

**Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Programmbereich Asthma und Allergie
Direktor: Prof. Dr. Heinz Fehrenbach**

**Untersuchungen zum Einfluss von Lipiden
auf die Allergenität von Nahrungsmittelallergenen am Beispiel des
Erdnussallergens Ara h 8**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Sandra Rennert
aus Kaltenkirchen

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Arnd Petersen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.06.2016

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Allergene	2
1.2 Klassifikation der Allergie-Typen.....	3
1.3 Pathomechanismus der Typ I-Allergie	3
1.4 Nahrungsmittelallergien	5
1.5 Die Erdnussallergie	6
1.5.1 Epidemiologie	7
1.5.2 Symptome.....	8
1.5.3 Diagnostik und Therapie	8
1.5.4 Sensibilisierung.....	9
1.5.5 Die Allergene der Erdnuss	10
1.5.5.1 Die Majorallergene (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 und Ara h 6).....	10
1.5.5.2 Intermediäre und Minorallergene (Ara h 5 und Ara h 7-17)	11
1.6 Zielsetzung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Geräte	17
2.1.4 Antikörper und Patientenserum.....	18
2.1.5 Bakterienstämme	19
2.1.6 Nährmedien	20
2.1.7 Plasmide	20
2.1.8 Oligonukleotide	21
2.1.9 Verwendete Erdnussorten.....	22
2.1.10 Computerprogramme.....	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.2.2 Präzipitation von DNA.....	24
2.2.3 Konzentration und Reinheitsgrad von DNA	24
2.2.4 Analytische Agarosegelelektrophorese	25
2.2.5 Präparative Agarosegelelektrophorese.....	26
2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26

2.2.7	Site-directed Mutagenese (Ara h 8 K54N)	27
2.2.8	PCR aus Bakterienkolonien	29
2.2.9	Enzymatische DNA-Restriktion	29
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide	30
2.2.11	Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen	31
2.2.12	Expression von rekombinanten Proteinen	32
2.3	Proteinbiochemische Methoden	33
2.3.1	Herstellung von Erdnussextrakten	33
2.3.1.1	Wässriger Erdnussextrakt	33
2.3.1.2	Lipophiler Erdnussextrakt (Chloroform/MeOH-Extraktion).....	33
2.3.2	Proteinbestimmung	34
2.3.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.3.2.2	Proteinbestimmung durch UV-Spektroskopie.....	35
2.3.3	SDS-PAGE	35
2.3.3.1	Coomassie-Färbung.....	37
2.3.4	Zweidimensionale Elektrophorese	38
2.3.5	Immunoblotting	40
2.3.5.1	Proteinfärbung mit Ponceau S.....	40
2.3.5.2	Proteinfärbung mittels India Ink	41
2.3.5.3	Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern	41
2.3.5.4	Nachweis der spez. IgE-Reaktivität mit Patientenseren	42
2.3.5.5	Kreuz-Inhibitionstest.....	43
2.3.6	Proteinreinigung durch Säulenchromatographie	43
2.3.6.1	Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie)	43
2.3.6.2	Chromatofokussierung	44
2.3.6.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	45
2.3.6.4	Affinitätschromatographie.....	46
2.3.7	Umpufferung und Konzentrierung von Proteinen	47
2.3.8	Beladung von rAra h 8 mit Erdnussöl.....	47
2.3.9	Proteinsequenzierung	48
2.3.10	CD-Spektroskopie.....	49
2.3.11	Massenspektrometrie (Peptid-Fingerprinting).....	50
2.3.11.1	Trypsinierung	50
2.3.11.2	MALDI-TOF- MS.....	51
2.3.12	Ribonukleaseaktivitätstests	51
2.3.13	ANS-Bindungstest	52
2.3.14	ANS-Verdrängungstest.....	53

2.3.15	Proteolytische Stabilitätstests	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Ara h 8	55
3.1.1	Aufreinigung und Isolierung von Ara h 8	55
3.1.1.1	Trennverfahren zur Aufreinigung von nAra h 8.....	58
3.1.2	Molekulare Charakterisierung von Ara h 8	63
3.1.2.1	Immunoblotting und 2D-Elektrophorese	63
3.1.2.2	Kreuzreaktivität mit Bet v 1	66
3.1.2.3	Analyse der Sekundärstruktur und Thermostabilität.....	68
3.1.2.4	Proteolytische Stabilität von Ara h 8	69
3.1.3	Expressionsregulation durch Pflanzenpathogene	73
3.1.4	Ribonukleasefunktion.....	75
3.1.4.1	Klonierung der Ara h 8-Mutante Ara h 8 K54N	76
3.1.4.2	Klonierung der Ara h 8 E147A/Y149A-Mutante	79
3.1.4.3	RNase-Aktivitätstests der Ara h 8-Mutanten.....	80
3.1.5	Ara h 8 als Lipid-bindendes Protein	83
3.1.5.1	Identifizierung von hydrophoben Proteinbereichen	84
3.1.5.2	Charakterisierung von Ara h 8-Liganden	85
3.2	Defensin	87
3.2.1	Isolierung und Identifikation	87
3.2.1.1	N-terminale Proteinsequenzierung und Homologiesuche.....	88
3.2.2	Sequenzalignment mit anderen Defensinen	90
4	Diskussion	93
4.1	Isolierung und Charakterisierung von Ara h 8.....	94
4.2	Die biologische Funktion von Ara h 8	101
4.3	Defensin	106
5	Ausblick	109
6	Zusammenfassung.....	110
7	Summary	112
8	Literaturverzeichnis	114
9	Veröffentlichungen.....	127
10	Danksagung.....	130

Abkürzungsverzeichnis

2-DE	zweidimensionale Elektrophorese
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure
AP	Alkalische Phosphatase
APC	engl.: antigen presenting cells
APS	Ammoniumpersulfat
Ara h	Nomenklatur der Erdnussallergene (lat.: <i>Arachis hypogaea</i>)
AS	Aminosäure
<i>Asp. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz
Bet v	Nomenklatur der Birkenpollenallergene (lat.: <i>Betula verrucosa</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
d	Tag
DC	Dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
ESI-FT-ICR	Elektrospray-Ionisation-Fourier Transform-Ionencyclotronresonanz
EST	engl.: expressed sequence tags
Fc	konstante Region des Antikörpers (engl.: fragment crystallisable)
FEIA	Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay
FPLC	engl.: fast protein liquid chromatography
GALT	engl.: gut-associated lymphoid tissues
h	Stunde
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
His-Tag	Histidin-Anhang (engl.: -tag)
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUIS	International Union of Immunological Societies
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
LTP	Lipidtransferprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	engl.: Matrix-assisted laser desorption/ionisation
MALT	engl.: mucosa-associated lymphoid tissues
Milli-Q-H ₂ O	Reinstwasser (deionisiert und mehrfach gefiltert)
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (engl.: molecular weight)
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose

nsLTP	nichtspezifisches Lipidtransferprotein
OAS	orales Allergiesyndrom
OD	optische Dichte
OIT	orale Immuntherapie
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate-buffered saline)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pI	isoelektrischer Punkt
PR	pflanzliche Abwehrproteine (engl.: Pathogenesis-related)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
slgE	(Allergen-) spezifisches Immunglobulin E
SLIT	sublinguale Immuntherapie
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: Tris-buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: trifluoroacetic acid)
TOF	Flugzeit (engl.: time of flight)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	engl.: Unit (Einheit für die Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	engl.: volume per volume
w/v	engl.: weight per volume
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (engl.: gravity)

1 Einleitung

Allergische Erkrankungen zählen in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten chronischen Erkrankungen mit stetig steigender Prävalenz (Ring et al. 2010). Aufgrund der Häufigkeit sind sie zu einem bedeutenden sozioökonomischen Problem für die Betroffenen und das Gesundheitssystem in vielen Ländern geworden (Langen et al. 2014). Dabei sind Allergien in den unterschiedlichen Regionen verschieden stark verbreitet. In Nordeuropa sind Gräser- oder Baumpollen die häufigste Ursache von allergischen Symptomen (allergische Rhinokonjunktivitis), dabei ist die Birkenpollenallergie am weitesten verbreitet (Smith et al. 2014). Aber auch Nahrungsmittelallergien sind in Europa und Nordamerika auf dem Vormarsch und führen zu vielseitigen Beschwerden (Gupta et al. 2011). Neben leichten Symptomen können auch schwerwiegende allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock durch Nahrungsmittelallergene ausgelöst werden. Die acht häufigsten Nahrungsmittel, die schwerste Reaktionen mit Anaphylaxie hervorrufen können, sind Kuhmilch, Hühnerfleisch, Fische, Krustentiere, Erdnuss, Baumnüsse/Kerne, Weizen und Soja (Trautmann und Kleine-Tebbe 2013).

Die verschiedenen allergischen Erkrankungen werden durch eine fehlgerichtete, überschießende IgE-vermittelte Immunantwort auf bestimmte, normalerweise harmlose Umweltantigene ausgelöst, die dann als Allergene bezeichnet werden. Das adaptive Immunsystem setzt sich aus der zellulären und der humoralen Immunantwort zusammen. Intrazelluläre Erreger (z.B. Bakterien oder Viren) werden normalerweise über die zelluläre Immunantwort bekämpft, wobei T-Zellen zu T-Helferzellen vom Typ 1 (TH₁-Zellen) differenzieren. Extrazelluläre Erreger (z.B. Parasiten) hingegen können durch die humorale Immunantwort, die durch TH₂-Zellen gekennzeichnet ist, abgewehrt werden. Bei Allergikern ist das Gleichgewicht zwischen TH₁- und TH₂-Zellen gestört, sodass mehr TH₂-Zellen als TH₁-Zellen existieren. Deshalb wird durch an sich harmlose Allergene eine TH₂-vermittelte Immunantwort induziert, die eigentlich zur Abwehr von parasitären Erregern dient.

Für die zunehmende Zahl der Allergiker werden verschiedene Aspekte des "westlichen Lebensstils" verantwortlich gemacht, da Allergien vorwiegend in den Industrieländern verbreitet sind (Graham-Rowe 2011). Jedoch konnte bisher kein einheitliches Erklärungsmodell gefunden werden. Da das kindliche Immunsystem für eine gesunde Entwicklung die Auseinandersetzung mit viralen, parasitären und bakteriellen Krankheitserregern benötigt, wird jedoch ein Zusammenhang mit der Verdrängung von Erregern durch verbesserte

Hygienebedingungen vermutet (Riedler et al. 2001, Maizels 2005). Zudem ist wahrscheinlich das Zusammenspiel zwischen der genetischen Veranlagung mit verschiedenen Kofaktoren (z.B. Umweltgifte, Infektionen, Ernährungsgewohnheiten) für eine Verschiebung der TH₁/TH₂-Immunantwort in Richtung TH₂ verantwortlich, die Allergien begünstigen (Gruitjthuijsen et al. 2006, Sampson 2004).

Um die Ursachen für die steigende Anzahl von Allergikern zu finden, ist es wichtig, die Allergene näher zu charakterisieren. Dazu zählt neben den Untersuchungen der molekularen Eigenschaften vor allem auch die Analyse der physiologischen Funktion, da die Funktionsweise für die Allergenität eine wichtige Rolle spielt.

1.1 Allergene

Bei den derzeit bekannten Allergenen handelt es sich in der Regel um Proteine und Glykoproteine. Einige Ausnahmen stellen bestimmte Glykostrukturen bei Fleischallergien und hochmolekulare Polysaccharide mit einem Molekulargewicht von mindestens 50.000 kDa (z.B. Plasmaexpander) dar, die in Ausnahmefällen immunogen wirken können (Mullins et al. 2012, Shiratori et al. 2015). Um eine Allergie auszulösen, müssen die Allergene die Epithelbarriere überwinden. Die meisten Allergene sind deshalb wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 5 und 100 kDa (Woodfolk et al. 2015). Um eine Immunantwort auslösen zu können, ist allerdings ein Molekulargewicht von mindestens 10 kDa Voraussetzung. Kleinere Proteine bilden unter natürlichen Bedingungen jedoch häufig Multimere, sodass auch Proteine < 10 kDa allergen sein können (Saloga et al. 2006). Einige Allergene verfügen zusätzlich über eine Enzymaktivität, welche die Passage durch das Epithelgewebe unterstützt. Das Milbenallergen Der p 1 verfügt z.B. über eine Cysteinprotease-Aktivität, welche die Membranproteine der "Tight Junctions" enzymatisch spaltet. Diese verschließen normalerweise die Zellzwischenräume im Lungen-Epithel, sodass durch die Spaltung der Eintritt in das Gewebe ermöglicht wird (Wan et al. 1999). Inhalative Allergene (z.B. Gräser-/Baumpollen, Tierhaare) treten über die Schleimhäute von Nase, Mund, Rachen und Lunge mit dem Körper in Kontakt und verursachen die typischen Beschwerden wie Rhinokonjunktivitis oder Asthma bronchiale. Nahrungsmittelallergene werden über den Darm aufgenommen und rufen meistens Durchfälle und Erbrechen hervor. Durch Kreuzreaktionen mit Gräser- oder Baumpollenallergenen können jedoch auch Symptome an der Mundschleimhaut auftreten, die unter dem Begriff "orales Allergiesyndrom" zusammengefasst werden. Sie äußern sich meistens durch milde Symptome wie

Mundkribbeln, Jucken oder Brennen und sind auf die Mundschleimhaut begrenzt. Laut Datenbank-Analysen konzentrieren sich alle derzeit bekannten Allergene auf ca. 19 Familien der bekannten 9318 Proteinfamilien der Pfam-Datenbank. Sie weisen zudem Ähnlichkeiten in ihrer biologischen Funktionsweise auf, weshalb ein Zusammenhang zwischen der Allergenität und der physiologischen Funktion vermutet wird (Radauer et al. 2008).

