnuss bildet die Grundlage zur Weiterentwicklung der Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten. Erst durch die Erforschung und Komplettierung der Allergene kann eine Komponenten-aufgelöste Allergiediagnostik entwickelt werden. Die hier vorliegende Arbeit hat in diesem Zusammenhang die Aufklärung von Ara h 7, Ara h 8, Ara h 9 und des Erdnuss-Oleosins sowohl im natürlichen als auch im rekombinanten Protein vervollständigt. Die Vorteile von rekombinanten Proteinen im Einsatz von Diagnostik und Therapie liegen in einer standardisierten und konstanten Qualität mit hoher Homogenität, welche mit natürlichen Proteinen nicht erreicht werden können. Es ist nahezu unmöglich, sämtliche Allergene der Erdnuss in höchster Reinheit zu gewinnen, eine Restkontamination mit anderen Proteinen und Allergenen kann keinesfalls ausgeschlossen werden. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Konzentration einzelner Proteine. Die in der Erdnuss vorhandenen Proteine, die kleiner als 25 kDa sind, machen nur 10 % der Gesamtallergene aus (Boldt 2005). Das bedeutet, dass eine große Menge an Erdnüssen extrahiert werden müsste, um eine Reinigung im Milligrammmaßstab dieser Proteine zu erreichen. Außerdem ist die Stabilität der Allergene oft nicht gewährleistet, wie z.B. bei dem Ara h 8 homologen Apfelallergen Mal d 1. Rekombinante Proteine können hingegen theoretisch in großen Mengen hergestellt werden. Hierzu muss jedoch für jedes einzelne Protein eine Expressions- und Reinigungsstrategie entwickelt und für einen großen Ansatz optimiert werden. Dabei weisen diese künstlich hergestellten Proteine meistens eine ähnliche Reaktivität in ihrer IgE-Bindung wie die natürlichen Allergene auf. Es ist jedoch unverzichtbar, die rekombinanten Allergene mit ihrem natürlichen Gegenstück zu vergleichen. Nur auf diese Art und Weise kann überprüft werden, ob die strukturellen und damit auch die immunologischen Eigenschaften identisch sind. Dabei spielt im ersten Schritt

die korrekte Faltung der rekombinanten Proteine eine große Rolle, die mit dem natürlichen Allergen abgeglichen werden muss. Während die für eine spezifische Immuntherapie relevanten T-Zell-Epitope linear sind und das Antigen im Zuge der Immunantwort prozessiert wird, ist die korrekte Faltung und Orientierung der konformationellen B-Zell-Epitope für die Diagnostik erforderlich. Weiterhin müssen am natürlichen Protein posttranslationale Modifikationen aufgeklärt werden, die einen starken Einfluss auf die Reaktivität haben können (Nilsen *et al.* 1991). Der Nachteil von rekombinanten Allergenen ist hingegen, dass die verschiedenen Isoformen nicht oder kaum erfasst werden, die in ihrer Vielfalt nur annähernd aus natürlichem Extrakt isoliert werden können. Die Relevanz der Isoformen ist jedoch unklar. Lediglich beim Bet v 1 sind bisher Isoformen beschrieben worden, die nicht IgE-reaktiv sind (Ferreira *et al.* 1996). In ihrer Reaktivität abgeschwächte Isoformen konnten beim Bet v 1 und Cor a 1 nachgewiesen werden (Breiteneder *et al.* 1993, Ferreira *et al.* 1996). Offen bleibt auch die Frage, wie die Bindung von Lipiden an Allergene die Allergenität beeinflusst. Eine solche Adduktbildung wurde am Ara h 8-homologen Birkenpollenallergen Bet v 1 (Mogensen *et al.* 2002, Markovic-Housley *et al.* 2003) und Kirschallergen Pru av 1 (Neudecker *et al.* 2001) gezeigt.

## 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Allergenspektrum der Erdnuss mit Fokus auf die Allergene unter 25 kDa analysiert und charakterisiert. Die vollständige Identifizierung der allergen-wirkenden Proteine sowie die Aufklärung ihrer Funktionen sind die Grundlage zur Optimierung der Diagnostik und zur Entwicklung von Therapieansätzen. Die Wirkung der Allergene ist jedoch nicht isoliert zu sehen, sondern im Kontext ihrer Matrix zu verstehen.

Da bei Untersuchungen am Erdnussallergen Ara h 8 erste Hinweise auf Bildung von Lipidaddukten sichtbar wurden, ist die biologische Funktion dieses Allergens als Lipidcarrier anzunehmen. Gestützt wird diese Theorie durch Studien am Bet v 1 und seiner homologen Proteine, an denen Phytosterol-Addukte nachgewiesen wurden (Neudecker *et al.* 2001, Mogensen *et al.* 2002). Weitere potentielle Kandidaten zur Bindung von Lipiden in der Erdnuss sind das Öltröpfchen-formende Oleosin und das Lipid-Transfer-Protein Ara h 9. In weiterführenden Untersuchungen gilt es, zunächst diese Lipidassoziation an den genannten Proteinen nachzuweisen und die Liganden zu identifizieren. Hierzu würde sich neben den natürlichen Allergenen der Einsatz von rekombinanten Allergenen eignen, die mit verschiedenen Phytosterolen dotiert werden können. Zu klären wäre, ob die Adduktbildung positive Auswirkung auf die Stabilität der Proteine hat, ob die Lipidbindung eine Passage des Allergens durch die Darmschleimhaut ermöglicht bzw. verbessert und wie sich dies auf die Allergenität auswirkt. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten einen bedeutenden Anteil zur Aufklärung der Aufnahme und Wirkungsweise von Allergenen liefern. In der rekombinanten Darstellung der Allergene zum Einsatz in der Diagnostik und Therapie muss der nachzuweisende Einfluss der Lipide auf die Allergenität beachtet werden.

## 6 Zusammenfassung

Unter den Nahrungsmittelallergien führt die Erdnussallergie zu den schwersten akuten Überempfindlichkeitsreaktionen, deren Symptome bis zum tödlich endenden anaphylaktischen Schock reichen können. Bereits geringste Erdnussmengen von 100 µg reichen aus, um Reaktionen auszulösen. Zur Diagnostik werden noch immer Erdnussextrakte für die serologischen Untersuchungen und Hauttests eingesetzt, die bezüglich ihrer Einzelallergene und des Allergengehaltes nicht standardisiert sind und falsche Ergebnisse anzeigen können. Für eine sichere Diagnostik und zur Entwicklung von Therapieansätzen wäre eine Komponenten-aufgelöste Diagnostik hilfreich, um die unterschiedlichen Reaktionsmuster der sensibilisierten Patienten zu bestimmen (Allergogramm) und daraus maßgeschneiderte Behandlungen ableiten zu können. Daher ist es erforderlich, die einzelnen Allergene der Erdnuss zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Hinblick auf die Standardisierung müssen die Allergene rekombinant hergestellt und mit den isolierten natürlichen Allergenen als authentische Referenz abgeglichen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Allergenspektrum der Erdnuss mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden näher analysiert. Dabei lag der Fokus auf den bisher wenig charakterisierten Komponenten im Bereich unter 25 kDa. Nur auf Genomenebene waren bisher das zum wichtigen Birkenpollenallergen Bet v 1 kreuzreaktive Ara h 8 und das noch uncharakterisierte Speicherprotein der Erdnuss Ara h 7 beschrieben worden. Mit Hilfe von Klonierungsstrategien konnten neue allergene Isoformen identifiziert und deren Pendant im natürlichen Extrakt detektiert werden. Das Strukturprotein Oleosin, das eine wichtige Funktion bei der Lipidspeicherung ausübt, konnte aus Erdnussextrakt isoliert und als IgE-reaktives Protein eingestuft werden. Durch Modifizierung der Sequenz gelang es, dieses sonst schwer lösliche Protein zu solubilisieren, so dass es für weitere Untersuchungen einsetzbar war. Lipidtransferproteine, die im Pfirsich schwere anaphylaktische Reaktionen auslösen können, konnten erstmals auch in der Erdnuss nachgewiesen werden. Die Analyse ihrer IgE-Prävalenz deutet zwar für Erdnussallergiker auf eine eher untergeordnete Rolle hin, jedoch zeigen Pfirsichallergiker starke Kreuzreaktivitäten zum Erdnuss-Lipidtransferprotein, wodurch die Erdnuss für diese Patientengruppe auf eine neue Allergenquelle hindeuten kann. Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit das LTP als neues Erdnussallergen Ara h 9 klassifiziert und strukturell stark unterschiedliche Isoformen für dieses Protein (Ara h 9.0101 und Ara h 9.0201), wie auch für Ara h 8 (Ara h 8.0201) und Ara h 7 (Ara h 7.0201) identifiziert. Neben der erfolgreichen rekombinanten Darstellung der untersuchten Proteine ist

es gelungen, Ara h 8 und Oleosin aus Erdnussextrakt zu isolieren. Durch den Nachweis von natürlichem Ara h 7 und Ara h 9 ist der erste wichtige Schritt erreicht worden, auch diese Allergene als authentische Referenzmoleküle zu erhalten.

Um die Variabilität der Allergene in verschiedenen Erdnussvarietäten abschätzen zu können, wurde ein Sortenvergleich durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in indonesischen Erdnüssen das Majorallergen Ara h 1 fehlte, das zusammen mit Ara h 3/4 90 % der Allergene in der Standard-Erdnuss ausmacht. Da zurzeit versucht wird, hypoallergene bzw. Allergen-defiziente Erdnüsse durch Knock-out Strategien herzustellen, ist die hier natürlicherweise vorkommende, im Majorallergen reduzierte Erdnussvarietät ein interessantes Studienobjekt. Der funktionelle Mediator-Freisetzungstest (RBL-Test) zeigte jedoch für diese Sorte keine verminderte biologische Reaktivität.

Die neu identifizierten und charakterisierten Allergene bzw. Isoformen komplettieren das Allergenspektrum der Erdnuss. Damit stellt die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag für die zurzeit angestrebte Komponenten-aufgelöste Allergiediagnostik dar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines Majorallergens nicht zwangsläufig zu einer niedrigen Allergenpotenz führen muss. Dies lässt die Herstellung von hypoallergenen Nahrungsmitteln, die mehrere Allergene enthalten, kritisch erscheinen.

## 7 Summary

Peanut allergy is one of the most life-threatening food allergies and can cause anaphylactic shock reactions. As little as 100 µg peanut protein can provoke symptoms in peanut allergic patients. The diagnosis still relies on peanut extracts for serological analysis and skin prick tests which are not standardized as regards single allergens and the allergen content and therefore can lead in false results. For a reliable diagnosis and for establishing therapy approaches a component-resolved diagnosis is helpful to determine the patients' sensitization pattern (allergogram). Therefore, there is the need to identify and to characterize the single peanut allergens. With regard to the standardization, the allergens must be produced in recombinant form and must adjust to the isolated natural allergens which represent an excellent authentic reference.

In this thesis the allergen spectrum of peanut was analyzed by molecular and protein biochemical methods. The focus was on the less characterized components in the range below 25 kDa. Up till now, to the major birch pollen allergen Bet v 1 cross reactive Ara h 8 and the still uncharacterized seed storage protein Ara h 7 were described only on genomic level. Using appropriate cloning strategies, new allergenic isoforms could be identified and their counterparts detected in natural extract. The protein oleosin, which is involved in the lipid storage, could be isolated from peanut extract and classified as IgE-reactive protein. The solubilisation of this otherwise strong hydrophobic protein was achieved by sequence modification which eliminates the hydrophobic part of this molecule. It is well documented that in peaches severe anaphylactic reactions are caused by lipid transfer proteins. For the first time, the homologue LTP was also detected in peanuts. The IgE reactivity to peanut LTP is lesser pronounced in peanut allergic patients; however patients allergic to peach show strong cross reactivity to the peanut lipid transfer protein, identifying the peanut as new allergen source for this group. Overall, the lipid transfer protein was classified as new peanut allergen Ara h 9 and two structurally varying isoforms for this protein (Ara h 9.0101 and Ara h 9.0201) were documented. Similarly novel isoforms of Ara h 8 (Ara h 8.0201) and Ara h 7 (Ara h 7.0201) were identified. Beside the successful recombinant expression of the studied proteins, the isolation of Ara h 8 and Oleosin from peanut extract was achieved. By the detection of natural Ara h 7 and Ara h 9 the first step was reached to establish these allergens as authentic reference molecules.

To evaluate the variability of allergens in different peanut varieties, a comparison of cultivars was performed. It could be shown that in Indonesian peanuts the major allergen Ara h 1 was missing, which represents with Ara h 3/4 90 % of allergens in the standard peanut. Due to the approach to create hypoallergenic or allergen deficient peanuts by knock-out strategies, this natural peanut variety, which is deficient in the major allergen, is an interesting object of study. However, the functional mediator release assay (RBL-assay) did not outline a reduced biological activity.

The new identified and characterized allergens and isoforms, respectively, are complementing the allergen spectrum of peanuts. For this reason, this thesis represents an important contribution to the current aim of a component-resolved allergy diagnostic. Furthermore it could be demonstrated, that the loss of a major allergen does not necessarily lead to lower allergen potency. Thus, the establishing of hypoallergenic food, comprising several allergens, must be viewed critically.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahrazem, O., Ibanez, M. D., Lopez-Torrejón, G., Sanchez-Monge, R., Sastre, J., Lombardero, M., Barber, D. und Salcedo, G. (2005). Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 137: 201-210.
- Akkerdaas, J. H., Schocker, F., Vieths, S., Versteeg, S., Zuidmeer, L., Hefle, S. L., Aalberse, R. C., Richter, K., Ferreira, F. und Van Ree, R. (2006). Cloning of oleosin, a putative new hazelnut allergen, using a hazelnut cDNA library. *Mol.Nutr.Food Res.* 50: 18-23.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., De Vries, S. C., Gautier, M. F., Ciurana, C. L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J. H., Bulder, I., Aalberse, R. C. und Van Ree, R. (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.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Caldironi, G., Barocci, F. und Van Ree, R. (2002). Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy.* 57: 900-906.
- Astier, C., Morisset, M., Roitel, O., Codreanu, F., Jacquenet, S., Franck, P., Ogier, V., Petit, N., Proust, B., Moneret-Vautrin, D. A., Burks, A. W., Bihain, B., Sampson, H. A. und Kanny, G. (2006). Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 118: 250-256.
- Bachert, C., Kardoff, B. und Virchow, C. (2001). Allergische Erkrankungen in der Praxis. Uni-Med Verlag 2001 Bremen.
- Ballmer-Weber, B. K., Scheurer, S., Fritsche, P., Enrique, E., Cistero-Bahima, A., Haase, T. und Wuthrich, B. (2002). Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110: 167-173.
- Bantignies, B., Seguin, J., Muzac, I., Dedaldechamp, F., Gulick, P. und Ibrahim, R. (2000). Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol.Biol.* 42: 871-881.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Boldt, A., Fortunato, D., Conti, A., Petersen, A., Ballmer-Weber, B., Lepp, U., Reese, G. und Becker, W. M. (2005). Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. *Proteomics.* 5: 675-686.
- Boldt, A. (2005). Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihrer Isoformen. Dissertation, Universität Lübeck.

- Bollen, M. A., Garcia, A., Cordewener, J. H., Wichers, H. J., Helsper, J. P., Savelkoul, H. F. und Van Boekel, M. A.** (2007). Purification and characterization of natural Bet v 1 from birch pollen and related allergens from carrot and celery. *Mol.Nutr. Food Res.* 51: 1527-1536.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
- Breiteneder, H., Ferreira, F., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D. und Scheiner, O.** (1993). Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. *Eur.J.Biochem* 212: 355-362.
- Breiteneder, H. und Mills, E. N.** (2005). Molecular properties of food allergens. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115: 14-23.
- Breiteneder, H. und Radauer, C.** (2004). A classification of plant food allergens. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113: 821-830.
- Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M. und Becker, W. M.** (1996). The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta.* 199: 413-415.
- Burks, A. W., Cockrell, G., Connaughton, C., Guin, J., Allen, W. und Helm, R. M.** (1994). Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 105: 143-149.
- Burks, A. W., Cockrell, G., Stanley, J. S., Helm, R. M. und Bannon, G. A.** (1995). Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J.Clin.Invest.* 96: 1715-1721.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'brien, T. J. und Helm, R. M.** (1992). Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J.Allergy Clin.Immunol.* 90: 962-969.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G. und O'brien, T.** (1991). Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J.Allergy Clin.Immunol.* 88: 172-179.
- Buschmann, L., Petersen, A., Schlaak, M. und Becker, W. M.** (1996). Reinvestigation of the major peanut allergen Ara h 1 on molecular level. *Monogr.Allergy* 32: 92-98.
- Chadha, P. und Das, R. H.** (2006). A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta.* 225: 213-222.
- Chatel, J. M., Bernard, H. und Orson, F. M.** (2003). Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 131: 14-18.
- Chen, J. C., Lin, R. H., Huang, H. C. und Tzen, J. T.** (1997). Cloning, expression and isoform classification of a minor oleosin in sesame oil bodies. *J.Biochem.* 122: 819-824.

- Chiang, W. C., Kidon, M. I., Liew, W. K., Goh, A., Tang, J. P. und Chay, O. M.** (2007). The changing face of food hypersensitivity in an Asian community. *Clin.Exp.Allergy*. 37: 1055-1061.
- Clement, G., Boquet, D., Mondoulet, L., Lamourette, P., Bernard, H. und Wal, J. M.** (2005). Expression in *Escherichia coli* and disulfide bridge mapping of PSC33, an allergenic 2S albumin from peanut. *Protein Expr.Purif.* 44: 110-120.
- Csank, C., Taylor, F. M. und Martindale, D. W.** (1990). Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 18: 5133-5141.
- Coombs, R. R. A. und Gell, P. G. H.** (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In: "Clinical aspects of immunology". 2. Auflage. Gell, P. G. H. und Coombs, R. R. A. Oxford, UK.
- Csank, C., Taylor, F. M. und Martindale, D. W.** (1990). Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 18: 5133-5141.
- Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Garcia-Selles, F. J., Barber, D. und Salcedo, G.** (2002). 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.
- Dodo, H. W., Konan, K. N., Chen, F. C., Egnin, M. und Viquez, O. M.** (2008). Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. *Plant Biotechnol.J.* 6: 135-145.
- Elsayed, S. und Vik, H.** (1990). Purification and N-terminal amino acid sequence of two birch pollen isoallergens (Bet v I and Bet v II). *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 93: 378-384.
- Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S. und Boger, J.** (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J.Virol.* 55: 836-839.
- Fernandez-Rivas, M., Bolhaar, S., Gonzalez-Mancebo, E., Asero, R., Van Leeuwen, A., Bohle, B., Ma, Y., Ebner, C., Rigby, N., Sancho, A. I., Miles, S., Zuidmeer, L., Knulst, A., Breiteneder, H., Mills, C., Hoffmann-Sommergruber, K. und Van Ree, R.** (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.
- Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H. J. und Ebner, C.** (1996). Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J.Exp.Med.* 183: 599-609.
- Ferreira, F., Hirthenlehner, K., Briza, P., Breiteneder, H., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M. und Ebner, C.** (1997). Isoforms of atopic allergens with reduced allergenicity but conserved T cell antigenicity: possible use for specific immunotherapy. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 113: 125-127.

- Fleischer, D. M., Conover-Walker, M. K., Christie, L., Burks, A. W. und Wood, R. A.** (2003). The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112: 183-189.
- Gao, Z. S., Van De Weg, W. E., Schaart, J. G., Schouten, H. J., Tran, D. H., Kodde, L. P., Van Der Meer, I. M., Van Der Geest, A. H., Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D. und Gilissen, L. J.** (2005). Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor.Appl.Genet.* 111: 171-183.
- Gilissen, L. J., Bolhaar, S. T., Matos, C. I., Rouwendal, G. J., Boone, M. J., Krens, F. A., Zuidmeer, L., Van Leeuwen, A., Akkerdaas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A. C., Bosch, D., Van De Weg, W. E. und Van Ree, R.** (2005). Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J. Allergy Clin.Immunol.* 115: 364-369.
- Goodall, G. J. und Filipowicz, W.** (1989). The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell.* 58: 473-483.
- Gruber, P., Becker, W. M. und Hofmann, T.** (2005). Influence of the maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *J.Agric.Food Chem.* 53: 2289-2296.
- Gruber, P., Suhr, M., Frey, A., Becker, W. M. und Hofmann, T.** (2004). Development of an epitope-specific analytical tool for the major peanut allergen Ara h 2 using a high-density multiple-antigenic peptide strategy. *Mol.Nutr.Food Res.* 48: 449-458.
- Grundy, J., Matthews, S., Bateman, B., Dean, T. und Arshad, S. H.** (2002). Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110: 784-789.
- Hancock, K. und Tsang, V. C.** (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal.Biochem.* 133: 157-162.
- Herman, E. M., Helm, R. M., Jung, R. und Kinney, A. J.** (2003). Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* 132: 36-43.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Susani, M., Ferreira, F., Jertschin, P., Ahorn, H., Steiner, R., Kraft, D., Scheiner, O. und Breiteneder, H.** (1997). High-level expression and purification of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Protein Expr.Purif.* 9: 33-39.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Vanek-Krebitz, M., Radauer, C., Wen, J., Ferreira, F., Scheiner, O. und Breiteneder, H.** (1997). Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene.* 197: 91-100.
- Holmgren, A.** (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264: 13963-13966.
- Hourihane, J. B., Kilburn, S. A., Nordlee, J. A., Hefle, S. L., Taylor, S. L. und Warner, J. O.** (1997). An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J.Allergy Clin.Immunol.* 100: 596-600.