1.2 Klassifikation der Allergie-Typen

Coombs und Gell teilten die verschiedenen allergischen Immunreaktionen 1963 in vier Typen ein. Typ I-Reaktionen werden über membrangebundene IgE-Antikörper vermittelt, während an Typ II- und Typ III-Reaktionen IgG-Antikörper beteiligt sind. Typ IV-Reaktionen werden über T-Lymphozyten vermittelt. Die Immunreaktionen laufen jedoch häufig gleichzeitig ab oder gehen ineinander über. Deshalb wird in der klinischen Praxis zwischen Soforttyp- (Typ I) und Spättyp-Reaktionen (Typen II bis IV) unterschieden. Bei Soforttyp-Allergien treten die Symptome bereits wenige Minuten nach dem Allergenkontakt ein, während bei Spättyp-Reaktionen einige Stunden bis zu einem Tag vergehen können. Allerdings können auch bei einer Soforttyp-Allergie noch zu einem späteren Zeitpunkt Beschwerden auftreten, die zu einer chronischen Entzündung führen können (sogenannte Spätreaktionen der Typ I-Allergie) (Trautmann und Kleine-Tebbe 2013).

Die Erdnussallergie, die in dieser Arbeit im Fokus steht, ist eine klassische Soforttyp-Allergie (Typ I-Allergie).

1.3 Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Für die Krankheitsentstehung von Typ I-Allergien ist eine Sensibilisierungsphase Voraussetzung, die beschwerdefrei und unbemerkt verläuft. Während der Sensibilisierungsphase ist die Überwindung der Epithelbarriere durch die Allergene der erste Schritt. In den Körper eingedrungen, werden die Allergene anschließend von Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (APC: Makrophagen, B-Lymphozyten, Dendritische Zellen) aufgenommen. Bei der Prozessierung entstehen Allergenfragmente, die über den MHC II-Komplex an der Zelloberfläche der Immunzellen präsentiert werden. Im nächsten Schritt binden naive T-Zellen, deren T-Zellrezeptor (TCR) zu dem Fragment/MHC II-Komplex passt, an die Antigen-präsentierenden Zellen. Dies führt zur Sekretion von Interleukin 4 (IL-4) und induziert

dadurch die weitere Differenzierung der naiven T-Zellen zu TH₂-Helferzellen (Rammensee et al. 1993) (Abb. 1a). Die TH₂-Helferzellen sezernieren große Mengen der Interleukine IL-4 und IL-13, wodurch B-Lymphozyten zur Produktion von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern stimuliert werden. Die IgE-Antikörper werden daraufhin ins Blut sezerniert und binden dort über den IgE-Rezeptor (FcεRI) an die Oberflächen von Mastzellen und basophilen Granulozyten (Kinet 1999) (Abb. 1b). Diese mit IgE-Antikörpern "beladenen" Immunzellen zirkulieren anschließend im Blut.

Bei einem erneuten Allergenkontakt kommt es zum eigentlichen Krankheitsbild ("Effektorphase"). In der Effektorphase trifft das Allergen nach der Aufnahme in den Körper auf die mit IgE-Antikörpern beladenen Immunzellen aus der Sensibilisierungsphase. Das Allergen bindet daraufhin an die Allergen-spezifischen IgE-Antikörper auf der Oberfläche der Mastzellen und basophilen Granulozyten. Hierdurch findet eine Kreuzvernetzung der FcεRI-Rezeptoren statt, mit denen die IgE-Antikörper an den Immunzellen gebunden sind. Hierdurch wird die Degranulierung der Zellen induziert und die in den Zellen befindlichen Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin, Chymase und Tryptase) freigesetzt. Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren führt dann zu den allergischen Symptomen (Abb. 1c). Neben den kurzlebigen Mediatoren werden auch Leukotriene, Cytokine und Chemokine sekretiert, die Spätreaktionen wie chronische Entzündungen verursachen können (Janeway et al. 2002, Trautmann u. Kleine-Tebbe 2013).

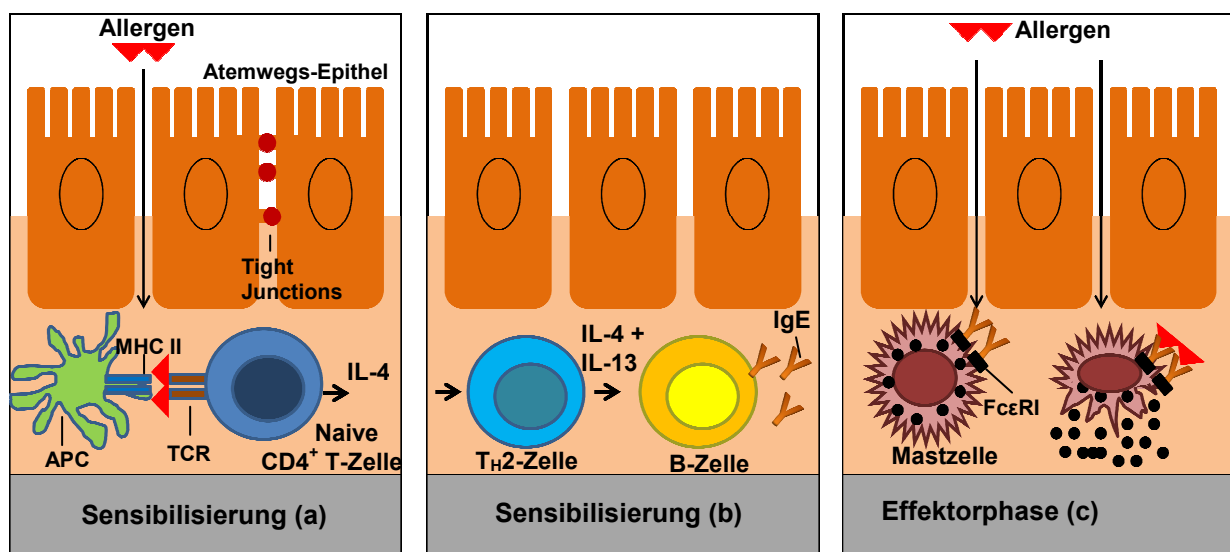


Abbildung 1: Pathomechanismus der Typ I-Allergie (verändert nach Janeway et al. 2002)

1.4 Nahrungsmittelallergien

Besonders Nahrungsmittelallergien haben in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen (Breiteneder und Mills 2005). In Deutschland leiden mittlerweile 20 % der Bevölkerung an mindestens einer Allergie, wobei bereits 4,7 % von einer Nahrungsmittelallergie betroffen sind, bei steigender Tendenz (Langen et al. 2013). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen Nahrungsmittelallergien in der Kindheit und dem Ausbruch von Neurodermitis und Asthma bronchiale im Erwachsenenalter beobachtet (Cochrane et al. 2009). Dies findet sich auch in der steigenden Asthmataendenz in der deutschen Bevölkerung wieder, die in den letzten 10 Jahren um 3 % gestiegen ist (Langen et al. 2013).

Bei der Nahrungsmittelallergie handelt es sich um eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen bestimmte Proteine oder Glykoproteine. Dabei unterscheidet man zwischen der IgE-Nahrungsmittelallergie, die sofort auftritt, und der Nicht-IgE-Nahrungsmittelallergie, die eine Spätreaktion des Immunsystems hervorruft (z.B. atopische Ekzeme, aber auch Übelkeit, Brechreiz und Durchfälle). Nahrungsmittelallergien werden von vielen verschiedenen Allergenen ausgelöst. Hauptsächlich findet die Sensibilisierung durch die Nahrung nach der Verdauung im Darm statt. Diese Allergien werden als Klasse I-Nahrungsmittelallergien bezeichnet (z.B. Kuhmilch-, Hühnerei-, Soja-, Weizen-, Fisch- und Erdnussallergien). Es ist jedoch auch möglich, dass die Sensibilisierung auf Kreuzreaktionen mit Pollenallergenen zurückzuführen ist. Diese werden als Klasse II-Nahrungsmittelallergien oder auch Kreuzallergien bezeichnet. In diesen Fällen treten bei Gräser- oder Baumpollenallergikern allergische Beschwerden nach dem Genuss zahlreicher Obst- und Gemüsesorten auf (z.B. Apfel, Sellerie, Karotte, Kirsche, aber auch Erdnüsse). Die Reaktionen werden als orales Allergiesyndrom (OAS) zusammengefasst und sind in der Regel auf die Mundschleimhaut begrenzt und lösen Jucken, Brennen oder Kratzen aus. Diese Allergene werden meistens durch Erhitzung zerstört, weshalb sie nur in rohem Zustand Beschwerden verursachen. Häufig werden sie auch während der Magen-Darm-Passage zersetzt (Untersmayr et al. 2006, Moreno et al. 2005). Bei Klasse I-Nahrungsmittelallergien treten stärkere Symptome auf. Meistens werden Erbrechen oder Durchfälle ausgelöst, aber auch schwere systemische Reaktionen an der Haut (Urtikaria, Flush, Erythem) oder den Atemwegen (Bronchospasmus) bis hin zum tödlichen anaphylaktischen Schock (Blutdruckabfall, Kreislaufschock, Atemstillstand) sind möglich. Diese treten aber eher selten auf; eine Ausnahme stellen Erdnussallergien dar, die besonders häufig zum Tode führen (Trautmann und Kleine-Tebbe 2013, Breiteneder et al. 2000).

Zu den häufigen Nahrungsallegenen bei Erwachsenen zählen die Pollen-assoziierten Nahrungsallegene (z.B. Baumnüsse, Apfel, Sellerie, Karotte, Soja), Erdnussallegene (Pollen-assoziierte und nicht-Pollen-assoziierte Erdnussallegien), Latex-assoziierte Nahrungsallegene wie z.B: Kiwi/Banane/Avocado, Krustentiere und Fische, Hühnerei und Kuhmilch. Bei Säuglingen und Kleinkindern sind vor allem Allergien gegen Kuhmilch, Hühnerei, Soja und Weizen besonders häufig, wohingegen Erdnuss-, Baumnuss- und Fischallergien seltener vorkommen (Trautmann und Kleine-Tebbe 2013). In Deutschland stehen nach aktuellen Daten die Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergien gegen Haselnuss, Pfirsich, Soja und Erdnuss im Vordergrund. In der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1, Erhebungszeitraum: 2008-2011) waren 25 % der untersuchten Personen gegen mindestens eines von 26 getesteten Nahrungsallegenen sensibilisiert, wobei 16 % auf Haselnuss, 12 % auf Pfirsich und Erdnuss (Ara h 8) und 10 % auf Soja sensibilisiert waren (Haftenberger et al. 2013).

1.5 Die Erdnussallergie

Die Erdnussallergie zählt zu den persistierenden Nahrungsmittelallergien, die in sehr jungen Jahren auftritt und meistens (in ca. 80 % der Fälle) bis in das Erwachsenenalter bestehen bleibt. Damit unterscheidet sie sich von den anderen häufigen Nahrungsmittelallergien (z.B. Kuhmilch-, Weizen-, und Hühnereiallegien), bei denen eine spontane Toleranzentwicklung ab dem 3. Lebensjahr bei über 70 % der Betroffenen auftritt (Skolnick et al. 2001, Fleischer et al. 2003). Die Erdnussallergie stellt ein besonders hohes Risiko dar, da bereits kleinste Mengen ($< 100 \mu\text{g}$ Protein) zu schweren allergischen Reaktionen führen können. Dies hängt wahrscheinlich mit dem hohen Allergengehalt zusammen. So machen die derzeit bekannten Erdnussallegene zusammen 85 % des Gesamtproteingehalts der Erdnuss aus (Hebling et al. 2012).

Erdnüsse gehören, wie Soja und Lupine, zur botanischen Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*). Aufgrund des hohen Energiegehaltes der Erdnuss, die zu 44-56 % aus Lipiden besteht und einen hohen Proteingehalt (22-30 %) aufweist, ist sie in vielen Kulturen fester Bestandteil der Ernährung (Sebei et al. 2013). Von der Nahrungsmittelindustrie werden Erdnüsse aufgrund des intensiven Geschmacks und der Textur vielfältig eingesetzt und sind somit auch in vielen verarbeiteten Produkten enthalten. Neben Schokolade, Kuchen, Gebäck und Fertiggerichten gibt es auch viele Kosmetika mit Erdnussöl (z.B. Hautpflege-Produkte für Neurodermitis, Badeöle/-cremes für die Babypflege).