- Huang, A. H.** (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110: 1055-1061.
- Ikemura, T.** (1981). Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system. *J.Mol.Biol.* 151: 389-409.
- Jain, S., Srivastava, S., Sarin, N. B. und Kav, N. N.** (2006). Proteomics reveals elevated levels of PR 10 proteins in saline-tolerant peanut (Arachis hypogaea) calli. *Plant.Physiol.Biochem.* 44: 253-259.
- Jameson, B. A. und Wolf, H.** (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput.Appl.Biosci.* 4: 181-186.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M.** (2002). Immunologie. 5. Auflage. Spektrum Verlag. Heidelberg.
- Jarolim, E., Tejkl, M., Rohac, M., Schlerka, G., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M. und Rumpold, H.** (1989). Monoclonal antibodies against birch pollen allergens: characterization by immunoblotting and use for single-step affinity purification of the major allergen Bet v I. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 90: 54-60.
- Kaul, S., Luttkopf, D., Kastner, B., Vogel, L., Holtz, G., Vieths, S. und Hoffmann, A.** (2007). Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization. *Clin.Exp.Allergy.* 37: 141-150.
- Kav, N. N. V., Srivastava, S., Goonewardene, L. und Blade, S. F.** (2004). Proteome-level changes in the roots of Pisum sativum in response to salinity. *Ann.Appl.Biol.* 145: 217-230.
- Kinet, J. P.** (1999). The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu.Rev.Immunol.* 17: 931-972.
- Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M. und Becker, W. M.** (1999). Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 119: 265-274.
- Kleber-Janke, T. und Becker, W. M.** (2000). Use of modified BL21(DE3) Escherichia coli cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr.Purif.* 19: 419-424.
- Kleine Budde, I., De Heer, P. G., Van Der Zee, J. S. und Aalberse, R. C.** (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.** (1993). Basophil histamine release by freshly prepared food extracts. *Allergy Proc.* 14: 255-258.
- Ko, C. H., Brendel, V., Taylor, R. D. und Walbot, V.** (1998). U-richness is a defining feature of plant introns and may function as an intron recognition signal in maize. *Plant Mol.Biol.* 36: 573-583.
- Koolman J. und Röhm K.-H.** (1998). Taschenatlas der Biochemie. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Koppelman, S. J., Vlooswijk, R. A., Knippels, L. M., Hessing, M., Knol, E. F., Van Reijssen, F. C. und Bruijnzeel-Koomen, C. A.** (2001). Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*. 56: 132-137.
- Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Mifflin, B. J. und Shewry, P. R.** (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J.Mol.Biol.* 183: 499-502.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods*. 10: 203-209.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157: 105-132.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Larsen, J. N., Stroman, P. und Ipsen, H.** (1992). PCR based cloning and sequencing of isoforms encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carpinus betulus*, hornbeam. *Mol.Immunol.* 29: 703-711.
- Latendorf, T.** (2007). Proteom - Analyse von Allergenen unterschiedlicher Erdnussvarietäten, Diplomarbeit, Universität Kiel.
- Leary, J. J., Brigati, D. J. und Ward, D. C.** (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A* 80: 4045-4049.
- Leduc, V., Moneret-Vautrin, D. A., Tzen, J. T., Morisset, M., Guerin, L. und Kanny, G.** (2006). Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy*. 61: 349-356.
- Lehmann, K., Hoffmann, S., Neudecker, P., Suhr, M., Becker, W. M. und Rosch, P.** (2003). High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr.Purif.* 31: 250-259.
- Leung, D. Y., Sampson, H. A., Yunginger, J. W., Burks, A. W., Jr., Schneider, L. C., Wortel, C. H., Davis, F. M., Hyun, J. D. und Shanahan, W. R., Jr.** (2003). Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N.Engl.J.Med.* 348: 986-993.
- Li, M., Keddie, J. S., Smith, L. J., Clark, D. C. und Murphy, D. J.** (1993). Expression and characterization of the N-terminal domain of an oleosin protein from sunflower. *J.Biol.Chem.* 268: 17504-17512.
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A. K. M. und Yu, X.** (2003). Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening. *Physiol.Plant.* 119: 544-553.

- Lombardero, M., Garcia-Selles, F. J., Polo, F., Jimeno, L., Chamorro, M. J., Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Diaz-Perales, A., Salcedo, G. und Barber, D.** (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.
- Lorenz, Y., Enrique, E., Lequynh, L., Fotisch, K., Retzek, M., Biemelt, S., Sonnewald, U., Vieths, S. und Scheurer, S.** (2006). Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *J.Allergy Clin.Immunol.* 118: 711-718.
- Lorkovic, Z. J., Wiczorek Kirk, D. A., Lambermon, M. H. und Filipowicz, W.** (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant.Sci.* 5: 160-167.
- Maguire, L. S., O'sullivan, S. M., Galvin, K., O'connor, T. P. und O'brien, N. M.** (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int.J.Food Sci.Nutr.* 55: 171-178.
- Maid, B.** (1998). Ara h 1: Klonierung in *Pichia pastoris* und in vitro Untersuchungen unter gastrointestinalen Bedingungen. Dissertation, Universität Marburg.
- Maleki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. T. und Raufman, J. P.** (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J.Allergy Clin.Immunol.* 106: 763-768.
- Maleki, S. J., Viquez, O., Jacks, T., Dodo, H., Champagne, E. T., Chung, S. Y. und Landry, S. J.** (2003). The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112: 190-195.
- Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O. und Breiteneder, H.** (2003). Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J.Mol.Biol.* 325: 123-133.
- McCullough, A. J. und Schuler, M. A.** (1997). Intronic and exonic sequences modulate 5' splice site selection in plant nuclei. *Nucleic Acids Res.* 25: 1071-1077.
- Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B. K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W. M., Koppelman, S. J., Knulst, A. C., Helbling, A., Hefle, S. L., Van Ree, R. und Vieths, S.** (2004). Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 114: 1410-1417.
- Mittag, D., Vieths, S., Vogel, L., Becker, W. M., Rihs, H. P., Helbling, A., Wuthrich, B. und Ballmer-Weber, B. K.** (2004). Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113: 148-154.
- Mittag, D., Vieths, S., Vogel, L., Wagner-Loew, D., Starke, A., Hunziker, P., Becker, W. M. und Ballmer-Weber, B. K.** (2005). Birch pollen-related food allergy to legumes: identification and characterization of the Bet v 1 homologue in mungbean (*Vigna radiata*), Vig r 1. *Clin.Exp.Allergy*. 35: 1049-1055.

- Mogensen, J. E., Wimmer, R., Larsen, J. N., Spangfort, M. D. und Otzen, D. E.** (2002). The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J.Biol.Chem.* 277: 23684-23692.
- Mogensen, J. E., Ferreras, M., Wimmer, R., Petersen, S. V., Enghild, J. J. und Otzen, D. E.** (2007). The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes. *Biochemistry.* 46: 3356-3365.
- Moiseyev, G. P., Beintema, J. J., Fedoreyeva, L. I. und Yakovlev, G. I.** (1994). High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta.* 193: 470-472.
- Musidlowska-Persson, A., Alm, R. und Emanuelsson, C.** (2007). Cloning and sequencing of the Bet v 1-homologous allergen Fra a 1 in strawberry (*Fragaria ananassa*) shows the presence of an intron and little variability in amino acid sequence. *Mol.Immunol.* 44: 1245-1252.
- Nelson, H. S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A. und Leung, D.** (1997). Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J.Allergy Clin.Immunol.* 99: 744-751.
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H. und Rosch, P.** (2001). Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J.Biol.Chem.* 276: 22756-22763.
- Nilsen, B. M., Sletten, K., Paulsen, B. S., O'neill, M. und Van Halbeek, H.** (1991). Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from the pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.). *J.Biol.Chem.* 266: 2660-2668.
- Nogueira, M. C., Mcdonald, R., Westphal, C., Maleki, S. J. und Yeung, J. M.** (2004). Can commercial peanut assay kits detect peanut allergens? *JAOAC Int.* 87: 1480-1484.
- Olszewski, A., Pons, L., Moutete, F., Aimone-Gastin, I., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A. und Gueant, J. L.** (1998). Isolation and characterization of proteic allergens in refined peanut oil. *Clin.Exp.Allergy* 28: 850-859.
- Oppenheimer, J. J., Nelson, H. S., Bock, S. A., Christensen, F. und Leung, D. Y.** (1992). Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 90: 256-262.
- Palmer, G. W., Dibbern, D. A., Jr., Burks, A. W., Bannon, G. A., Bock, S. A., Porterfield, H. S., Mcdermott, R. A. und Dreskin, S. C.** (2005). Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clin.Immunol.* 115: 302-312.
- Park, C. J., Kim, K. J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y. C. und Paek, K. H.** (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.* 37: 186-198.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M., Monza, M., Baroglio, C., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C. und Conti, A.** (1999). The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J.Allergy Clin.Immunol.* 103: 520-526.

- Pastorello, E. A., D'ambrosio, F. P., Pravettoni, V., Farioli, L., Giuffrida, G., Monza, M., Ansaloni, R., Fortunato, D., Scibola, E., Rivolta, F., Incorvaia, C., Bengtsson, A., Conti, A. und Ortolani, C.** (2000). Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105: 371-377.
- Pastorello, E. A., Pompei, C., Pravettoni, V., Brenna, O., Farioli, L., Trambaioli, C. und Conti, A.** (2001). Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy.* 56 Suppl 67: 45-47.
- Patriarca, G., Nucera, E., Pollastrini, E., De Pasquale, T., Lombardo, C., Buonomo, A., Roncallo, C., Pecora, V., Musumeci, S., Altomonte, G., Alonzi, C., Schiavino, D. und Gasbarrini, G.** (2006). Oral rush desensitization in peanut allergy: a case report. *Dig.Dis.Sci.* 51: 471-473.
- Peng, C. C., Lee, V. S., Lin, M. Y., Huang, H. Y. und Tzen, J. T.** (2007). Minimizing the Central Hydrophobic Domain in Oleosin for the Constitution of Artificial Oil Bodies. *J.Agric.Food Chem.* 55: 5604-5610.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. und Cottrell, J. S.** (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 20: 3551-3567.
- Pomés, A., Helm, R. M., Bannon, G. A., Burks, A. W., Tsay, A. und Chapman, M. D.** (2003). Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111: 640-645.
- Pons, L., Chery, C., Mrabet, N., Schohn, H., Lopicque, F. und Gueant, J. L.** (2005). Purification and cloning of two high molecular mass isoforms of peanut seed oleosin encoded by cDNAs of equal sizes. *Plant Physiol.Biochem.* 43: 659-668.
- Pons, L., Chery, C., Romano, A., Namour, F., Artesani, M. C. und Gueant, J. L.** (2002). The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy.* 57 Suppl 72: 88-93.
- Pons, L., Olszewski, A. und Gueant, J. L.** (1998). Characterization of the oligomeric behavior of a 16.5 kDa peanut oleosin by chromatography and electrophoresis of the iodinated form. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 706: 131-140.
- Rabjohn, P., Helm, E. M., Stanley, J. S., West, C. M., Sampson, H. A., Burks, A. W. und Bannon, G. A.** (1999). Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J.Clin.Invest.* 103: 535-542.
- Rammensee, H. G., Falk, K. und Rotzschke, O.** (1993). MHC molecules as peptide receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 5: 35-44.
- Reuter, A., Fortunato, D., Garoffo, L. P., Napolitano, L., Scheurer, S., Giuffrida, M. G., Vieths, S. und Conti, A.** (2005). Novel isoforms of Pru av 1 with diverging immunoglobulin E binding properties identified by a synergistic combination of molecular biology and proteomics. *Proteomics.* 5: 282-289.