1.5.1 Epidemiologie

Erdnussallergien kommen vorwiegend in den USA und England vor, wo sich die Zahl der Erdnussallergiker innerhalb von 10 Jahren auf ca. 2 % verdoppelt hat. Die Prävalenz ist weiterhin steigend (Hourihane et al 2007, Sicherer et al. 2003), wobei gleichzeitig eine Absenkung des Sensibilisierungsalters zu beobachten ist (Grundy et al. 2002). Obwohl Erdnüsse auch in asiatischen Ländern als wichtiger Bestandteil der landestypischen Küche verzehrt werden, sind Erdnussallergien dort weniger verbreitet (Shek et al. 2010). Dies wird mit der Zubereitungsart in Verbindung gebracht, da in Asien vorwiegend gekochte Erdnüsse verzehrt werden, während in den anderen Ländern geröstete Erdnüsse verwendet werden. Beim Kochen werden die Erdnussallergene teilweise zerstört, wohingegen Röstprozesse die IgE-Reaktivität verstärken (Maleki et al. 2000, Maleki et al. 2003, Turner et al. 2014).

In Deutschland ist vor allem bei Kindern eine zunehmende Sensibilisierung auf Erdnussallergene in den letzten Jahren beobachtet worden. Schätzungsweise sind derzeit 0,5 - 1 % von einer Erdnussallergie betroffen. In erster Linie ist dies auf Kreuzreaktionen mit Pollenallergenen zurückzuführen (Niggemann et al. 2011), da diese in den vergangenen Jahren in Deutschland zugenommen haben (ca. 20 %) (Vereda et al. 2011). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen Erdnussallergien im Kindesalter und einer später auftretenden Urtikaria (Niggemann et al. 2011, Brüske et al. 2013).

Auch zu den Birkenpollenallergikern gibt es häufig Assoziationen. Die meisten Birkenpollenallergiker (50 - 90 %) sind auf das Birkenpollenallergen Bet v 1 sensibilisiert (Wüthrich et al. 1995, Vieths et al. 2002, Jarolim et al. 1989, Moverare et al. 2002). Bis zu 90 % der Betroffenen zeigen zusätzlich IgE-vermittelte Kreuzreaktionen durch strukturähnliche Allergene aus bestimmten Obst-/Gemüsesorten, Haselnüssen, Erdnüssen oder Soja (Dreborg 1988, Geroldinger-Simic et al. 2011). Die allergischen Beschwerden sind meistens nicht stark ausgeprägt und werden nur von rohen Nahrungsmitteln ausgelöst, da die Allergene nicht hitzestabil und nicht proteaseresistent sind (Vieths et al. 2002, Bohle et al. 2006, Becker und Jappe 2014). Neue Untersuchungen der deutschen Bevölkerung zeigten eine starke Sensibilisierung auf das Erdnussallergen Ara h 8 (11,7 %), das eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Bet v 1 aufweist (Haftenberger et al. 2013, Vereda et al. 2011).

1.5.2 Symptome

Die klinischen Beschwerden bei Erdnussallergien sind vielfältig und können sich an unterschiedlichen Organen manifestieren. Zu den leichten Symptomen zählen Reaktionen an der Mundschleimhaut (orales Allergiesyndrom), im Gastrointestinaltrakt (Übelkeit, Diarrhoe) und leichtes Asthma. Das orale Allergiesyndrom (OAS) äußert sich im Mund (Kribbeln, Brennen, Kratzen) und an den Lippen (Ödem) und tritt während der Pollensaison häufig verstärkt auf. Die Ursache hierfür sind Kreuzreaktionen von Erdnussallergenen mit strukturähnlichen Pollenallergenen, wenn gleichzeitig eine Pollenallergie (z.B. gegen Birkenpollen) vorliegt.

Es gibt jedoch auch schwere systemische Reaktionen mit anaphylaktischen Symptomen (Hypotonie, Atemnot, Schock), die bei Erdnussallergien besonders oft auftreten. Somit ist die Erdnussallergie die häufigste Ursache für eine tödliche Nahrungsmittel-induzierte Anaphylaxie. Zur Risikogruppe gehören Erwachsene, die an chronischem Asthma leiden (Bock et al. 2001). Bei Patienten mit einer starken Sensibilisierung kann sogar der Hautkontakt mit Erdnüssen starke Reaktionen hervorrufen (Tan et al. 2001). Bei diesen Patienten wurden neben den klassischen Typ I-Symptomen auch atopische Ekzeme der Haut beschrieben (Asero et al. 2010). Erdnüsse werden von der Nahrungsmittelindustrie vielseitig verwendet (z.B. in Gebäcksorten, Saucen, Fertiggerichten) und können in Spuren auch in Nahrungsmitteln vorhanden sein, die auf den ersten Blick keine Erdnüsse enthalten. Dadurch können schwere Allergiesymptome verursacht werden (Hourihane et al. 1997). Vor allem Kinder sind gefährdet, versehentlich Erdnüsse zu konsumieren, die in vielen Gebäcksorten, Schokolade, Riegeln u.ä. enthalten sind (Yu et al. 2006).

1.5.3 Diagnostik und Therapie

Die klassische Allergiediagnostik besteht aus der Anamnese im Patientengespräch, einem Provokationstest mit dem potentiellen Allergen (z.B. Pricktest, Verzehr des Nahrungsmittels, Inhalation des Allergens) und Blutuntersuchungen. Bei Patienten mit einer Erdnussallergie können aufgrund der schweren Symptomatik häufig keine Provokationstests durchgeführt werden. Deshalb ist die Analyse der Antikörperzusammensetzung des Blutes (v.a. IgE-Konzentration) neben der Anamnese das wichtigste Instrument für die Diagnose (Tibbott und Clark 2014).

Die quantitative Bestimmung der Allergen-spezifischen IgE-Antikörper wird meistens mit Fluoreszenz-markierten Allergenen im Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay (CAP-FEIA-Analyse) durchgeführt (sogenannte "Einzelallergendiagnostik"). Hierfür werden rekombinant hergestellte Allergene eingesetzt, um einen einheitlichen Qualitätsstandard zu gewährleisten. Nachdem die Allergene im Erdnussextrakt identifiziert und die molekularen Eigenschaften untersucht worden sind, dienen die natürlichen Allergene als Vorlage und Referenz für die Herstellung.

Eine sichere spezifische Immuntherapie zur Toleranzentwicklung (Hyposensibilisierung) gegen Erdnüsse gibt es derzeit noch nicht, da in der Vergangenheit z.T. schwerste systemische Reaktionen während der Therapie aufgetreten (Fleischer et al. 2013) sind. Zwar zeigen Studien sowohl bei der oralen (OIT) als auch bei der sublingualen Immuntherapie (SLIT) eine Toleranzentwicklung, sodass oft kleine Erdnussmengen (bis zu 2 g) von Allergikern vertragen werden (Clark et al. 2009, Kim et al. 2011, Anagnostou et al. 2011). Jedoch fehlen noch Daten, um die Sicherheit der Therapien zu gewährleisten. Anaphylaxie-gefährdete Patienten werden zudem häufig wegen der hohen Risiken von der Therapie ausgeschlossen (Sun et al. 2014, Wang und Sampson 2013).

Aufgrund der schweren Symptomatik wird in den meisten Fällen eine vollständige Erdnusskarenz für Erdnussallergiker empfohlen (Anagnostou und Clark 2014). Um einen Schock zu verhindern, erhalten Anaphylaxie-gefährdete Patienten ein Notfall-Set mit einem Antihistamin-Präparat, Kortisontropfen und einem Adrenalin-Autoinjektor zur Selbstinjektion (Sampson et al. 2004).

1.5.4 Sensibilisierung

Die Sensibilisierung erfolgt bei Erdnussallergien in erster Linie durch erdnusshaltige Nahrungsmittel nach der Prozessierung im Darmlumen. Eine sekundäre Sensibilisierung kann jedoch auch aerogen durch inhalative Allergene erfolgen (Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie). Neben diesen beiden klassischen Sensibilisierungswegen kann theoretisch auch der Hautkontakt bei gestörter Barrierefunktion (z.B. bei atopischem Ekzem) zur intrakutanen Sensibilisierung führen (Trautmann und Kleine-Tebbe 2013). Das Allergierisiko durch Bädungen oder Cremes auf Erdnussöl-Basis ist jedoch noch unklar, da die Allergene im Erdnussöl ("lipophile Allergene") bisher nicht ausreichend untersucht wurden bzw. nicht identifiziert werden konnten.

1.5.5 Die Allergene der Erdnuss

Derzeit sind 17 Erdnussallergene mit ihren Isoformen bei der "International Union of Immunological Societies" (IUIS) registriert. Abgeleitet vom botanischen Namen *Arachis hypogaea* werden die Allergene mit "Ara h" bezeichnet, gefolgt von der Allergennummer. Das ehemals als "Ara h 4" bezeichnete Allergen wurde in Ara h 3.0201 umbenannt, da es sich um eine Ara h 3-Isoform handelt, deren Proteinsequenz zu 92 % mit Ara h 3 übereinstimmt.

Tabelle 1: Übersicht der Erdnussallergene (Stand: November 2015)

Allergen	Isoallergen	kDa	Proteinfamilie
Ara h 1	Ara h 1.0101	63,5	Vicilin (7S-Globulin)
Ara h 3	Ara h 3.0101/Ara h 3.0201 (ehem. Ara h 4)	60,0	Legumin (11S-Globulin)
Ara h 2	Ara h 2.0101/Ara h 2.0201	16,6/18,0	2S-Albumin
Ara h 6	Ara h 6.0101	15,0	2S-Albumin
Ara h 7	Ara h 7.0101/Ara h 7.0201	16,4/17,4	2S-Albumin
Ara h 9	Ara h 9.0101/Ara h 9.0201	9,1/9,1	nsLTP
Ara h 8	Ara h 8.0101/Ara h 8.0201	17,0	Bet v 1-Familie
Ara h 5	Ara h 5.0101	14,0	Profilin
Ara h 10	Ara h 10.0101/Ara h 10.0102	16,0	Oleosin
Ara h 11	Ara h 11.0101/Ara h 11.0102	14,3	Oleosin
Ara h 12	Ara h 12.0101	5,2	Pflanzl. Defensin
Ara h 13	Ara h 13.0101	8,4	Pflanzl. Defensin
Ara h 14	Ara h 14.0101/Ara h 14.0102/Ara h 14.0103	17,5	Oleosin
Ara h 15	Ara h 15.0101	17,0	Oleosin
Ara h 16	Ara h 16.0101	8,5	LTP
Ara h 17	Ara h 17.0101	11,0	LTP

1.5.5.1 Die Majorallergene (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 und Ara h 6)

Bei den meisten Erdnussallergikern ist eine Sensibilisierung auf die Speicherproteine Ara h 1 (7S-Globulin), Ara h 2 (2S-Albumin), und Ara h 3 (11S-Globulin) zu beobachten, die zusammen 75 % des Gesamtproteingehalts der Erdnuss ausmachen (Burks et al. 1998, Hebling et al. 2012). Über 95 % zeigen eine IgE-Reaktivität auf Ara h 1 und Ara h 2 (Burks et al. 1991, Burks et al. 1995, Stanley et al. 1997), während 45 % auf Ara h 3 reagieren (Rabjohn et al.

1999). Das 2S-Albumin Ara h 6 zählte lange Zeit nicht zu den klassischen Hauptallergenen. Flinterman und Kollegen (2007) wiesen jedoch bei Kindern Ko-Sensibilisierungen von Ara h 2 und Ara h 6 nach, die zu schwersten Allergiesymptomen führten. Dies wurde durch neue Untersuchungen bestätigt, sodass Ara h 6 ebenfalls als Marker-Allergen in der Diagnostik verwendet werden kann (Klemans et al. 2014). Die 2S-Albumine Ara h 6 und Ara h 2 stimmen in ihrer Proteinsequenz zu 53 % überein und verfügen über 10 (Ara h 6) bzw. 8 Cysteinreste (Ara h 2), die durch Ausbildung von Disulfidbrücken für eine hohe Stabilität sorgen (Suhr et al. 2004, Kreis et al. 1985, Shewry et al. 2006).

Häufig liegen Sensibilisierungen gegen mehrere Erdnussallergene vor. Die gleichzeitige Sensibilisierung auf Ara h 2 und Ara h 1 bzw. Ara h 3 führt in den meisten Fällen zu schweren allergischen Reaktionen mit Anaphylaxie-Symptomen (Astier et al. 2006, Bublin et al. 2013). Lediglich beim Ara h 2 wurden Monosensibilisierungen beobachtet (Nicolaou et al. 2010). Ara h 2 ist ein Trypsin-Inhibitor und weist deshalb eine hohe Stabilität im Verdauungstrakt auf, was vermutlich im Zusammenhang mit der starken Allergenität steht (Maleki et al. 2003). Röstprozesse wie die Maillard-Reaktion verstärken die Stabilität und die IgE-Reaktivität des Proteins (Maleki et al. 2000, Maleki et al. 2003, Gruber et al. 2005); deshalb können auch verarbeitete Erdnüsse starke allergische Reaktionen auslösen (z.B. in Erdnussbutter).

Die Sensibilisierung findet bei den Hauptallergenen Ara h 1, 2, 3 und 6 nach dem Verzehr von Erdnüssen im Darm statt. Sie verursachen demnach Klasse I-Nahrungsmittelallergien. Sie sind hitze- und proteaseresistent (Maleki et al. 2000, Maleki et al. 2003, Suhr et al. 2004).

1.5.5.2 Intermediäre und Minorallergene (Ara h 5 und Ara h 7-17)

Erdnussallergene mit geringer klinischer Relevanz: Ara h 5 und Ara h 7

Das Profilin Ara h 5 ist ein Minorallergen, welches bei der Pollen-assoziierten Erdnussallergie involviert und demnach eine Klasse II-Nahrungsmittelallergie verursacht. Theoretisch sind Kreuzreaktionen zum Birkenpollenallergen Bet v 2 oder dem Lieschgrasallergen Phl p 12 möglich (Cabanos et al. 2010), jedoch konnten bisher nur Reaktionen mit dem Lieschgrasallergen nachgewiesen werden (Kleber-Janke et al. 1999, Kleber-Janke 2001). Die Sensibilisierungsrate beträgt 3,3 % in den USA, 9-16 % in Nordeuropa und 24 %

in Spanien (Vereda et al. 2011). Ara h 5 weist eine hohe Thermostabilität auf, die untypisch für Profilin ist (Kleber-Janke 2001, Breiteneder und Radauer 2004).

Ara h 7 gehört zu den 2S-Albuminen, die typischerweise über 8 Cysteinreste verfügen. Das Allergen wurde erstmalig 1999 mittels Phage-Display gefunden, und die IgE-Reaktivität bei 43 % der untersuchten Patientenseren nachgewiesen (Kleber-Jahnke et al. 1999). Das auf Genebene entdeckte Allergen wurde als Ara h 7.0101 bezeichnet, wies jedoch nur 6 Cysteinreste auf, was für 2S-Albumine untypisch ist. Erst wesentlich später wurde im Erdnuss-extrakt das natürliche Allergen gefunden. Anstatt des Ara h 7.0101 wurden zwei neue Isoformen im Extrakt entdeckt, die als Ara h 7.0201 und Ara h 7.0202 bezeichnet wurden. Diese wiesen die typischen 8 Cysteinreste auf (Schmidt et al. 2010). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass Ara h 7 als Amylase- oder Trypsin-Inhibitor wirken kann, da Ara h 7.0202 über eine Spaltstelle verfügt, die typisch für 2S-Albumine mit dieser Enzymfunktion sind. Jedenfalls ist die Konzentration von Ara h 7 im Erdnuss-extrakt sehr gering, weshalb es als Erdnussallergen von geringer Bedeutung zu sein scheint (Bublin und Breiteneder 2013).

Ara h 9 (LTP) ist ein wichtiges Allergen für die südeuropäische Bevölkerung

Ara h 9 gehört zur Gruppe der nicht-spezifischen Lipid-Transfer-Proteine (nsLTP), die am pflanzlichen Lipidtransport beteiligt sind, jedoch keine spezifische Liganden haben. Sie sind sehr stabil und wurden als Allergene in zahlreichen, nicht artverwandten Pflanzen gefunden (Asero et al. 2000). Das Prolamin Ara h 9 löst bei Patienten aus dem Mittelmeerraum starke systemische und anaphylaktische Reaktionen (Urtikaria, Angioödem, Anaphylaxie) aus (Lauer et al. 2009, Krause et al. 2009, Arkwright et al. 2013). Bei den untersuchten Patienten lag eine primäre Sensibilisierung durch das Pflanzallergen Pru p 3 vor, die zu einer Kreuzreaktion mit Ara h 9 führte. Es handelt sich demnach um eine Klasse II-Nahrungsmittelallergie. Ara h 9 weist eine starke Resistenz gegenüber Proteasen des Verdauungstrakts auf, was untypisch für Klasse II-Nahrungsmittelallergene ist. Vermutlich steht dies im Zusammenhang mit den starken klinischen Beschwerden, die ebenfalls uncharakteristisch für Klasse II-Nahrungsmittelallergien sind (Lauer et al. 2009, Javaloyes et al. 2012).

Oleosine (Ara h 10, 11, 14 und 15)

Oleosine sind Proteine, die durch die Bildung von sogenannten "Öl-Körperchen" an der Speicherung von pflanzlichen Triacylglycerolen beteiligt sind (Huang et al. 1996). Sie weisen deshalb eine hohe Affinität zu Lipiden auf. Durch ihre lipophilen Eigenschaften sind Oleosine nur schwer mit wässrigen Puffersystemen zu isolieren. Erstmals wurde 2002 ein 18 kDa großes Erdnuss-Oleosin entdeckt und als Minorallergen beschrieben (später: Ara h 14) (Pons et al. 2002). Jedoch wurden erst 2008 zwei Erdnuss-Oleosine als Allergene angemeldet (Ara h 10 und Ara h 11), obwohl die klinische Relevanz lange Zeit ungeklärt blieb. Bis heute (November 2015) ist nur eine Publikation erschienen, welche die IgE-Reaktivität in Zusammenhang mit klinischen Symptomen nachweisen konnte (Schwager et al. 2015).

In herkömmlichen Erdnussextrakten, die für die Allergiediagnostik verwendet werden, sind die Erdnuss-Oleosine kaum vorhanden, da sie auf wässrigen Puffersystemen basieren. Demzufolge werden sie in der Allergiediagnostik momentan kaum berücksichtigt.

Defensine (Ara h 12 und 13) und Lipid-Transfer-Proteine (Ara h 16 und 17)

Die zur Gruppe der Defensine gehörenden Allergene Ara h 12 und Ara h 13 wurden von unserer Arbeitsgruppe erstmalig 2012 angemeldet. Es handelt sich dabei um cysteinreiche Proteine, die vorwiegend als Dimere vorliegen und sehr stabil sind (Petersen et al. 2012). Pflanzliche Defensine sind Proteine mit geringem Molekulargewicht, die eine hohe Stabilität aufweisen und an der pflanzlichen Abwehr gegen Bakterien und Pilze beteiligt sind (Sagaram et al. 2011). Die klinische Relevanz ist noch nicht ausreichend untersucht worden. Es konnten jedoch IgE-Reaktivitäten bei einigen Patienten mit schwerer Erdnussallergie nachgewiesen werden (Petersen et al. 2015, Petersen et al. 2012). Die Allergene Gly m 2 aus Soja und das Hauptallergen Art v 1 aus Beifuß gehören beide zur Familie der Defensine, weisen jedoch nur eine geringe Sequenzähnlichkeit mit Ara h 12 und Ara h 13 auf, sodass Kreuzreaktionen unwahrscheinlich sind (Bublin und Breiteneder 2014).

Über die erst kürzlich (Mai 2015) als Allergen angemeldeten Lipid-Transfer-Proteine Ara h 16 und Ara h 17 ist noch nicht viel bekannt. Die IgE-Reaktivität wurde zwar im Immunoblot nachgewiesen, jedoch fehlt noch eine Publikation zu diesem Thema, sodass die klinische Relevanz bisher noch nicht geklärt werden konnte.

Ara h 8 als Hauptauslöser von Kreuzreaktionen bei Birkenpollenallergikern

Ara h 8 gehört zu den Bet v 1-homologen Allergenen und ist der Hauptauslöser für allergische Beschwerden bei Patienten, die gleichzeitig unter einer Erdnuss- und unter einer Birkenpollenallergie leiden (Mittag et al. 2004, Vereda et al. 2011). Die primäre Sensibilisierung ist hierbei gegen das Birkenpollenallergen Bet v 1 gerichtet, und die starke strukturelle Ähnlichkeit des Ara h 8 zu Bet v 1 verursacht die Allergie-Symptome (Kreuzallergie). Es handelt sich demnach um eine Klasse II-Nahrungsmittelallergie. Bei diesen Patienten löst der Verzehr von Erdnüssen Schluckbeschwerden, Jucken/Brennen im Mund (OAS) und in selteneren Fällen Atemnot, Urtikaria oder Reaktionen des Gastrointestinaltrakts wie Erbrechen und Durchfall aus (Mittag et al. 2004, Petersen et al. 2014). In einem Fall führten große Erdnuss-Mengen (300 g) sogar zu einem anaphylaktischen Schock, der auf Ara h 8 zurückzuführen war, was untypisch für Bet v 1-homologe Allergene ist (Glaumann et al. 2014).

Es gibt zwei Isoformen beim Ara h 8, die als Ara h 8.0101 und Ara h 8.0201 registriert wurden. Beide Isoallergene wurden aus cDNA kloniert, rekombinant hergestellt und die IgE-Reaktivität am rekombinanten Protein nachgewiesen (Mittag et al. 2004, Riecken et al. 2008). Jedoch konnte bisher nur Ara h 8.0201 im Erdnussextrakt nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass dies die klinisch relevantere Isoform ist (Riecken et al. 2008, White et al. 2013).

Zur physiologischen Funktionsweise von Ara h 8 ist bisher nichts bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Mitglieder der Bet v 1-Familie eine Ribonuklease (RNase)-Aktivität aufweisen oder als Steroid-Carrier wirken und Lipide binden können (Bufe et al. 1996, Bantignies et al. 2000, Mattila und Renkonen 2009, Seutter von Loetzen et al. 2014). Verantwortlich für die RNase-Aktivität sind eine konservierte Glycin-reiche Region (-GXGGXG-), die als p-loop Motiv bezeichnet wird sowie zwei konservierte Aminosäuren in der C-terminalen Helix (E147/Y149) (Chadha und Das 2006, Wu et al. 2003, Zhou et al. 2002). Bet v 1-homologe Allergene gehören zu einer Gruppe von pflanzlichen Abwehrproteinen (PR-10 Proteine), die bei Keimbefall von der Pflanze vermehrt exprimiert werden und deren Gehalt in der gesunden Pflanze deshalb gering ist (Liu und Ekramoddoullah 2006). Vermutlich ist dies auch der Grund dafür, warum natürliches Ara h 8 nur sehr schwer zu isolieren ist. Deshalb wurden Untersuchungen zur Stabilität bisher nur am rekombinanten Allergen durchgeführt. Ara h 8.0101 ist nicht Protease resistent und weist nur eine sehr geringe

Hitzestabilität auf (Mittag et al. 2004); über die Stabilität von Ara h 8.0201 ist bisher nichts bekannt.

Nach aktuellen Daten zählen zu den wichtigsten Nahrungsmittelallergenen in Deutschland insbesondere die Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergene der Haselnuss, Pfirsich, Soja und Erdnuss (Haftenberger et al. 2013, DEGS1-Studie: Erhebungszeitraum 2008-2011). Desweiteren liegt derzeit bereits bei 12 % in der deutschen Bevölkerung eine Sensibilisierung auf das Erdnussallergen Ara h 8 vor (Haftenberger et al. 2013).

1.6 Zielsetzung

Da es immer mehr Birkenpollen-Allergiker in Deutschland gibt, die auf Ara h 8 sensibilisiert sind, stellt sich die Frage, ob damit auch ein erhöhtes Risiko für eine Erdnussallergie verbunden ist. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Struktur des Bet v 1-homologen Erdnussallergens Ara h 8 und die physiologische Funktion bezüglich seiner Allergenität untersucht werden.

Um das allergene Potenzial von Ara h 8 beurteilen zu können, muss das natürliche Allergen isoliert und die molekularen Eigenschaften charakterisiert werden. Ara h 8 kann in Einzelfällen starke anaphylaktische Reaktionen auslösen, die untypisch für Bet v 1-homologe Allergene sind. Auch bei dem homologen Allergen aus der Sojapflanze, dem Gly m 4 (frühere Benennung: SAM22) wurden bereits ernste anaphylaktische Allergie-Reaktionen beobachtet (Kleine-Tebbe et al. 2002). Allerdings kommt Gly m 4 in der Sojabohne in großen Mengen vor (bis zu 256 ppm) (Mittag et al. 2004); deshalb stehen die starken Symptome vermutlich in Zusammenhang mit der aufgenommenen Allergen-Menge. Anders als beim Gly m 4 ist der Ara h 8-Gehalt in der Erdnuss jedoch sehr gering (Riecken et al. 2008). Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob Ara h 8 molekulare Eigenschaften aufweist, die mit den schweren Symptomen in Verbindung stehen können. Bisher konnte natürliches Ara h 8 nicht oder nur in sehr geringer Menge isoliert werden. Es muss daher eine neue Methode entwickelt werden, um Ara h 8 erfolgreich zu isolieren.