- Reuter, A., Lidholm, J., Andersson, K., Ostling, J., Lundberg, M., Scheurer, S., Enrique, E., Cistero-Bahima, A., San Miguel-Moncin, M., Ballmer-Weber, B. K. und Vieths, S.** (2006). A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin.Exp.Allergy*. 36: 815-823.
- Riecken, S., Lindner, B., Petersen, A., Jappe, U. und Becker, W. M.** (2008). Purification and characterization of natural Ara h 8, the Bet v 1 homologous allergen from peanut, provides a novel isoform. *Biol.Chem. (im Druck, Epub 21. Jan. 2008)*.
- Ring, J. und Darsow, U.** (2002). Idiopathic anaphylaxis. *Curr.Allergy Asthma Rep.* 2: 40-45.
- Ring, J., Kramer, U., Schafer, T. und Behrendt, H.** (2001). Why are allergies increasing? *Curr.Opin.Immunol.* 13: 701-708.
- Roitt, I. M., Brostoff, J. und Male, D. K.** (2001). Immunology, 6. Auflage. Mosby-Wolfe. London, UK.
- Roux, E., Baumberger, S., Axelos, M. A. und Chardot, T.** (2004). Oleosins of *Arabidopsis thaliana*: expression in *Escherichia coli*, purification, and functional properties. *J.Agric.Food Chem.* 52: 5245-5249.
- Sachs, M. I., Jones, R. T. und Yunginger, J. W.** (1981). Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. *J.Allergy Clin.Immunol.* 67: 27-34.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sampson, H. A.** (2004). Update on food allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113: 805-819.
- Sanchez-Monge, R., Lombardero, M., Garcia-Selles, F. J., Barber, D. und Salcedo, G.** (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 103: 514-519.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. und Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem.Sci.* 15: 430-434.
- Schenk, M. F., Gilissen, L. J., Esselink, G. D. und Smulders, M. J.** (2006). Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen. *BMC Genomics.* 7: 168-182.
- Scheurer, S., Pastorello, E. A., Wangorsch, A., Kastner, M., Haustein, D. und Vieths, S.** (2001). 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.
- Schocker, F., Luttkopf, D., Scheurer, S., Petersen, A., Cistero-Bahima, A., Enrique, E., Miguel-Moncin, M., Akkerdaas, J., Van Ree, R., Vieths, S. und Becker, W. M.** (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, P. R., Jenkins, J., Beaudoin, F. und Mills, C.** (2006). Plant protein families as a basis for predicting the allergenicity of food proteins. In: Allergy Matters: New Approaches to Allergy Prevention and Management. Gilissen, L. J. E. J., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F. J. und Bogers, R. J. Springer. Dordrecht. 39-44.

- Shewry, P. R., Napier, J. A. und Tatham, A. S.** (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*. 7: 945-956.
- Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A. und Sampson, H. A.** (2003). Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit telephone survey: a 5-year follow-up study. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112: 1203-1207.
- Skolnick, H. S., Conover-Walker, M. K., Koerner, C. B., Sampson, H. A., Burks, W. und Wood, R. A.** (2001). The natural history of peanut allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 107: 367-374.
- Stanley, J. S., King, N., Burks, A. W., Huang, S. K., Sampson, H., Cockrell, G., Helm, R. M., West, C. M. und Bannon, G. A.** (1997). Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Arch.Biochem.Biophys.* 342: 244-253.
- Suhr, M., Wicklein, D., Lepp, U. und Becker, W. M.** (2004). Isolation and characterization of natural Ara h 6: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol.Nutr.Food Res.* 48: 390-399.
- Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E. und Schmid, E.** (1995). Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J.Biol.Chem.* 270: 2607-2613.
- Tada, Y., Nakase, M., Adachi, T., Nakamura, R., Shimada, H., Takahashi, M., Fujimura, T. und Matsuda, T.** (1996). Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett.* 391: 341-345.
- Tam, J. P.** (1988). Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5409-5413.
- Tzen, J. T., Peng, C. C., Cheng, D. J., Chen, E. C. und Chiu, J. M.** (1997). A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. *J.Biochem.* 121: 762-768.
- Uhlemann, L.** (1991). Identifizierung und Charakterisierung von Erdnußallergenen mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern. Dissertation, Universität Kiel.
- van Loon, L. C. und van Strien, E. A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Viquez, O. M., Konan, K. N. und Dodo, H. W.** (2003). Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1. *Mol.Immunol.* 40: 565-571.
- Viquez, O. M., Konan, K. N. und Dodo, H. W.** (2004). Genomic organization of peanut allergen gene, Ara h 3. *Mol.Immunol.* 41: 1235-1240.
- Vogel, L., Luttkopf, D., Hatahet, L., Haustein, D. und Vieths, S.** (2005). Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. *Allergy.* 60: 1021-1028.

**von Pirquet, C.** (1906). Allergie. *Münch.Med.Wschr.* 30: 1457-1458.

**Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Susani, M., Akdis, M., Kussebi, F., Akdis, C. A., Blaser, K., Hufnagl, P., Binder, B. R., Politou, A., Pastore, A., Vangelista, L., Sperr, W. R., Semper, H., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D. und Valenta, R.** (2001). Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. *FASEB J.* 15: 2045-2047.

**Wang, L.** (2004). Properties of soybean oil bodies and Oleosin proteins as edible films and coatings. Dissertation. Purdue University, West Lafayette.

**Westphal, C. D., Pereira, M. R., Raybourne, R. B. und Williams, K. M.** (2004). Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and nonallergenic proteins in food. *JAOAC Int.* 87: 1458-1465.

**Yen, Y. und Green, P. J.** (1991). Identification and Properties of the Major Ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 97: 1487-1493.

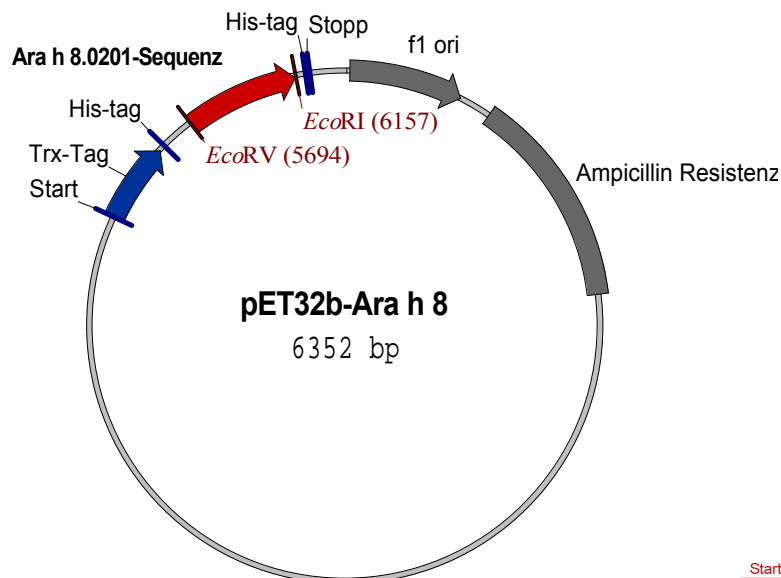
**Zuidmeer, L., Salentijn, E., Rivas, M. F., Mancebo, E. G., Asero, R., Matos, C. I., Pelgrom, K. T., Gilissen, L. J. und van Ree, R.** (2006). The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clin.Exp.Allergy.* 36: 666-675.

**Zuidmeer, L., van Leeuwen, W. A., Budde, I. K., Cornelissen, J., Bulder, I., Rafalska, I., Besoli, N. T., Akkerdaas, J. H., Asero, R., Fernandez Rivas, M., Gonzalez Mancebo, E. und van Ree, R.** (2005). Lipid transfer proteins from fruit: cloning, expression and quantification. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 137: 273-281.

**Zuidmeer, L. und van Ree, R.** (2007). Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 7: 269-273.

## 9 Anhang

### a) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET32b-Ara h 8.0201



```

+1
5161 TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG AGC GAT AAA
+1 I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I
5221 ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG GCG ATC
+1 L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D
5281 CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT
+1 E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D Q N
5341 GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC
+1 P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N
5401 CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG TTT AAA AAC
+1 G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L
5461 GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC

+1
5521 D A N L A G S G S G H M H H H H H H S S
+1 GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT TCT TCT
+1 G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q
5581 GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG

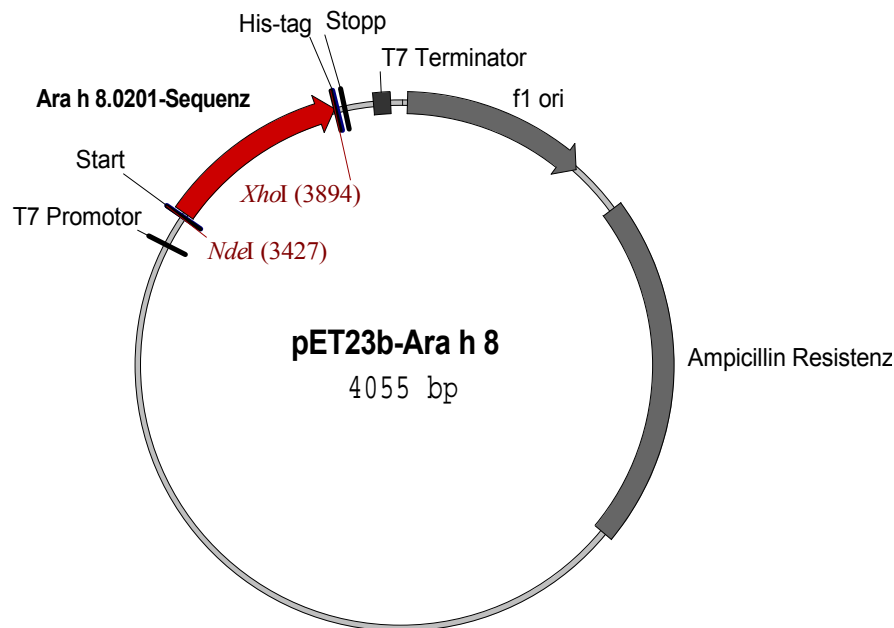
+1
5641 H M D S P D L G T D D D D K A M A I S G
+1 CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC AAG GCC ATG GCG ATA TCG GGT
+1 V H T F E E E S T S P V P P A K L F K A
5701 GTT CAC ACT TTT GAA GAG GAG TCA ACC TCA CCG GTG CCT CCA GCA AAA CTA TTC AAA GCC
+1 T V V D G D E L T P K L I P A I Q S I E
5761 ACC GTG GTA GAC GGC GAT GAA CTC ACC CCA AAG CTG ATT CCG GCA ATC CAG AGT ATT GAG
+1 I V E G N G G P G T V K K V T A V E D G
5821 ATC GTT GAA GGA AAC GGA GGC CCT GGA ACT GTC AAG AAG GTT ACC GCT GTT GAA GAT GGG
+1 K T S Y V L H K I D A I D E A T Y T Y D
5881 AAA ACT AGT TAT GTG CTA CAC AAG ATT GAT GCA ATT GAT GAG GCT ACC TAC ACA TAT GAC
+1 Y T I S G G T G F Q E I L E K V S F K T
5941 TAC ACA ATA TCC GGA GGA ACA GGG TTC CAA GAG ATC TTA GAG AAA GTT TCA TTC AAG ACA
+1 K L E A A D G G S K I K V S V T F H T K
6001 AAG CTT GAG GCT GCT GAT GGT GGA TCC AAA ATC AAG GTC TCT GTT ACA TTC CAC ACC AAG
+1 G D A P L P D E V H Q D V K Q K S Q G I
6061 GGT GAT GCT CCT CTC CCT GAT GAA GTT CAT CAA GAT GTC AAA CAA AAG AGC CAA GGA ATC

+1
6121 F K A I E G Y V L S N G N S S S V D K L
+1 TTC AAG GCT ATT GAG GGT TAT GTT TTG TCC AAC GGG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT

+1
6181 A A A L E H H H H H H *
+1 GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA

```

## b) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET23b-Ara h 8.0201 (Genart)



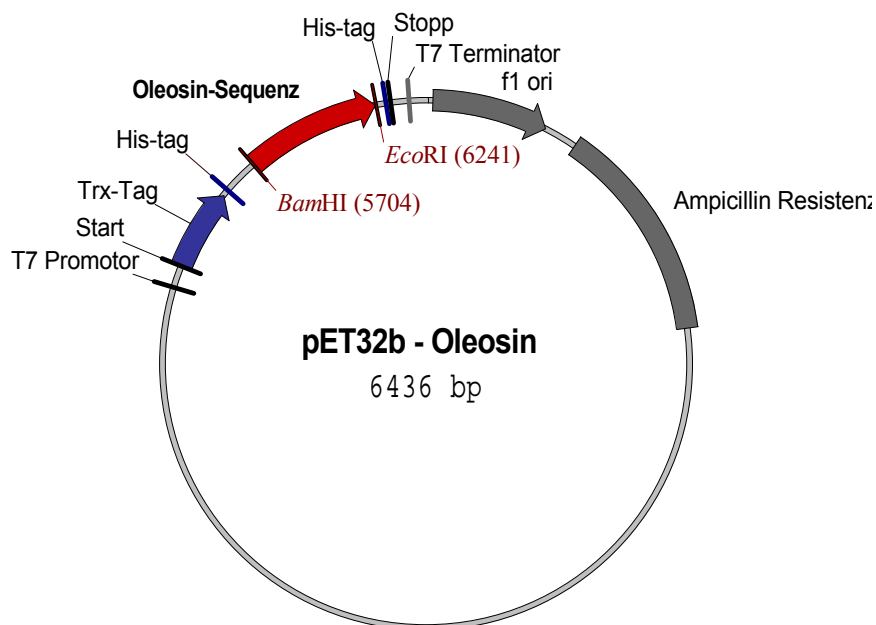
Start  
NdeI

```

+2 M A S G V H T F E E E S T S P V P P
3421 TAT ACA TAT GGC TAG CGG CGT GCA TAC CTT TGA AGA AGA AAG CAC CAG CCC GGT GCC GCC
+2 P A K L F K A T V V D G D E L T P K L I P
3481 GGC AAA ACT GTT TAA AGC GAC CGT GGT GGA TGG CGA TGA ACT GAC CCC GAA ACT GAT TCC
+2 P A I Q S I E I V E G N G G P G T V K K V
3541 GGC GAT TCA GAG CAT TGA AAT TGT GGA AGG CAA CGG CGG TCC GGG CAC CGT GAA AAA AGT
+2 V T A V E D G K T S Y V L H K I D A I D E
3601 GAC CGC GGT GGA AGA TGG CAA AAC CAG CTA TGT GCT GCA TAA AAT CGA TGC GAT TGA TGA
+2 E A T Y T Y D Y T I S G G T G F Q E I L E
3661 AGC GAC CTA TAC CTA TGA TTA TAC CAT TAG CGG CGG CAC GGG CTT TCA GGA AAT TCT GGA
+2 E K V S F K T K L E A A D G G S K I K V S
3721 AAA AGT TAG CTT CAA AAC CAA ACT GGA AGC GGC GGA TGG CGG CAG CAA AAT TAA AGT GAG
+2 S V T F H T K G D A P L P D E V H Q D V K
3781 CGT GAC CTT TCA TAC CAA AGG CGA TGC GCC GCT GCC GGA TGA AGT GCA TCA GGA TGT GAA
His-tag
+2 K Q K S Q G I F K A I E G Y V L S N L E H
3841 ACA GAA AAG CCA GGG CAT TTT TAA AGC GAT TGA AGG CTA TGT TCT GAG CAA CCT CGA GCA
Stopp
+2 His-tag
+2 H H H H H H *
3901 CCA CCA CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC TGC TAA CAA AGC CCG AAA GGA AGC TGA GTT GGC
3961 TGC TGC CAC CGC TGA GCA ATA ACT AGC ATA ACC CCT TGG GGC CTC TAA ACG GGT CTT GAG

```

## c) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET32b-Oleosin

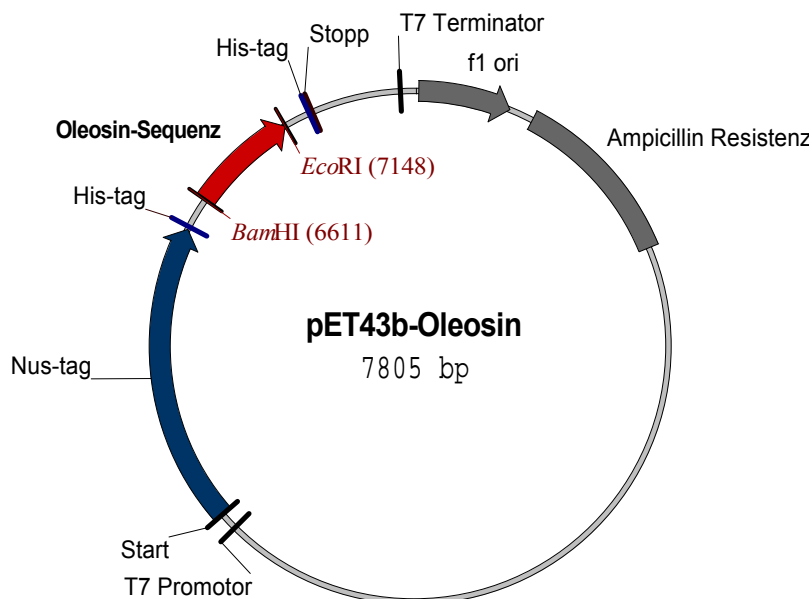


```

+1
5161 TAA CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG AGC
+1 D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G
5221 GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG
+1 A I L V D F W A E W C G P C K M I A P I
5281 GCG ATC CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT
+1 L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D
5341 CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT
+1 Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L L F
5401 CAA AAC CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC
+1 K N G E V A A T K V G A L S K G Q L K E
5461 AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG
+1 F L D A N L A G S G S G H M H H H H H
5521 TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT
+1 S S G L V P R G S G M K E T A A A A K F E
5581 TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA
+1 R Q H M D S P D L G T D D D D K A M A I
5641 CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG GCC ATG GCG ATA
+1 S D P M A T A T D R A P H Q V Q V H T P
5701 TCG GAT CCA ATG GCT ACT GCT ACT GAT CGT GCA CCT CAC CAG GTT CAA GTT CAC ACC CCC
+1 T T Q R V D V P R R G Y D V S G G G I K
5761 ACC ACA CAA CGC GTC GAC GTT CCA CGC CGC GGC TAC GAT GTT AGT GGT GGT GGT ATT AAG
+1 T L L P E R G P S T S Q I I A V L V G V
5821 ACT CTF CTC CCC GAG AGA GGT CCG TCC ACC TCT CAA ATC ATC GCC GTC CTC GTC GGC GTC
+1 P T G G T L L L L S G L S L L G T I I G
5881 CCC ACT GGG GGC ACT CTG TTG CTC CTC TCC GGC CTT TCA CTT CTC GGA ACC ATA ATC GGG
+1 L A I A T P V F T F F S P V I V P A V V
5941 CTG GCA ATT GCC ACC CCG GTT TTT ACT TTC TTC AGC CCG GTT ATA GTT CCC GCG GTC GTT
+1 T I G L A V T G I L T A G A G L T G L
6001 ACC ATT GGA CTT GCA GTC ACT GGT ATT CTC ACG GCG GGA GCA TGT GGA CTA ACC GGG CTG
+1 M S L S W M I N F I R Q V H G T T V P D
6061 ATG TCT TTG TCA TGG ATG ATT AAC TTC ATC CGA CAG GTA CAT GGG ACG ACG GTG CCG GAT
+1 Q L D S V K R R M A D M A D Y V G Q K T
6121 CAG CTG GAC TCA GTG AAG CGG CGC ATG GCG GAC ATG GCG GAT TAC GTG GGG CAG AAG ACA
+1 K D A G Q Q I Q T K A Q D V K R S S S G
6181 AAG GAT GCT GGC CAA CAG ATA CAG ACT AAG GCC CAG GAT GTT AAG AGG TCA TCA TCA GGG
+1 N S S S V D K L A A A L E H H H H H
6241 AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA
6301 GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA

```

## d) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET43b-Oleosin



```

+2                                     Start
                                     M N K E I L A V
4921 AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT GAA CAA AGA AAT TTT GGC TGT
+2 V V E A V S N E K A L P R E K I F E A L E
4981 AGT TGA AGC CGT ATC CAA TGA AAA GGC GCT ACC TCG CGA GAA GAT TTT CGA AGC ATT GGA
+2 E S A L A T A T K K Y E Q E I D V R V Q
5041 AAG CGC GCT GGC GAC AGC AAC AAA GAA AAA ATA TGA ACA AGA GAT CGA CGT CCG CGT ACA
+2 Q I D R K S G D F D T F R R W L V V D E V
5101 GAT CGA TCG CAA AAG CGG TGA TTT TGA CAC TTT CCG TCG CTG GTT AGT TGT TGA TGA AGT
+2 V T Q P T K E I T L E A A R Y E D E S L N
5161 CAC CCA GCC GAC CAA GGA AAT CAC CCT TGA AGC CGC ACG TTA TGA AGA TGA AAG CCT GAA
+2 N L G D Y V E D Q I E S V T F D R I T T Q
5221 CCT GGG CGA TTA CGT TGA AGA TCA GAT TGA GTC TGT TAC CTT TGA CCG TAT CAC TAC CCA
+2 Q T A K Q V I V Q K V R E A E R A M V V D
5281 GAC GGC AAA ACA GGT TAT CGT GCA GAA AGT GCG TGA AGC CGA ACG TGC GAT GGT GGT TGA
+2 D Q F R E H E G E I I T G V V K K V N R D
5341 TCA GTT CCG TGA ACA CGA AGG TGA AAT CAT CAC CGG CGT GGT GAA AAA AGT AAA CCG CGA
+2 D N I S L D L G N N A E A V I L R E D M L
5401 CAA CAT CTC TCT GGA TCT GGG CAA CAA CGC TGA AGC CGT GAT CCT GCG CGA AGA TAT GCT
+2 L P R E N F R P G D R V R G V L Y S V R P
5461 GCC GCG TGA AAA CTT CCG CCC TGG GCA CCG CGT TCG TGG CGT GCT CTA TTC CGT TCG CCC
+2 P E A R G A Q L F V T R S K P E M L I E L
5521 GGA AGC GCG TGG CGC GCA ACT GTT CGT CAC TCG TTC CAA GCC GGA AAT GCT GAT CGA ACT
+2 L F R I E V P E I G E E V I E I K A A A R
5581 GTT CCG TAT TGA AGT GCC AGA AAT CGG CGA AGA AGT GAT TGA AAT TAA AGC AGC GGC TCG
+2 R D P G S R A K I A V K T N D K R I D P V
5641 CGA TCC GGG TTC TCG TGC GAA AAT CGC GGT GAA AAC CAA CGA TAA ACG TAT CGA TCC GGT
+2 V G A C V G M R G A R V Q A V S T E L G G
5701 AGG TGC TTG CGT AGG TAT GCG TGG CGC GCG TGT TCA GGC GGT GTC TAC TGA ACT GGG TGG
+2 G E R I D I V L W D D N P A Q F V I N A M
5761 CGA GCG TAT CGA TAT CGT CCT GTG GGA TGA TAA CCC GGC GCA GTT CGT GAT TAA CGC AAT
+2 M A P A D V A S I V V D E D K H T M D I A
5821 GGC ACC GGC AGA CGT TGC TTC TAT CGT GGT GGA TGA AGA TAA ACA CAC CAT GGA CAT CGC
+2 A V E A G N L A Q A I G R N G Q N V R L A
5881 CGT TGA AGC CGG TAA TCT GGC GCA GGC GAT TGG CCG TAA CGG TCA GAA CGT GCG TCT GGC
+2 A S Q L S G W E L N V M T V D D L Q A K H
5941 TTC GCA ACT GAG CGG TTG GGA ACT CAA CGT GAT GAC CGT TGA CGA CCT GCA AGC TAA GCA
+2 H Q A E A H A A I D T F T K Y L D I D E D
6001 TCA GGC GGA AGC GCA CGC AGC GAT CGA CAC CTT CAC CAA ATA TCT CGA CAT CGA CGA AGA
+2 D F A T V L V E E G F S T L E E L A Y V P
6061 CTT CGC GAC TGT TCT GGT AGA AGA AGG CTT CTC GAC GCT GGA AGA ATT GGC CTA TGT GCC

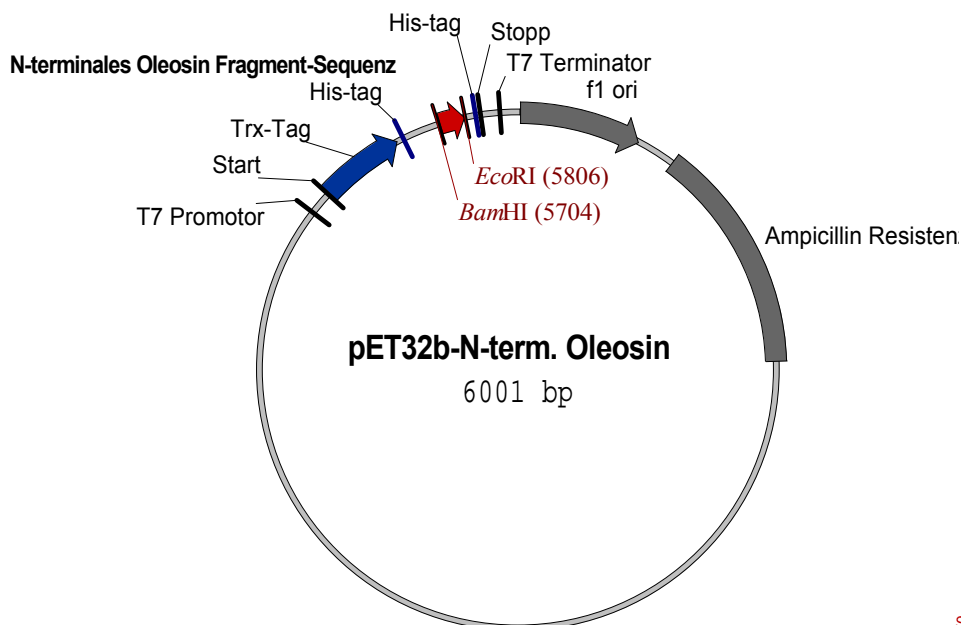
```

```

+2 · P M K E L L E I E G L D E P T V E A L R E ·
6121 GAT GAA AGA GCT GTT GGA AAT CGA AGG CCT TGA TGA GCC GAC CGT TGA AGC ACT GCG CGA
+2 · E R A K N A L A T I A Q A Q E E S L G D N ·
6181 GCG TGC TAA AAA TGC ACT GGC CAC CAT TGC ACA GGC CCA GGA AGA AAG CCT CGG TGA TAA
+2 · N K P A D D L L N L E G V D R D L A F K L ·
6241 CAA ACC GGC TGA CGA TCT GCT GAA CCT TGA AGG GGT AGA TCG TGA TTT GGC ATT CAA ACT
+2 · L A A R G V C T L E D L A E Q G I D D L A ·
6301 GGC CGC CCG TGG CGT TTG TAC GCT GGA AGA TCT CGC CGA ACA GGG CAT TGA TGA TCT GGC
+2 · A D I E G L T D E K A G A L I M A A R N I ·
6361 TGA TAT CGA AGG GTT GAC CGA CGA AAA AGC CGG AGC ACT GAT TAT GGC TGC CCG TAA TAT
His-tag
+2 · I C W F G D E A T S G S G H H H H H H S A ·
6421 TTG CTG GTT CGG TGA CGA AGC GAC TAG TGG TTC TGG TCA TCA CCA TCA CCA TCA CTC CGC
+2 · A G K E T A A A K F E R Q H M D S P P P T ·
6481 GGG TAA AGA AAC CGC TGC TGC GAA ATT TGA ACG CCA GCA CAT GGA CTC GCC ACC GCC AAC
+2 · T G L V P R G S A G S G T I D D D D K S P ·
6541 TGG TCT GGT CCC CCG GGG CAG CGC GGG TTC TGG TAC GAT TGA TGA CGA CGA CAA GAG TCC
BamHI
+2 · P E L V D P M A T A T D R A P H Q V Q V H ·
6601 GGA GCT CGT GGA TCC AAT GGC TAC TGC TAC TGA TCG TGC ACC TCA CCA GGT TCA AGT TCA
+2 · H T P T T Q R V D V P R R G Y D V S G G G ·
6661 CAC CCC CAC CAC ACA ACG CGT CGA CGT TCC ACG CCG CGG CTA CGA TGT TAG TGG TGG TGG
+2 · G I K T L L P E R G P S T S Q I I A V L V ·
6721 TAT TAA GAC TCT TCT CCC CGA GAG AGG TCC GTC CAC CTC TCA AAT CAT CGC CGT CCT CGT
+2 · V G V P T G G T L L L L S G L S L L G T I ·
6781 CGG CGT CCC CAC TGG GGG CAC TCT GTT GCT CCT CTC CGG CCT TTC ACT TCT CGG AAC CAT
+2 · I I G L A I A T P V F T F F S P V I V P A ·
6841 AAT CGG GCT GGC AAT TGC CAC CCC GGT TTT TAC TTT CTT CAG CCC GGT TAT AGT TCC CGC
+2 · A V V T I G L A V T G I L T A G A C G L T ·
6901 GGT CGT TAC CAT TGG ACT TGC AGT CAC TGG TAT TCT CAC GGC GGG AGC ATG TGG ACT AAC
+2 · T G L M S L S W M I N F I R Q V H G T T V ·
6961 CGG GCT GAT GTC TTT GTC ATG GAT GAT TAA CTT CAT CCG ACA GGT ACA TGG GAC GAC GGT
+2 · V P D Q L D S V K R R M A D M A D Y V G Q ·
7021 GCC GGA TCA GCT GGA CTC AGT GAA GCG GCG CAT GGC GGA CAT GGC GGA TTA CGT GGG GCA
+2 · Q K T K D A G Q Q I Q T K A Q D V K R S S ·
7081 GAA GAC AAA GGA TGC TGG CCA ACA GAT ACA GAC TAA GGC CCA GGA TGT TAA GAG GTC ATC
EcoRI
+2 · S S G N S V Q A R L Q D V D G T I D T R S ·
7141 ATC AGG GAA TTC TGT ACA GGC GCG CCT GCA GGA CGT CGA CGG TAC CAT CGA TAC GCG TTC
+2 · S K L A A A Q L Y T R A S Q P E L A P E D ·
7201 GAA GCT TGC GGC CGC ACA GCT GTA TAC ACG TGC AAG CCA GCC AGA ACT CGC TCC TGA AGA
His-tag
+2 · D P E D L E H H H H H H *
7261 CCC AGA GGA TCT CGA GCA CCA CCA CCA CCA CTA ATG TTA ATT AAG TTG GGC GTT CCT

```

### e) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET32b-N-terminales Oleosin-Fragment



```

+1
5161 TAA CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG AGC
+1   D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G
5221 GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG
+1   A I L V D F W A E W C G P C K M I A P I
5281 GCG ATC CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT
+1   L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D
5341 CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT
+1   Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L L F
5401 CAA AAC CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC
+1   K N G E V A A T K V G A L S K G Q L K E
5461 AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG
+1   F L D A N L A G S G S G H M H H H H H H
5521 TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT
+1   S S G L V P R G S G M K E T A A A K F E
5581 TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA
+1   R Q H M D S P D L G T D D D D K A M A I
5641 CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG GCC ATG GCG ATA
+1   S D P M A T A T D R A P H Q V Q V H T P
5701 TCG GAT CCA ATG GCT ACT GCT ACT GAT CGT GCA CCT CAC CAG GTT CAA GTT CAC ACC CCC
+1   T T Q R V D V P R R G Y D V G N S S S V
5761 ACC ACA CAA CGC GTC GAC GTT CCA CGC CGC GGC TAC GAT GTT GGG AAT TCG AGC TCC GTC
+1   D K L A A A L E H H H H H H
5821 GAC AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC

```

Start  
M S

His-tag

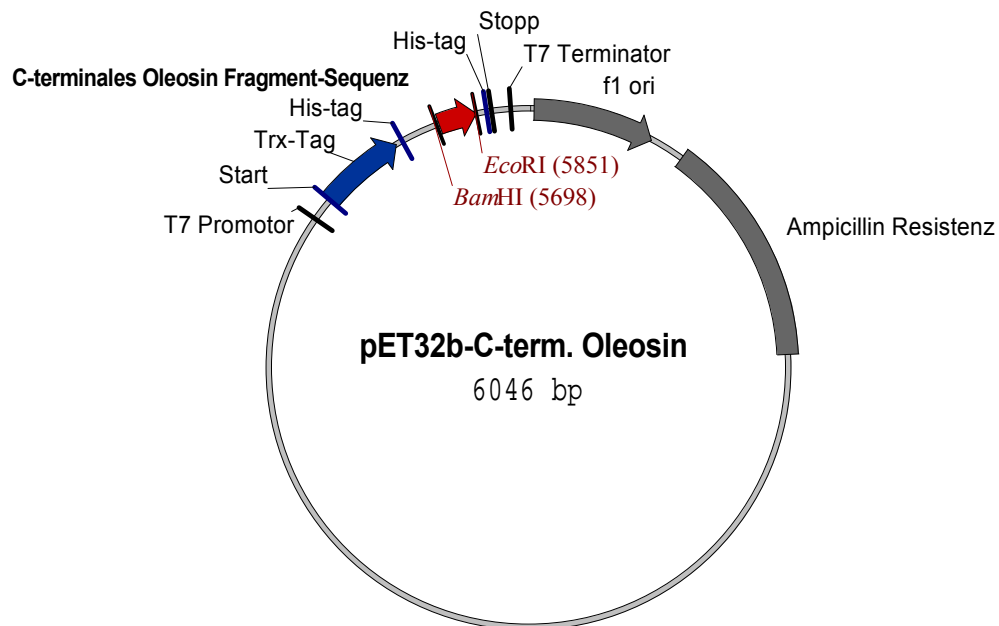
BamHI

EcoRI

His-tag

Stopp

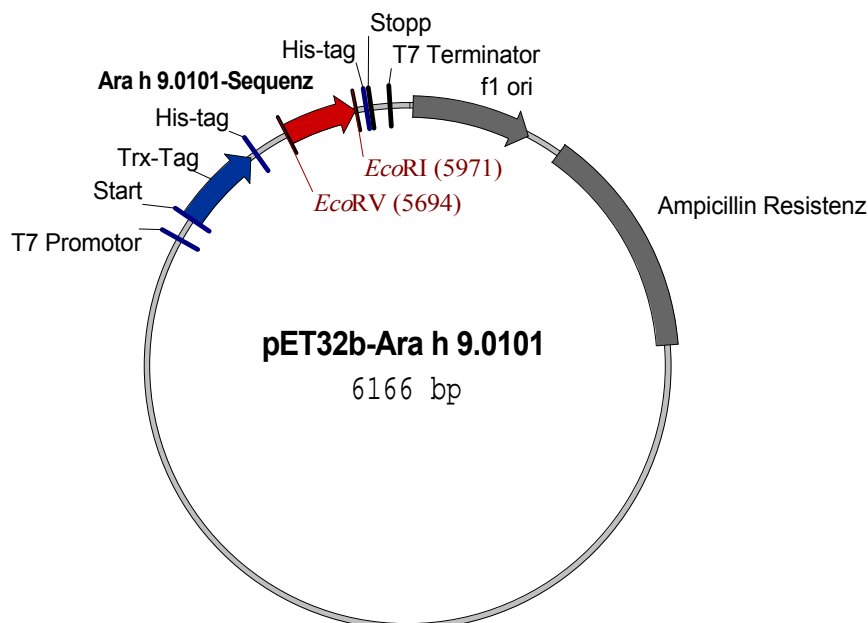
## f) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET32b-C-terminales Oleosin-Fragment



Position	Sequence	Annotations
+1	TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT	Start (M S D K)
5161	ATG AGC GAT AAA	
+1	I I H L T D S F D T D V L K A D G A I	
5221	ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG GCG ATC	
+1	L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D	
5281	CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT	
+1	E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D Q N	
5341	GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC	
+1	P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N	
5401	CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC	
+1	G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L	
5461	GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC	
+1	D A N L A G S G S G H M H H H H H H S S	His-tag
5521	GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT TCT TCT	
+1	G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q	
5581	GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG	
+1	H M D S P D L G T D D D D K A M A I S D	BamHI
5641	CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG GCC ATG GCG ATA TCG GAT	
+1	P Q V H G T T V P D Q L D S V K R R M A	BamHI
5701	CCA CAG GTA CAT GGG ACG ACG GTG CCG GAT CAG CTG GAC TCA GTG AAG CGG CGC ATG GCG	
+1	D M A D Y V G Q K T K D A G Q Q I Q T K	
5761	GAC ATG GCG GAT TAC GTG GGG CAG AAG ACA AAG GAT GCT GGC CAA CAG ATA CAG ACT AAG	
+1	A Q D V K R S S S G N S S S V D K L A A	EcoRI
5821	GCC CAG GAT GTT AAG AGG TCA TCA TCA GGG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC	Stopp
+1	A L E H H H H H H *	His-tag
5881	GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA	



## h) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET32b-Ara 9.0101



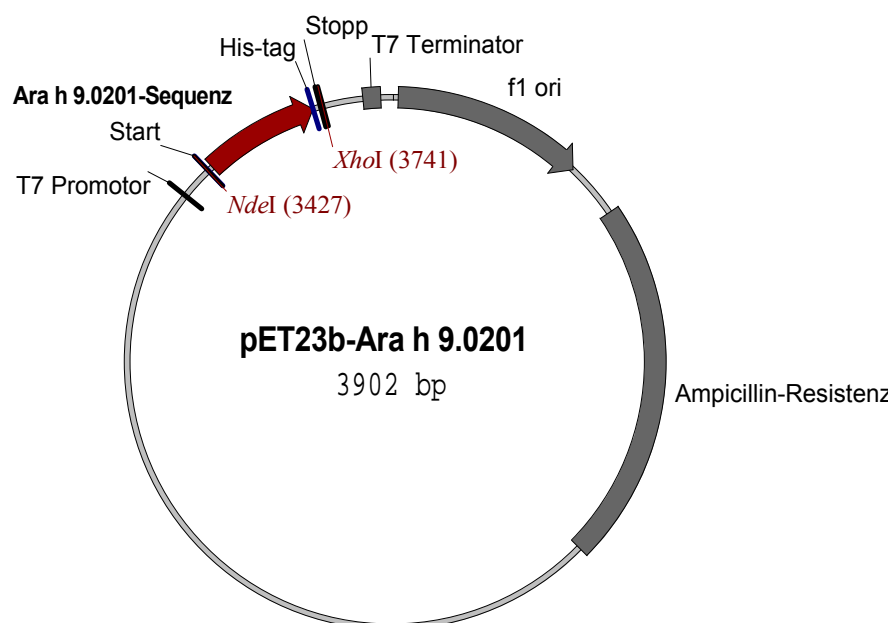
```

+1
5161 TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG AGC GAT AAA
+1 I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I
5221 ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG GCG ATC
+1 L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D
5281 CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT
+1 E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D Q N
5341 GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC
+1 P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N
5401 CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC
+1 G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L
5461 GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC
+1 D A N L A G S G S G H M H H H H H S S
5521 GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT TCT TCT
+1 G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q
5581 GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG
+1 H M D S P D L G T D D D D K A M A I S C
5641 CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG GCC ATG GCG ATA TCA TGT
+1 G Q V N S A L A P C I P F L T K G G A P
5701 GGC CAA GTG AAC AGT GCC CTA GCA CCA TGC ATC CCT TTC CTC ACA AAG GGT GGA GCT CCT
+1 P P A C C S G V R G L L G A L R T T A D
5761 CCT CCG GCT TGT TGC AGC GGA GTT AGA GGC CTT CTC GGT GCT TTA AGA ACC ACC GCA GAC
+1 R Q A A C N C L K A A A G S L R G L N Q
5821 CGC CAG GCC GCC TGT AAC TGC CTC AAA GCC GCT GCC GGT TCC CTT CGT GGC CTC AAC CAA
+1 G N A A A L P G R C G V S I P Y K I S T
5881 GGC AAC GCC GCC GCC CTC CCT GGA AGA TGC GGT GTC AGC ATT CCT TAC AAG ATC AGC ACC
+1 S T N C A T I K F G N S S S V D K L A A
5941 TCC ACC AAC TGT GCT ACC ATT AAG TTC GGG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC
+1 A L E H H H H H H *
6001 GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA

```

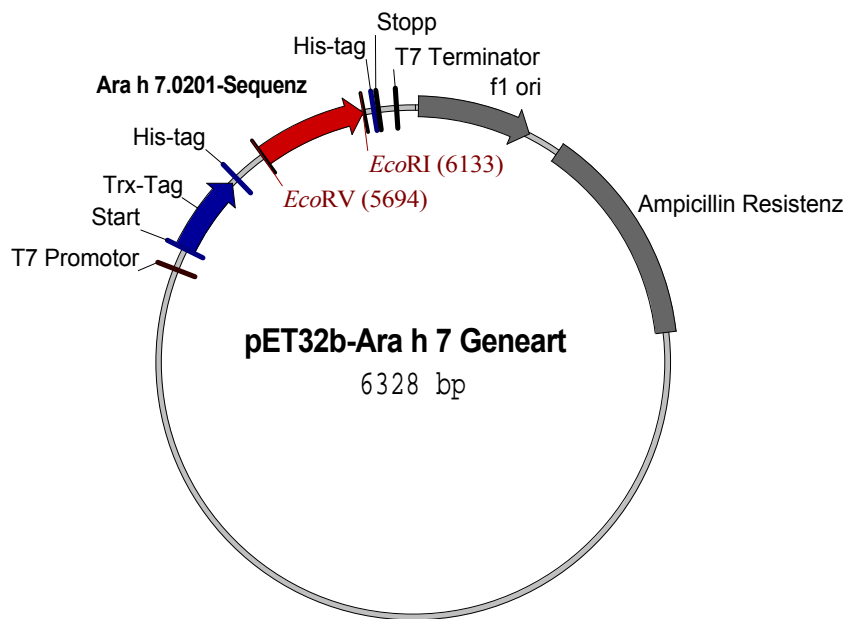


## j) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET23b-Ara 9.0201 (Geneart)



Start  
 NdeI  
 +2 M R G S L S C G Q V N S A L A P C I  
 3421 TAT ACA TAT GAG AGG ATC CCT GAG CTG CGG CCA GGT GAA TAG CGC GCT GGC CCC GTG CAT  
 +2 I T F L T K G G V P S G P C C S G V R G L  
 3481 TAC CTT TCT GAC CAA AGG CGG CGT TCC GAG CGG TCC GTG CTG CAG CGG TGT GCG TGG TCT  
 +2 L L G A A K T T A D R Q A A C N C L K A A  
 3541 GCT GGG TGC GGC GAA AAC CAC CGC GGA TCG TCA GGC GGC GTG CAA CTG CCT GAA AGC GGC  
 +2 A A G S L H G L N Q G N A A A L P G R C G  
 3601 AGC GGG TAG CCT GCA TGG CCT GAA CCA GGG TAA TGC AGC GGC GCT GCC GGG TCG TTG CGG  
 +2 G V S I P Y K I S T S T N C A T I K F H H His-tag  
 3661 TGT GAG CAT TCC GTA TAA AAT TAG CAC CAG CAC CAA CTG CGC GAC CAT TAA ATT TCA TCA  
 His-tag  
 +2 H H H H H Stopp XhoI  
 3721 CCA TCA CCA CCA CTA ATA ACT CGA GCA CCA CCA CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC TGC TAA