Die Stabilität spielt bei Nahrungsmittelallergenen eine zentrale Rolle sowohl für den Schweregrad der Symptome als auch für den Sensibilisierungsweg. Da nicht abgebaute Allergene länger im Körper verweilen, können dadurch stärkere Beschwerden ausgelöst werden. Außerdem können nur die Allergene im Darm sensibilisierend wirken, die nicht oder nur teilweise von den Enzymen des Gastrointestinaltrakts abgebaut wurden. Deshalb sollen die Hitze-stabilität und die Resistenz gegenüber Proteasen am natürlichen Allergen untersucht werden. Um das Allergen umfangreich zu charakterisieren, soll auch die biologische Funktionsweise untersucht werden. Ara h 8 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die an der Abwehr von Schädlingen beteiligt ist. Um die Wirkungsweise zu analysieren, soll überprüft werden, ob das Allergen eine Ribonuklease-Funktion besitzt und dadurch die RNA der Schädlinge zerstört. Untersuchungen des strukturverwandten Allergens Bet v 1 zeigten außerdem, dass das Allergen Lipide binden kann. Deshalb soll die Frage beantwortet werden, ob dies auch auf Ara h 8 zutrifft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Standardchemikalien wurden von den Firmen Sigma (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Ausnahmen wurden im Methodenteil gesondert vermerkt. Alle Puffer, Stammlösungen und Nährmedien wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q-academic Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt (im Folgenden Milli-Q-H₂O genannt).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die Säulen und Verbrauchsmaterialien für die Chromatographie wurden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

Sterile Pipetten	(1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	(10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	(1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen	(ø 9 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Microtiterplatten	(96 well ELISA Platten)	Greiner (Frickenhausen)
Sterilfilter	(0,22 µm, 0,45 µm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Filtrationseinheit	(150 ml, 250 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.3 Geräte

HPLC-Anlage	ÄKTApurifier (Amersham Biosciences)
FPLC-Anlage	ÄKTAprime (Amersham Biosciences)
Speedvac	SPD12P (Thermo Savant, Holbrook, USA)

Gefriertrocknungsanlage LYOVAC GT2 (Leybold-Heraeus, Köln)

2.1.4 Antikörper und Patientenserum

Patientenserum

Patientenserum von Erdnussallergikern wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Uta Jappe aus der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel und der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Lübeck zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden vorwiegend 5 Patientenserum mit einer kombinierten Birkenpollen- und Erdnussallergie verwendet, die folgende Allergen-spezifische IgE-Konzentrationen aufwiesen (ermittelt durch Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay (CAP-FEIA Analyse, Phadia, Freiburg)). Die Patienten wurden über die Verwendung des Materials aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die Versuche wurden von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

Tabelle 2: Klinische Daten der Patientenserum

Patient Nr.	CAP-FEIA (kU/l)		klinische Symptome	CAP-Klasse	
	Bet v 1	Ara h 8		Bet v 1	Ara h 8
1	>100	>100	Juckreiz in Mund und Ohren, Halsschwellung nach Verzehr von frischen Erdnüssen	6	6
2	20,4	17,5	Juckreiz im Hals, Atembeschwerden nach Verzehr von frischen Erdnüssen	4	4
3	35,9	16,3	orales Allergiesyndrom und saisonale Rhinitis	4	3
4	72,0	10,6	orales Allergiesyndrom und saisonale Rhinitis	5	3
5	81,9	17,5	orales Allergiesyndrom und saisonale Rhinitis	5	4

Allergene lösen bei Bindung an das auf Mastzellen gebundene spezifische IgE eine Typ I-Allergie aus. In Tabelle 2 ist die Konzentration von Bet v 1- bzw. Ara h 8-spezifischem IgE dargestellt. Obwohl Allergen-spezifische IgE-Konzentrationen ab CAP-Klasse 2 auf eine vorhandene Allergie hinweisen, zeigen inhalative Allergene bei Allergieklienten meist starke Sensibilisierungen der CAP-Klassen 4-6, selten unter Klasse 3 außerhalb der Pollensaison. (Quelle: www.schottdorf.de/allergiediagnostik.pdf)

Monoklonale und polyklonale Antikörper**Tabelle 3:** Primärantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Firma
Kaninchen anti-Gly m 4	Gly m 4 aus Soja und kreuzreaktiv mit Ara h 8 aus Erdnuss	Forschungszentrum Borstel
Maus anti-penta His	Histidin-Tag	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Maus anti-Bet v 1	Bet v 1 aus Birkenpollen	Allergopharma (Reinbek)

Tabelle 4: Sekundärantikörper (konjugiert mit alkalischer Phosphatase)

Bezeichnung	Spezifität	Firma
Ziege anti-Kaninchen IgG	Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, PA, USA)
Ziege anti-Maus IgG + IgM	Maus IgG + IgM	Jackson Immuno Research
Maus anti-human IgE	Human IgE	Allergopharma

2.1.5 Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich Bakterien des Stammes *Escherichia coli* verwendet. Die Stämme *E.coli* DH5 α und *E.coli* Top 10 wurden für Klonierungsarbeiten eingesetzt, während *E.coli* BL21(DE3) für die Expression von Erdnussproteinen benutzt wurde. Der Expressionsstamm BL21(DE3) verfügt über eine T7 RNA Polymerase, die an den T7 Promotor des Expressionsvektors binden kann und die Expression induziert. Die T7 RNA Polymerase selbst wird durch Zugabe von IPTG aktiviert.

Tabelle 5: Bakterienstämme zur Klonierung und Expression von Erdnussproteinen

Bezeichnung	Genotyp	Firma
<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
<i>E.coli</i> Top 10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Life Technologies (Carlsbad, USA)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	<i>F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)</i>	Merck (Darmstadt)

2.1.6 Nährmedien

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte in Luria Broth (LB)-Medium (pH 7,4). Alle Medien wurden mit Milli-Q-H₂O angesetzt und autoklaviert. Die Antibiotika zur Selektion der Expressionsklone wurden dem abgekühlten Medium hinzugefügt, da diese hitzeempfindlich sind. Es wurden folgende Selektivnährmedien hergestellt: bei Ampicillin-Resistenz des Vektors wurden 100 µg/ml Ampicillin verwendet, für Kanamycin-resistente Plasmide wurden 50 µg/ml Kanamycin zum Medium gegeben. Für die Kultivierung von keimfähigen Erdnüssen und die anschließende Infektion mit Schimmelpilzkulturen der Gattung *Aspergillus niger* wurden Sabouraud-Agar-Platten (pH 5,6) verwendet.

Tabelle 6: Nährmedien

Zusammensetzung	LB- Flüssigmedium	LB-Agar- Platten	Sabouraud-Agar- Platten
Pepton	10 g/l	10 g/l	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l	5 g/l	-
Natriumchlorid	10 g/l	10 g/l	-
Agar	-	1,5 % (w/v)	2 % (w/v)
Glukose	-	-	20 g/l

2.1.7 Plasmide

Für die Klonierung und rekombinante Expression von Erdnussallergenen wurden folgende Plasmide verwendet.

Tabelle 7: Expressions- und Klonierungsvektoren

Plasmid	Verwendung	Größe (bp)	Promo- tor	Resistenz	Eigen- schaften	Firma
pGEM-T easy	Klonierungsvektor	3015	T7, SP6	Ampicillin	lacZ-Gen linearisiert	Promega (Mannheim)
pCR2.1TOPO	Klonierungsvektor	3931	T7	Ampicillin Kanamycin	lacZ-Gen linearisiert	Novagen (Darmstadt)
pET23b	Expressionsvektor	3666	T7	Ampicillin	C-term. His-Tag	Novagen (Darmstadt)

Da die Taq-Polymerase eine terminale Transferaseaktivität besitzt, die ein einzelnes Desoxyadenosin an 3'-Enden von PCR Produkten anhängt, müssen Klonierungsvektoren über die passenden 3'-Thymidin-Überhänge verfügen. Die Klonierungsvektoren pGEM-T easy und pCR2.1 Topo verfügen über 3'-Thymidin-Überhänge, mit denen PCR-Produkte ligiert werden können.

Tabelle 8: Genkonstrukte für die rekombinante Proteinexpression (inkl. Plasmid)

Plasmid	Allergen	Größe	MW expr. Protein	Resistenz	Poly- Histidin- Schwanz	Restriktionsenzyme
pET23b-Ara h 8.0201	Ara h 8.0201	4055 bp	18 kDa	Ampicillin	6 x Histidin (C-Term.)	<i>XhoI, NdeI</i>
pET17b-Oleosin	Ara h 14.0101 (Oleosin) ohne hydrophobe Proteindomäne	3543 bp	12 kDa	Ampicillin	6 x Histidin (zwischen N- und C-term. Fragment)	<i>NdeI, EcoRI</i>
pET23b-Ara h 8 K54N	Ara h 8.0201 mit Mutation in der p-loop Region	4055 bp	18 kDa	Ampicillin	6 x Histidin (C-Term.)	<i>NdeI, XhoI</i>
pET23b-Ara h 8E147A/Y149A	Ara h 8.0201 mit Mutation am C-Terminus	4049 bp	18 kDa	Ampicillin	6 x Histidin (C-Term.)	<i>NdeI, XhoI</i>

Die Plasmide für die rekombinante Herstellung der Allergene Ara h 8.0201 und Ara h 14.0101 (Oleosin) wurden freundlicherweise von Dr. Susanne Krause (ehemals: Arbeitsgruppe Molekulare und Klinische Allergologie, Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Bei dem Oleosin-Konstrukt wurde der hydrophobe Mittelteil des Allergens gentechnisch entfernt, um eine bessere Löslichkeit für die rekombinante Proteinherstellung in *E.coli* zu erreichen (Doktorarbeit Susanne Krause, Lübeck 2008).

2.1.8 Oligonukleotide

Für die Herstellung und Amplifikation der Mutante Ara h 8 Mut K54N wurden folgende Primer eingesetzt:

Tabelle 9: Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR zur Herstellung von Ara h 8 K54N

Bezeichnung	Sequenz (5' 3')	Schnittstelle	Schmelztemp.
Ara h 8 f <i>NdeI</i> fw	<u>CATAT</u> GGCTAGCGGCGTG	<i>NdeI</i>	61,0 °C
F 8 reverse	GCGGTCACTTT G TTTCACGGTGCC	/	66,0 °C
F 8 forward	GGCACCGTGAAC C AAAGTGACCGC	/	66,0 °C
Ara h 8 <i>XhoI</i> rv	<u>CTCGAG</u> GTTGCTCAGAACATAG	<i>XhoI</i>	60,3 °C

Die fettgedruckte Base kennzeichnet die Mutation, welche für den Aminosäure-Austausch bei der Ara h 8 Mutante verantwortlich ist (K54 wird durch A54 ersetzt). Schnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

2.1.9 Verwendete Erdnussorten

Standard-Erdnüsse: Jumbo Riesen geröstet (Seeberger, Ulm)
 Unbehandelte Erdnüsse: Spanish Type (Max Kiene GmbH, Hamburg)

2.1.10 Computerprogramme

Außer den Standard-Computerprogrammen wurden in dieser Arbeit die folgenden Programme verwendet:

Software

Vector NTI 6.0 (InforMax, North Bethesda, USA)
 Clustalomega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)
 Boxshade v3.31 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/>)
 ExPASy (www.expasy.org)
 NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)
 NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)
 Protein Data Bank (www.pdb.org)

Verwendungszweck

DNA- und Proteinanalysen
 Proteinsequenz-Vergleiche
 Darstellung von Proteinalignments
 Analyse von Proteinsequenzen
 Abgleich von Proteinsequenzen
 in Proteindatenbanken
 Abgleich von Gensequenzen in
 Gendatenbanken
 Proteindatenbank

Pubmed (www.pubmed.gov)	Datenbank für wiss. Veröffentlichungen
EST Data Bank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/)	EST-Sequenzdatenbank
Mascot (http://www.matrixscience.com)	Proteinidentifikation durch Eingabe von massenspektrometrischen Daten (Peptidmassen-Fingerab- druck)
biotool 2.0 (Bruker Daltonics)	Software zur Auswertung von Massenspektrometrie-Daten

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA aus Bakterienzellen zu isolieren, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert und anschließend zentrifugiert (1 min, 12000 x g, 20 °C). Die DNA wurde aus den sedimentierten Bakterienzellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim 1983) gelöst und anschließend über einen Anionenaustauscher gereinigt und mit Milli-Q-H₂O eluiert.

2.2.2 Präzipitation von DNA

Zur Reinigung, Konzentrierung und Umpufferung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde die DNA-Präzipitation mittels Isopropanol-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden zu einem Volumen DNA zwei Volumina Isopropanol hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren (20 min, 15000 x g, 4 °C) wurde das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in Milli-Q-H₂O gelöst.

2.2.3 Konzentration und Reinheitsgrad von DNA

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA erfolgte mittels UV-Absorptionspektroskopie in einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf Hamburg). Die DNA-Probe wurde im Verhältnis 1:50 mit Milli-Q-H₂O verdünnt und die Absorption bei der Wellenlänge 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) in einer Quarzküvette gemessen.

Die Berechnung der Konzentration der DNA erfolgte automatisch durch das Photometer gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz.

Lambert-Beersches Gesetz: Die Abschwächung der Lichtintensität bei der Durchstrahlung eines absorbierenden Mediums erfolgt in Abhängigkeit zur Konzentration des Stoffes und der Schichtdicke:

$$c(\text{DNA}) = A_{260} / (\epsilon \times d)$$

(c: Konzentration der DNA [$\mu\text{g/ml}$], A_{260} : gemessene Absorption bei 260 nm, ϵ : Extinktionskoeffizient (für dsDNA: $\epsilon = 50$), d: Schichtdicke der verwendeten Küvette)

Die Reinheit der DNA bezüglich Protein-Verunreinigungen ergibt sich aus dem Koeffizienten A_{260}/A_{280} . Es wurde ein Wert zwischen 1,6 und 1,8 angestrebt, da geringere Werte $< 1,6$ auf eine Verunreinigung mit Proteinen hinweisen und höhere Werte auf eine Kontamination mit RNA hindeuten.

2.2.4 Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Bestimmung der Fragment- und Vektorgrößen aus PCR-Reaktionen und DNA-Restriktionen bei der Herstellung der Ara h 8-Mutanten sowie zum RNase-Nachweis von Ara h 8 wurden die DNA-Fragmente in Agarosegelen aufgetrennt. Die Durchführung und der Versuchsaufbau erfolgten nach Sambrook und Russell (2001).

Laufpuffer (TAE-Puffer): 40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA

5 x DNA Probenpuffer: 50 mM EDTA
30 % (v/v) Glycerin
40 % (w/v) Sucrose
0,001 % (w/v) Xylencyanol und 0,001 % (w/v) Bromphenolblau

Für die Herstellung der Gele wurden 1,2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer gelöst, aufgekocht und nach kurzer Abkühlzeit mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (w/v) Ethidiumbromid versetzt und die Gele gegossen. Die DNA-Proben wurden nach Zugabe von Probenpuffer (Volumenverhältnis 1:5) in die Geltaschen aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 80 – 100 V durchgeführt. Zum Größenvergleich der Fragmente wurde ein Standard-Marker verwendet (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range von der Firma BIO-RAD, München).

Die Detektion der DNA erfolgte mittels Fluoreszenzanregung des Ethidiumbromids, das zwischen die Basen von RNA und DNA interkaliert. Die Anregung wurde mit einem UV-

Transilluminator durchgeführt und die Ergebnisse mit dem GelDoc XR-System (Bio-Rad, München) dokumentiert.

2.2.5 Präparative Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen und Restriktionsansätzen zu isolieren und zu reinigen, wurde die präparative Agarosegelelektrophorese verwendet. Dazu wurden die gewünschten Fragmente nach der Auftrennung im Agarosegel mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraktion-Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben nach folgendem Prinzip: negativ geladene Nukleinsäuren binden an eine positiv geladene Siliziumdioxid-Matrix und werden nach mehrmaligem Waschen bei einer niedrigen Salzkonzentration eluiert.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Nukleinsäuren lassen sich DNA-Sequenzen amplifizieren. Mit Hilfe dieser Methode kann eine doppelsträngige DNA-Matrize (template) mit Hilfe von kurzen, komplementären Oligonukleotiden („primer“), die den gewünschten DNA-Bereich am 5'- und am 3'-Ende flankieren, amplifiziert werden. Für die Standard-PCR wird meist die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt, um die gewünschte DNA aus einem Gemisch von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) zu synthetisieren. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen, die sich aus den drei Abschnitten Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung zusammensetzen. Die Temperatur zur Primeranlagerung wird entsprechend dem Schmelzpunkt der Primer gewählt und liegt meistens zwischen 50 und 60 °C. Die optimale Temperatur bei der Kettenverlängerung liegt beim Aktivitätsoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase (Taq-Polymerase: 72 °C, Pfu-Polymerase: 68 °C).

Standard-PCR-Ansatz

Template-DNA	50 – 100 ng
10 x PCR-Puffer (PeqLab, Erlangen)	5 µl
Vorwärtsprimer	10 pmol
Rückwärtsprimer	10 pmol
dNTP (Roche, Mannheim)	0,2 mM
Taq-Polymerase (Peq Lab)	2,5 U
Milli-Q-H ₂ O	ad 50 µl

Standard-PCR-Programm

Initiale Denaturierung:	94 °C,	5 min,	1 x Wiederholung
Denaturierung:	94 °C,	20 sec	} 30 x Wiederholungen
Primeranlagerung	ca. 50-60 °C	45 sec	
Primerverlängerung	68 bzw. 72 °C	45 sec	
Finale Verlängerung	68 bzw. 72 °C	7 min	1 x Wiederholung
Programmende	4 °C	endlos	

2.2.7 Site-directed Mutagenese (Ara h 8 K54N)

Zur Herstellung der p-loop-Mutante wurde eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe 2.1.8) durchgeführt, die in der translatierten Sequenz den Aminosäureaustausch von K54 zu N54 kodieren. Als Template wurde aus *E. coli*-Kulturen isoliertes Plasmid pET23b-Ara h 8.0201 verwendet. Die Herstellung von Ara h 8 Mut K54N erfolgte in zwei Schritten:

1. Schritt: PCR-Mutagenese

Als erstes wurden zwei Teilfragmente amplifiziert, die den Aminosäureaustausch beinhalten. Die Sequenzen der verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimer (F8 forward und F8 reverse) mit der Punktmutation sind zueinander vollständig komplementär, sodass zwei überlappende Teilstücke amplifiziert wurden, die beide die Mutation beinhalten.

Für die PCR-Mutagenese wurde die thermostabile Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* anstelle der Taq-Polymerase verwendet, da sie aufgrund ihrer Korrekturlese-Funktion über eine höhere Kopiergenauigkeit verfügt. Außerdem produziert sie keine 3'-Adenosyl-

überhänge, sondern glatte DNA-Enden (blunt-ends) ohne Basenüberhänge, die für die fehlerfreie Herstellung der Mutante nötig sind.

Für die PCR wurden zwei Standard-PCR-Ansätze (2.2.1.6) mit folgenden Primern angesetzt:

vorderes Teilstück (50 µl)

50 ng Plasmid pET23b-Ara h 8.0201
 10 pmol Ara h 8 *NdeI* fw (Vorwärtsprimer)
 10 pmol F8 reverse (Rückwärtsprimer)
 0,5 µl Pfu-Polymerase (PeqLab)

hinteres Teilstück (50 µl)

50 ng Plasmid pET23b-Ara h 8.0201
 10 pmol F8 forward (Vorwärtsprimer)
 10 pmol Ara h 8 *XhoI* rv
 (Rückwärtsprimer)
 0,5 µl Pfu-Polymerase (PeqLab)

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Primus 25 advanced (PeqLab). Folgende Änderungen wurden im Standard-PCR-Programm (2.2.1.6) vorgenommen: Unter Berücksichtigung der optimalen Temperatur zur Primeranlagerung (Tabelle 9) wurde die Anlagerung bei 55 °C und die Kettenverlängerung bei 68 °C durchgeführt (Reaktionsoptimum der Pfu-Polymerase).

Nach der PCR wurde die DNA-Konzentration durch UV-Absorptionsspektroskopie gemessen und jeweils ein Aliquot der Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt, um die Größe der Teilfragmente zu ermitteln.

2. Schritt: Fusions-PCR

Damit die beiden Teilfragmente mittels PCR fehlerfrei miteinander verbunden werden konnten, erfolgte die Zusammensetzung der Reaktionslösung für die Fusions-PCR in drei aufeinanderfolgenden Schritten.

1. Denaturierung und Annealing: Trennung der DNA-Doppelstränge aus den beiden PCR-Ansätzen und Anlagerung der komplementären Einzelstränge. Hierfür wurden jeweils 50 ng der PCR-Produkte aus der PCR-Mutagenese (vorderes und hinteres Teilstück) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl in Milli-Q-H₂O für 5 Minuten bei 94 °C im Thermocycler erhitzt.
2. Elongation der Einzelstränge: Durchführung der PCR ohne die Primer F8 reverse und F8 forward. Hierfür wurden 5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,2 mM dNTP und 2,5 U Taq-Polymerase in 48 µl Milli-Q-H₂O gemischt und direkt in den Thermocycler gegeben. Zur Einzelstrang-

Verlängerung wurde eine PCR aus zwei Zyklen mit folgenden Parametern durchgeführt: Denaturierung bei 94 °C (20 sec.), Anlagerung bei 55 °C (45 sec.), Verlängerung bei 72 °C (45 sec.).

3. Herstellung des kompletten mutierten Ara h 8-Genkonstrukts: 10 pmol Vorwärts- (Ara h 8 NdeI fw) und Rückwärtsprimer (Ara h 8 XhoI rv) wurden zugefügt, um mittels PCR das vollständige mutierte Gen zu amplifizieren. Die PCR erfolgte mit dem Standard-PCR-Programm (2.2.1.6). Zur Primeranlagerung wurde eine Temperatur von 55 °C gewählt.

Nach Ende der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe und Reinheit des Fusionsprodukts zu bestimmen.

2.2.8 PCR aus Bakterienkolonien

Die Überprüfung der transformierten Bakterienklone nach der Klonierung von Ara h 8 Mut K54N in den Klonierungsvektor pCR2.1.TOPO erfolgte mittels PCR. Hierzu wurde durch Einstechen mit einer Pipettenspitze aus den Bakterienkolonien Zellmaterial entnommen, direkt in den Standard-PCR-Ansatz gegeben und gemäß Standard-PCR-Programm amplifiziert (2.2.1.6). Als Primer wurden 10 pmol Ara h 8 NdeI fw und 10 pmol Ara h 8 XhoI rv eingesetzt, und im PCR-Programm wurde eine längere Denaturierungsphase von 10 min. gewählt. Anschließend wurde die Größe der amplifizierten DNA auf einem Agarosegel überprüft und die positiven Klone mittels DNA-Sequenzierung (MWG-Biotech, Ebersberg) kontrolliert.

2.2.9 Enzymatische DNA-Restriktion

Zur Identifikation der Klonierungsprodukte von Ara h 8 Mut K54N und zur Vorbereitung von Vektor und Insert-DNA für die Ligation wurden spezifische Restriktionsendonukleasen verwendet. Für einen Restriktionsansatz wurden jeweils 10 U der Restriktionsenzyme XhoI und NdeI (Roche, Mannheim) pro µg DNA mit dem mitgelieferten Puffer (Puffer H) in einem Reaktionsvolumen von 10–100 µl angesetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert, um die doppelsträngige DNA zu spalten.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide

Ligation in den Vektor pET23b:

Zur Ligation des Ara h 8-Gens (Ara h 8 p-loop Mutante) in den Expressionsvektor pET23b (Novagen, Darmstadt) wurde T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Vektor- und Insert-DNA wurden zuvor mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NdeI* verdaut, um komplementäre Überhänge für die Verknüpfung zu erhalten.

Ligationsansatz:

1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
1 µl 10 x Ligationspuffer
50 ng pET23b (Vektor, mit *XhoI* und *NdeI* verdaut)
2,5 ng Ara h 8 Mut K54N (Insert, mit *XhoI* und *NdeI* verdaut)
ad 10 µl Milli-Q-H₂O

Die Ligation erfolgte bei 14 °C über Nacht. Die Selektion der Klone wurde entsprechend der Resistenz des Vektors auf LB-Ampicillin-Agar-Platten über Nacht bei 37 °C durchgeführt.

Ligation in pCR2.1.TOPO:

Die Ligation von DNA-Inserts mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Novagen, Darmstadt) in den Klonierungsvektor pCR2.1.TOPO ist aufgrund des Funktionsprinzips des Vektors weniger zeitaufwändig und erfordert keine DNA-Ligase.

Prinzip: Der Topo-Vektor verfügt an den beiden linearen Enden über eine spezielle Sequenz (5'-CCCTT), an welche die Topoisomerase I aus *Vaccinia virus* kovalent gebunden ist. Die Topoisomerase I dient normalerweise der Relaxation, dem Schneiden und Zusammenfügen von supercoil-DNA bei der Virus-Replikation und übernimmt hier die Funktion der DNA-Ligase. Zusätzlich verfügt der Vektor über einen Thymidin-Überhang am 3'-Ende, der die Ligation mit PCR-Produkten mit einem Adenosin-Überhang der korrespondierenden Base (z.B. durch Taq-Polymerase) ermöglicht.

Durchführung: Die Ligation von DNA-Inserts mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits in den Klonierungsvektor pCR2.1.TOPO erfolgte nach Herstellerangaben mit 2 µl PCR-Produkt, 1 µl Vektor und 1 µl 10 x Puffer in einem 10 µl Reaktionsvolumen für 5 min bei Raumtemperatur. Die Identifikation positiver Klone nach der Transformation in Bakterienzellen erfolgte über die Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz des Vektors auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin.