## k) Vektorkarte und Sequenzdaten des DNA-Konstruktes pET32b-Ara 7.0201 (Geneart)



```

+1
5161 TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT M S D K
+1 I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I
5221 ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG GCG ATC
+1 L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D
5281 CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT
+1 E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D Q N
5341 GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC
+1 P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N
5401 CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG TTC AAA AAC
+1 G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L
5461 GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC

+1 D A N L A G S G S G H M H H H H H S S
5521 GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT TCT TCT
+1 G L V P R G S G M K E T A A A A K F E R Q
5581 GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG

+1 H M D S P D L G T D D D D K A M A I S T
5641 CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG GCC ATG GCG ATA TCG ACC
+1 R W D P D R G S R G S R W D A P S R G D
5701 CGT TGG GAT CCG GAT CGT GGC AGC CGT GGT AGC CGT TGG GAT GCG CCG AGC CGT GGC GAT
+1 D Q C Q R Q L Q R A N L R P C E E H I R
5761 GAT CAG TGC CAG CGT CAG CTG CAG CGT GCG AAC CTG CGT CCG TGC GAA GAA CAT ATT CGT
+1 Q R V E K E Q E Q E Q D E Y P Y I Q R G
5821 CAG CGC GTG GAA AAA GAA CAG GAA CAA GAA CAG GAC GAA TAT CCG TAT ATT CAG CGT GGC
+1 S R G G Q R P G G E S D E D Q E Q R C C N E
5881 AGC CGC GGT CAG CGT CCG GGC GAA AGC GAT GAA GAT CAG GAA CAG CGT TGC TGC AAC GAA
+1 L N R F Q N N Q R C M C Q A L Q Q I L Q
5941 CTG AAC CGT TTT CAG AAC AAC CAG CGT TGC ATG TGC CAG GCG CTG CAG CAG ATT CTG CAG
+1 N Q S F R F Q Q D R S Q L H Q M E R E L
6001 AAC CAG AGC TTT CGT TTT CAG CAG GAT CGT AGC CAG CTG CAT CAG ATG GAA CGT GAA CTG
+1 R N L P Q N C G F R S P S R C D L S S R
6061 CGT AAC CTG CCG CAG AAC TGC GGC TTT CGT AGC CCG AGC CGT TGC GAT CTG AGC AGC CGT

+1 T P Y G N S S S V D K L A A A L E H H H
6121 ACC CCG TAT GGG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC
+1 H H H *
6181 CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT GCT GCC

```

## 10 Veröffentlichungen

### Originalarbeiten:

Riecken S., Lindner B., Petersen A., Jappe U. und Becker W.M. (2008)

Purification and characterization of natural Ara h 8, the Bet v 1 homologous allergen from peanut, provides a novel isoform.

*Biological Chemistry (im Druck, Epub 21. Jan. 2008)*

### Abstracts:

Riecken S., Darcan Y. und Becker W.M. (2006)

Indonesische Erdnüsse mit reduziertem bzw. fehlendem Ara h 1.

*Allergo Journal* 14:46

Riecken S., Darcan Y. und Becker W.M. (2006)

Local commercially available Indonesian peanut varieties with reduced Ara h 1 content.

*XXV EAACI, Abstract Book*:415

Riecken S., Schmidt H., Darcan Y., Janssen O. und Becker W.M. (2007)

Allergenspektrum verschiedener Erdnussvarietäten.

*Allergo Journal* 16:48

Riecken S., Petersen A., Jappe U., Becker W.M. (2007)

Ara h 8 - analysis of natural and recombinant preparations.

*2nd International Symposium on Molecular Allergology, Abstract Book*:18

Riecken S., Schmidt H., Darcan Y., Latendorf T., Janssen O. und Becker W.M. (2007)

The allergen spectrum of different peanut varieties.

*Allergy* 62:107

Riecken S., Lindner B., Petersen A., Jappe U. und Becker W.M. (2007)

Ara h 8 – Analyse von rekombinanten und natürlichen Präparationen.

*Allergo Journal* 16:65

Riecken S., Mari A., Quaratino D., Zennaro D., Reese G., Petersen A., Vieths S. und  
Becker W.M. (2008)

Erdnuss-LTP: Identifizierung von Ara h 9, einem neuen Erdnussallergen, und Klonierung von  
zwei Isoformen.

*Allergo Journal* 17:58

Mari A., Riecken S., Quaratino D., Zennaro D., Reese G., Petersen A., Vieths S. und  
Becker W.M. (2008)

Identification of a Lipid Transfer Protein (LTP) in peanut extract and cloning of two LTP  
isoallergens.

*Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121:212

### **Vorträge**

Indonesische Erdnüsse mit reduziertem bzw. fehlendem Ara h 1.

18. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz; 10.03.-11.03.2006

Allergenspektrum verschiedener Erdnussvarietäten.

19. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz; 09.03.- 10.03.2007

Erdnuss-LTP: Identifizierung von Ara h 9, einem neuen Erdnussallergen, und Klonierung von  
zwei Isoformen.

20. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz; 07.03.- 08.03.2007

**Poster**

Riecken S., Darcan Y. und Becker W.M.

Local commercially available Indonesian peanut varieties with reduced Ara h 1 content.  
XXV Congress of the European Academy of Allergology & Clinical Immunology, Wien  
10.06.-14.06.2006

Riecken S., Petersen A., Jappe U., Becker W.M.

Ara h 8 - analysis of natural and recombinant preparations.  
2nd International Symposium on Molecular Allergology, Rom 22.04.-24.04.2007

Riecken S., Schmidt H., Darcan Y., Latendorf T., Janssen O. und Becker W.M.

The allergen spectrum of different peanut varieties.  
XXVI Congress of the European Academy of Allergology & Clinical Immunology, Göteborg  
09.06.-13.06.2007

Riecken S., Lindner B., Petersen A., Jappe U. und Becker W.M.

Ara h 8 – Analyse von rekombinanten und natürlichen Präparationen.  
2. Gemeinsamer Deutscher Allergie-Kongress, Lübeck 26.09.-29.09.2007

**Datenbankeinträge**

<b>Allergen</b>	<b>GenBank Acc No.</b>	<b>I.U.I.S</b>	<b>Beschreibung</b>
Ara h 7	EU046325	Ara h 7.0201	Isoform von Ara h 7.0101
Ara h 8	EF436550	Ara h 8.0201	Isoform von Ara h 8.0101
	EU514465	-	Genorganisation
Ara h 9	EU159429	Ara h 9.0101	Erstbeschreibung eines neuen Allergens (LTP)

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name                      Susanne Riecken  
Geburtsdatum            29.12.1976  
Geburtsort                Osnabrück

### Schulbildung

07/1983-08/1987        Melanchthon Grundschule, Münster  
08/1987-06/1996        Pascalgymnasium, Münster  
Abschluss: Abitur

### Hochschulbildung

10/1996-09/1999        Studium der Biologie an der Universität Münster  
Abschluss: Vordiplom  
10/1999-10/2003        Studium der Biologie an der Universität Hamburg  
Hauptfach: Molekularbiologie/Genetik  
Nebenfächer: Humanbiologie und Biochemie  
Abschluss: Diplom  
10/2002-09/2003        Diplomarbeit an der Universität Hamburg  
Biozentrum Klein Flottbek, Arbeitsgruppe Molekulare Phytopathologie  
und Genetik  
Thema: „Mutagenese der *Lip8* DNA-Sequenz von *Candida albicans*  
und Charakterisierung der Enzymeigenschaften im *Pichia pastoris*  
Expressionssystem.“  
seit 08/2004            Promotion am Forschungszentrum Borstel  
Laborgruppe Molekulare und Klinische Allergologie  
Thema: „Untersuchungen zum Allergenrepertoire der Erdnuss:  
Molekulare Charakterisierung von Ara h 7, Ara h 8, Oleosin und LTP“

## 12 Danksagung

Meinem Betreuer Dr. Wolf-Meinhard Becker gilt mein besonderer Dank für die Überlassung dieses spannenden Themas, für seine umfassende Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft, für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre sowie für die Möglichkeit bei zahlreichen Kongressen meine Ergebnisse präsentieren zu können.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Arnd Petersen für das Korrekturlesen von Manuskripten und seinen hilfreichen Vorschlägen und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Herrn Prof. Dr. Peter Zabel danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare und Klinische Allergologie des Forschungszentrums Borstel durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Stefan Anemüller danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. Buko Lindner möchte ich für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Analysen sowie für die hilfreichen Anregungen danken.

Dr. Gerald Reese von der Abteilung Allergologie des Paul-Ehrlich-Institutes danke ich für die vielseitigen fachlichen Diskussionen, die wertvollen Anregungen und die Bereitstellung von RBL-Zelllinien.

Frau Dr. Uta Jappe aus der Abteilung Allergologie des Paul-Ehrlich-Institutes danke ich nicht nur für das Korrekturlesen von Manuskripten, sondern auch, ebenso wie Dr. Adriano Mari (IDI-IRCCS, Rom) und Prof. Dr. Regina Fölster-Holst (Kieler Universitätshautklinik), für die Zusendung von Patientenseren, ohne die diese Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Ottmar Janssen aus dem Institut für Immunologie der Universität Kiel und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Hendrik Schmidt und Ties Latendorf, danke ich für die Durchführung der 2D-DIGE Analysen.

Bei der Laborgruppe Veterinär-Infektiologie und –Immunbiologie möchte ich mich für die Möglichkeit der Versuchsdurchführung in deren Räumlichkeiten bedanken. Besonders danke ich dabei Birgit Kullmann, Silke Gerber und Prof. Dr. Ulrike Seitzer für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Steffen Bade aus der Laborgruppe Mukosaimmunologie danke ich für freundliche Hilfsbereitschaft bei der ELISA-Etablierung.

Den Mitarbeitern meiner Laborgruppe Dany Warneke, Marisa Böttger, Gerda Finnern und Dr. Frauke Schocker möchte ich für die ausgezeichnete und fröhliche Arbeitsatmosphäre danken. Steffi Fox danke ich darüber hinaus für die exzellente technische Unterstützung und die besonders intensive Zusammenarbeit, aus der sich eine enge Freundschaft entwickelt hat. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Yasemin Darcan für die Hilfe bei der Etablierung der ELISAs und des RBL-Assays.

Den von mir betreuten Auszubildenden Mitja Giertz und Stefan Kruse danke ich dafür, dass sie nicht nur frischen Wind in die Laborgruppe gebracht haben, sondern deren Mithilfe meine Arbeit unterstützt hat.

Ganz großen Dank richte ich an meine Eltern für ihre Zuversicht sowie für ihre langjährige und liebevolle Unterstützung. Meinem Bruder Jan danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine hilfreichen Ratschläge. Ein besonders großer Dank gebührt meinem Freund Jens, der mir in dieser Zeit mit seiner Liebe zur Seite stand und immer für mich da war.