2.2.11 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen

Die Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Bakterien erfolgte unter Verwendung von chemisch kompetenten Zellen mittels Hitzeschock-Methode.

chemisch kompetente Zellen:

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden 200 µl einer Übernachtskultur in 20 ml LB-Flüssigmedium angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,5 (gemessen mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf, Hamburg) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 10 minütiger Abkühlzeit auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 x g, 4 °C, 10 min), das Zellpellet in 10 ml eisgekühlter 100 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5000 x g, 4 °C, 10 min) sedimentiert und anschließend in 2 ml kalter 100 mM Calciumchlorid-Lösung mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten Zellen in 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Transformation in *E.coli*:

Die Transformation wurde mit 200 µl chemisch kompetenten Zellen und mindestens 50 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Nach 20-30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Nach einer kurzen Abkühlzeit auf Eis (maximal 10 min) wurden die Zellen mit 800 µl LB-Flüssigmedium versetzt und nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C auf LB-Agar-Platten zur Selektion ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.12 Expression von rekombinanten Proteinen

Für die heterologe Expression von rekombinanten Erdnussproteinen wurde eine Übernachtskultur mit der transformierten *E.coli*-Bakterienkolonie angesetzt und anschließend in einem Verhältnis von 1 : 100 mit flüssigem LB-Selektivnährmedium verdünnt (siehe 2.1.6 Nährmedien) und bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) aktiviert und die Expression 3 – 4 h bei gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterienzellen sedimentiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C) und das Bakterienpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden jeweils 1 ml der Bakterienkultur vor und nach Induktion (mittels IPTG) abzentrifugiert (1 min, 12.000 x g), mit 1 µl Benzonase versetzt und mittels SDS-PAGE (2.3.7) analysiert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Erdnussextrakten

2.3.1.1 Wässriger Erdnussextrakt

verwendete Extraktionspufferlösungen:

0,1 M Natriumacetat-Puffer (CH_3COONa) pH 3-6

0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (NH_4HCO_3) pH 7-11

Für die Extraktion wurden Erdnüsse von der Schale inklusive Häutchen befreit, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer elektrischen Kaffeemühle gemahlen. Anschließend wurde 5 g Erdnussmehl mit 40 ml Extraktionspuffer mit verschiedenen pH-Werten (pH 3 – 11) versetzt und gerührt (1 – 24 h, RT). Nach der Sedimentation (zweimalige Zentrifugation: 30 min, 10.000 x g, 4 °C) wurde der Extrakt mit absteigender Porengröße des Zelluloseacetatfilters (Sartorius, Göttingen; Porengröße: 8; 0,8; 0,45; 0,2 μM) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe filtriert. Die Dialyse des Extrakts gegen Milli-Q- H_2O wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt und der Proteingehalt mittels Bradford-Methode (siehe 2.3.3) bestimmt. Zur weiteren Verwendung wurde der Proteinextrakt aliquotiert und lyophilisiert.

2.3.1.2 Lipophiler Erdnussextrakt (Chloroform/MeOH-Extraktion)

Die Extraktion von lipophilen Erdnussallergenen erfolgte nach der Methode von D'Andrea et al. (2007) mit Modifikationen.

verwendete Lösungen:

Extraktionspuffer: 0,5 M Natriumcarbonat-Puffer (Na_2CO_3) pH 11

Chloroform/Methanol-Gemisch: Verhältnis: 5 (Chloroform) / 4 (Methanol)

Zur Herstellung des lipophilen Erdnussextrakts wurden 5 g Erdnussmehl (Herstellung siehe 2.3.1.1) und 40 ml Extraktionspuffer 1 h gerührt (RT) und anschließend 360 ml (9 faches Volumen des Extraktionspuffers) eines Chloroform/Methanol-Gemisches (200 ml Chloroform + 160 ml Methanol, Volumenverhältnis: 5 zu 4) unter Rühren zugetropft und für 30 s im Ultraschallbad gemischt. Nach der Zentrifugation (20 min, 10.000 x g, 4 °C) und der Filtration (Porengröße: 8 µM) des Extrakts wurde das Lösungsmittel durch Einengen am Rotationsverdampfer mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt (ca. 4 h, 40 °C). Das restliche Lösungsmittel wurde durch die Dialyse gegen Milli-Q-H₂O entfernt (ü.N, 4°C), der Proteingehalt des Extrakts mittels Bradford-Methode (2.3.2) bestimmt, und der Extrakt anschließend aliquotiert und lyophilisiert bzw. zur weiteren säulenchromatographischen Aufreinigung verwendet (siehe 2.3.6).

Entfettung von Erdnussmehl:

Um Erdnussmehl zu entfetten, wurde 5 g Erdnussmehl (Herstellung siehe 2.3.1.1) mit 20 ml Aceton versetzt und 15 min gerührt. Nach zweimaliger Filtration (Porengröße: 8 µM) wurde das verbliebene Aceton über Nacht bei RT abgedampft und das entfettete Erdnussmehl wie unter 2.3.1.1 und 2.3.1.2 beschrieben extrahiert.

2.3.2 Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration von Lösungen zu bestimmen, wurde vorwiegend die Bradford-Methode verwendet (1976). Bei klaren Lösungen konnte der Proteingehalt alternativ über die UV-Extinktion der Probe bei 280 nm mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt werden.

2.3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration bei der Bradford-Methode erfolgte mit dem Coomassie Protein Assay Reagenz (Pierce, Bonn) mit Milli-Q-H₂O als Referenzwert. 980 µl Coomassie-Reagenz und 20 µl Probe wurden gemischt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (62,5 µg/ml – 1 mg/ml) aufgenommen.

2.3.2.2 Proteinbestimmung durch UV-Spektroskopie

Als Alternative zur Bradford-Methode (z.B. bei geringer Proteinmenge) wurde die Proteinkonzentration über den molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Hierzu wurden 50 µl Probe (klare Lösung) in einer UV-Küvette (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 280 nm (E_{280}) im BioPhotometer (Eppendorf) gemessen und der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) des Proteins berechnet (Programm: Vector NTI). Für die Bestimmung der Konzentration wurde folgende Formel verwendet:

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

2.3.3 SDS-PAGE

Die Analyse von Proteingemischen erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel nach der Methode von Laemmli (1970). Durch die Verwendung von SDS (engl.: Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat) werden die Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung proportional zur Proteingröße negativ aufgeladen. Die Auftrennung des Proteingemischs erfolgt in einem elektrischen Feld, wobei die negativen Proteine auf ihrem Weg zur Anode durch die Porengröße des Polyacrylamid-Gels entsprechend ihres Molekulargewichtes voneinander getrennt werden.

Verwendete Lösungen:

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

4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
----------------------	------------------------

4 x Trenngelpuffer:	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 in Milli-Q-H ₂ O
Pyronin G:	1 % (v/v) Stammlösung in Sammelgelpuffer

Für die Elektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele mit zwei unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (diskontinuierliche SDS-Elektrophorese) in einer vertikalen Gelkassette gegossen und auspolymerisiert. Die eigentliche Auftrennung erfolgte im Trenngel mit 15 % Acrylamid (pH 8,8), nachdem die Proben im Sammelgel (4 % Acrylamid, pH 6,8) zu einer Lauffront aufkonzentriert wurden.

Mengenangaben für 2 SDS-Gele:

verwendete Chemikalien (Roth, Karlsruhe):

APS (Ammoniumpersulfat)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid/Bisacrylamid, Mischungsverhältnis: 37,5 :1)

	<u>15 % Trenngel</u>	<u>4 % Sammelgel</u>
Milli-Q-H ₂ O	3,9 ml	2,9 ml
Rotiphorese Gel 30	8,1 ml	850 µl
4 x Trenngelpuffer	4 ml	-
4 x Sammelgelpuffer	-	1,3 ml
1 % (v/v) Pyronin G	-	16 µl
10 % (w/v) SDS	163 µl	51 µl
TEMED	16 µl	5 µl
10 % APS	100 µl	30 µl

Zuerst wurde die Trenngel-Lösung in die Gelkassette gefüllt und mit Milli-Q-H₂O bis zur Polymerisierung überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, die Kassette mit der Sammelgel-Lösung aufgefüllt und ein Probenkamm zur

Ausbildung der Probenaschen in das Sammelgel eingesetzt. Nach der Polymerisierung wurde das SDS-Gel in die vertikale Elektrophoresekammer (PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, Peqlab, Erlangen) eingesetzt und mit Elektrodenpuffer bedeckt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und in die Probenaschen des Sammelgels überführt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 50 V gestartet. Nachdem die Proben in das Trenngel eingewandert waren, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Sobald die Lauffront des Probenpuffers das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das SDS-Gel entweder mit Coomassie gefärbt oder für den Immunoblot weiterverwendet. Zum Größenvergleich der Proteine wurde ein Protein-Marker (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range, BioRad, München) mitgeführt.

2.3.3.1 Coomassie-Färbung

Für die Färbung der Proteine im SDS-Gel wurde der Farbstoff Coomassie Blue verwendet.

Verwendete Lösungen:

Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Blue R-250 45 % (v/v) Methanol 45 % (v/v) Eisessig
Entfärber:	18 % (v/v) Isopropanol 9 % (v/v) Eisessig
Glycerinpuffer:	2 % (v/v) Glycerin 7 % (v/v) Eisessig

Zum Färben wurden die Gele für 30 min in der Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und anschließend mehrmals mit Entfärber-Lösung gewaschen, bis die Proteine deutlich sichtbar waren. Zur Aufbewahrung wurden die gefärbten Gele über Nacht in Glycerinpuffer inkubiert und anschließend zwischen in Glycerinpuffer getränkter Einmachhaut (aus dem Haushaltswarenladen) getrocknet.

2.3.4 Zweidimensionale Elektrophorese

Mithilfe der zweidimensionalen Elektrophorese (2D-Elektrophorese) wurde natürliches Ara h 8 anhand von zwei Parametern elektrophoretisch aufgetrennt. Im ersten Schritt wurde eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt, bei der die Proteine nach dem isoelektrischen Punkt (pI) in einem pH-Gradienten-Gel aufgetrennt wurden. Anschließend wurde eine SDS-PAGE im 90° Winkel dazu durchgeführt, um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension):

Zubehör: ZOOM® IPG Runner Cassetten (Invitrogen, Carlsbad, USA)
ZOOM® Strips, pH 4-7 NL (Gradientengel-Streifen) (Invitrogen)

Rehydrationspuffer: 8 M Harnstoff
3 % (w/v) CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfat)
0,5 % (w/v) Ampholyte (pH 4-7) (Zoom® Carrier Ampholytes 4-7, Invitrogen)
0,002 % (w/v) Bromphenolblau
20 mM DTT (Dithiothreitol)

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 25 µg nAra h 8 in 155 µl Rehydrationspuffer gelöst und luftblasenfrei in die IEF-Kassette überführt, der Gradientengel-Streifen in die dafür vorgesehene Öffnung eingeführt und das Protein/Puffer-Gemisch zusammen mit dem Gelstreifen über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde die IEF-Kassette in die Elektrodenkammer eingebaut, mit Milli-Q-H₂O als Elektrodenlösung befüllt und die IEF bei 2 mA und 2 Watt mit folgender Spannung durchgeführt:

20 min	200 V
15 min	450 V
15 min	750 V
60 min	2000 V

Nach Beendigung der IEF wurde der Gel-Streifen aus der Kammer herausgenommen und entweder direkt für die SDS-PAGE (2. Dimension) verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

SDS-PAGE (2. Dimension):

Polyacrylamidgel:	4-20 % Tris-Glycine Zoom Gel (Invitrogen)
Äquilibriumspuffer:	0,05 M Tris 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % Bromphenolblau (w/v)
Äquilibriumspuffer I:	0,05 g DTT ad 5 ml Äquilibriumspuffer
Äquilibriumspuffer II:	0,125 g Jodacetamid ad 5 ml Äquilibriumspuffer
Laufpuffer:	20 x NuPAGE® MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) SDS Running Buffer (Invitrogen) 1:20 in Milli-Q-H ₂ O verdünnt
Elektrodenkammer:	Novex® XCell4 <i>SureLock</i> TM Mini Cell (Invitrogen)

Die SDS-PAGE wurde mit einem vorgefertigten Tris-Glycine Gel mit 4-20 % Polyacrylamid durchgeführt. Hierfür wurde der IPG-Gelstreifen nach der isoelektrischen Fokussierung 15 min in Äquilibriumspuffer I inkubiert und nach kurzem Waschen mit Milli-Q-H₂O für 15 min in Äquilibriumspuffer II inkubiert und anschließend in die Probentasche des Tris-Glycine-Gels eingeführt. Der Gel-Streifen wurde mit Agarose (0,5 % Agarose in Laufpuffer gelöst) fixiert, das Gel in die Elektrodenkammer eingebaut und mit Laufpuffer aufgefüllt. Die SDS-PAGE wurde mit einer Spannung von 50 V gestartet und nach 30 min bei 100 V durchgeführt. Als Größenstandard wurde 8 µl Novex® Sharp Prestained Protein Standard (Invitrogen) verwendet. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel entweder mit Coomassie-Lösung (2.3.3.1) gefärbt oder für den Immunoblot (2.3.5) weiter verwendet.

2.3.5 Immunoblotting

Für den Immunoblot wurden die aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE mittels Semidry-Blotting nach der Methode von Kyhse-Anderson (1984) auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) oder eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

Verwendete Pufferlösungen:

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

Der Westernblot wurde im Deckel (Anode) des Semidry-Blotters (Phase, Lübeck) wie folgt aufgebaut: Zwei in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere (Gel-Blotting Papier, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden luftblasenfrei auf die Anode gelegt. Anschließend wurden in gleicher Weise eine Lage in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier, die mit Anodenpuffer II äquilibrierte Membran, das SDS-Gel und drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere übereinander gelegt und mit der Kathode abgedeckt. Die PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) musste vor der Äquilibrierung mit Methanol aktiviert werden. Der Proteintransfer wurde bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 30 min durchgeführt.

2.3.5.1 Proteinfärbung mit Ponceau S

Zur Kontrolle des Proteintransfers auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) konnten die Proteine mit dem Farbstoff Ponceau S reversibel gefärbt werden. Dafür wurde die Membran 5 min in Ponceau S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und überschüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit Milli-Q-H₂O entfernt.

Anschließend wurde die Membran bis zur vollständigen Entfärbung in Milli-Q-H₂O inkubiert und für die Detektion mit Antikörpern weiterverwendet.

2.3.5.2 Proteinfärbung mittels India Ink

Die irreversible Färbung von Proteinen auf NC- und PVDF-Membranen erfolgte durch eine India Ink-Lösung nach Hancock und Tsang (1983).

Verwendete Lösungen:

India Ink-Lösung: 0,1 % (v/v) India Ink (Windsor & 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 MgCl₂
0,05 % (v/v) Tween 20

Nach dem Semidry-Blotting wurde die Membran für 2 h in der India Ink-Lösung inkubiert und der Farbüberschuss anschließend durch Waschen mit TBS-T entfernt.

2.3.5.3 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern

Für den Protein-spezifischen Nachweis auf PVDF- oder NC-Membranen wurden monoklonale bzw. polyklonale Antikörper verwendet.

Verwendete Lösungen:

TBS-T (pH 7,4): Herstellung siehe 2.3.5.2

Blockierungs-Lösung: 5 % Magermilchpulver in TBS-T (pH 7,4)

TBS (pH 9,5): 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

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)

Zur Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran wurden die PVDF-Membranen für 2 h in Blockierungslösung inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Für Nitrozellulose-Membranen wurde TBS-T zur Blockierung verwendet und die Zeit auf 30 min verkürzt. Die Spur des Protein-Markers musste vor der Blockierung abgeschnitten und mit India Ink (2.3.5.2) gefärbt werden. Überschüssige Blockierungslösung wurde durch Waschen mit TBS-T entfernt, bevor die Primärantikörper mit TBS-T verdünnt wurden und mit der PVDF- oder NC-Membran über Nacht inkubiert wurden. Die Primärantikörper-Lösung wurde durch dreimaliges 10-minütiges Waschen entfernt, bevor die mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper in TBS-T verdünnt wurden und mit der Membran für 4 h inkubiert wurden. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T zweimal jeweils 10 min gewaschen. Bevor die Membran mit der NBT/BCIP-Lösung gefärbt wurde, musste die Membran für 10 min in TBS inkubiert werden. Für die Herstellung der NBT/BCIP-Lösung (Leary et al., 1983) wurde 1 ml BCIP zu 30 ml des vorgewärmten NBT (37 °C) gegeben und die Membran ca. 10 min im Dunkeln bis zur deutlichen Färbung der Proteinbanden inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Milli-Q-H₂O beendet und der Blot anschließend getrocknet.

2.3.5.4 Nachweis der spez. IgE-Reaktivität mit Patientenseren

Für den Nachweis der Allergen-spezifischen IgE-Reaktivität auf PVDF- oder NC-Membranen wurden Erdnussallergiker-Seren als Primärantikörper verwendet. Für die Untersuchung mehrerer Seren unter gleichen Bedingungen wurden Streifentests angefertigt. Hierfür wurde die Membran nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen (siehe 2.3.5.3) in schmale Streifen geschnitten und jeweils ein Streifen pro Patientenserum inkubiert (Bedingungen siehe 2.3.5.3). Vor dem Blockieren wurden der Protein-Marker und ein Streifen der Membran zur Gesamtproteinfärbung abgeschnitten und für die Färbung mit India Ink (2.3.5.2) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde mit alkalischer Phosphatase konjugiertes anti-Human IgE verwendet und die Färbung mit dem NBT/BCIP-System wie unter 2.3.5.3 beschrieben durchgeführt.

2.3.5.5 Kreuz-Inhibitionstest

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität von rAra h 8 mit rBet v 1 wurde ein Kreuz-Inhibitionstest mit einem Ara h 8 IgE-reaktiven Patientenserum durchgeführt. Hierfür wurden 6 µg/cm lipophiler Erdnussextrakt nach der Semidry-Methode (2.3.5) auf eine PVDF-Membran transferiert und die Ara h 8 spezifische IgE-Reaktivität wie unter 2.3.5.4 beschrieben überprüft. Jedoch wurde das Ara h 8 IgE-reaktive Patientenserum vor der Inkubation mit der Membran zusammen mit rBet v 1 vorinkubiert, um zu überprüfen, ob die Ara h 8-spezifischen IgE-Antikörper des Patientenserums bereits an rBet v 1 gebunden haben. Dies würde eine Bindung an Ara h 8 im Erdnussextrakt verhindern bzw. abschwächen. Für den Kreuzinhibitionstest wurden 50 µl des Patientenserums mit 25 µg rBet v 1.0101 für eine Stunde bei 38 °C vorinkubiert. Als Negativkontrollen wurden jeweils 25 µg Rinderserumalbumin (BSA) und rAra h 8.0201 (Eigeninhibition) ebenfalls mit jeweils 50 µl des Patientenserums unter gleichen Bedingungen vorinkubiert. Anschließend wurde die spezifische IgE-Reaktivität mit den vorinkubierten Patientenserum wie unter 2.3.5.4 beschrieben überprüft.

2.3.6 Proteinreinigung durch Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung von natürlichem Ara h 8 und Defensin aus Erdnussextrakten wurden folgende säulenchromatographische Trennmethode verwendet.

2.3.6.1 Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie)

Bei der Gelfiltration werden Proteine durch ihre Molekülgröße voneinander getrennt. Dabei treten Wechselwirkungen von kleinen Proteinen mit der Gelmatrix ein, die in die Poren des Säulenmaterials hineinpassen. Deshalb werden größere Proteine zuerst eluiert, danach folgen die kleineren Proteine.

Lösungen und Säulen für die Gelfiltration:

Laufpuffer: 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat ((NH₄)HCO₃), pH 8

Trennsäulen:	Superdex 75	(GE Healthcare, München)
Trennbereich:	3000 - 70.000 Da	
Säulenvolumen:	24 ml	
Flussrate:	1 ml/min	
Fraktionen:	0,5 ml/min	
	Superdex 30	(GE Healthcare)
Trennbereich:	< 10.000 Da	
Säulenvolumen:	120 ml	
Flussrate:	2 ml/min	
Fraktionen:	2 ml/Tube	

Zur Abtrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 3 – 70 kDa wurde Erdnussextrakt in Laufpuffer umgepuffert (2.3.7), zentrifugiert (5 min, 10.000 x g, 4 °C) und über eine äquilibrierte Superdex 75-Säule an einem ÄKTA-Purifier (GE Healthcare) unter Verwendung von 0,2 M Ammoniumcarbonat als Laufpuffer nach Herstellerangaben aufgetrennt. Für die Abtrennung von kleineren Proteinen < 10 kDa wurde eine Superdex 30-Säule unter den gleichen Bedingungen verwendet. Die Eluat-Fraktionen wurden gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht.

2.3.6.2 Chromatofokussierung

Bei der Chromatofokussierung wird für die Trennung von Proteingemischen der isoelektrische Punkt von Proteinen ausgenutzt. Hierzu werden die Proteine an eine Säulenmatrix mit geladenen Ionen gebunden, deren Ladung gegensätzlich zu den Nettoladungen der Proteine ist (Ionenaustauscher-Säulen). Die Elution der Proteine erfolgt durch einen pH-Gradienten (hier: pH 4 – 6). Entspricht der pH-Wert dem isoelektrischen Punkt des Proteins, ist die Nettoladung des Proteins aufgehoben und das Protein wird eluiert.

Verwendete Puffer und Säulen für die Chromatofokussierung:

Startpuffer: 20 mM Tris, pH 6

Elutionspuffer: 10 ml Polypuffer 74 (GE Healthcare) + 90 ml Milli-Q-H₂O, pH 4

Trennsäule: Mono P 5/50 GL (GE Healthcare)
 Flussrate: 1 ml/min
 Fraktionen: 1 ml/Tube

Für die Aufreinigung von nAra h 8 (theoretischer $pI = 5,1$) wurde der Erdnussextrakt in Startpuffer umgepuffert (2.3.7), anschließend abzentrifugiert (5 min, 10.000 x g, 4 °C) und der Überstand auf die mit Startpuffer äquilibrierte Mono P 5/50 GL-Säule gegeben. Die Chromatofokussierung wurde nach Herstellerangaben an einem ÄKTA-Purifier (GE Healthcare) durchgeführt und die Eluate in 1 ml-Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.3.6.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Mithilfe der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) können Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einer hydrophoben stationären Phase bei verschiedenen hohen Salzkonzentrationen getrennt werden.

Verwendete Puffer und Säulenmaterial:

Startpuffer: 1 M Ammoniumsulfat $((NH_4)_2SO_4)$
 Elutionspuffer A: 100 % Milli-Q- H_2O
 Elutionspuffer B: 50 % Ethanol
 Säulenmaterial: Phenyl Sepharose High Performance 17-1082-01 (GE Healthcare)

Programm: Flussrate: 4 ml/min
 Druck: 0,6 MPa
 Fraktionen: 14 ml/Tube
 0 – 200 ml: 1M $(NH_4)_2SO_4$
 200 – 1000 ml: Milli-Q- H_2O
 1000 – 1200 ml: 50 % Ethanol

Für die HIC wurde Ammoniumsulfat (Endkonzentration: 1 M $(NH_4)_2SO_4$) zum dialysierten Erdnussextrakt gegeben und bis zur vollständigen Lösung gerührt, bevor 75 ml in Startpuffer äquilibriertes Säulenmaterial zugefügt wurde. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde das Extrakt/Säulenmaterial-Gemisch mit Hilfe einer Peristaltikpumpe in eine Leersäule überführt und an einen ÄKTA-Purifier (GE Healthcare) angeschlossen. Die Säule wurde mit 200 ml

Bindungspuffer gespült, um ungebundenes Material (z.B. Erdnussdefensin) zu entfernen. Anschließend wurde die Aufreinigung mit oben stehendem Programm nach Herstellerangaben durchgeführt. Um eine Schädigung von Ara h 8 durch das Ethanol zu verhindern, wurden die Ethanol-Fractionen sofort gepoolt, mit Wasser verdünnt und mittels Amicon-System (siehe 2.3.7) in Wasser umgepuffert. Die gesammelten Eluat-Fractionen wurden mit Hilfe von Zentrifugationssäulen (Amicon, siehe 2.3.7) eingeeengt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Entfettung von natürlichem Ara h 8:

Zur Entfettung von natürlichem Ara h 8 nach der säulenchromatographischen Aufreinigung wurden jeweils 1 Volumenanteil nAra h 8 (in Milli-Q-H₂O) und Ether miteinander gemischt und zentrifugiert (10 min, 8.000 x g, 4 °C). Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen, wobei zunächst die obere Etherphase mit einer Pipette entfernt wurde, um anschließend die untere wässrige Phase mit dem Protein mit Hilfe einer Spritze in ein sauberes Gefäß zu überführen. Dazu wurde die mittlere Fettphase mit einer Injektionsnadel durchstoßen. Die Entfettung wurde dreimal wiederholt.

2.3.6.4 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von rekombinant hergestellten Histidin-Fusionsproteinen erfolgte mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) über die Bindung des Polyhistidin-Tags an zweiwertige Nickel- (Ni-NTA Agarose-beads, Qiagen, Venlo) bzw. Kobaltionen (Talon-beads, Clontech, Saint-Germain-en-Laye).

Verwendete Pufferlösungen (native Bedingungen):

Bindungspuffer:	50 mM Natriumphosphat 300 mM Natriumchlorid, pH 8
Waschpuffer:	50 mM Natriumphosphat 300 mM Natriumchlorid 50 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer:	50 mM Natriumphosphat 300 mM Natriumchlorid 200 – 1000 mM Imidazol, pH 8

Für die Lyse der Bakterienzellen wurde das Zellpellet aus 1 l Bakterienkultur in 10 ml Bindungspuffer resuspendiert, die Zellwände durch die Zugabe von 1 ml BugBuster 10 x Protein Extraction Reagent (Novagen, Darmstadt) chemisch aufgebrochen und DNA und RNA durch Zugabe von 5 µl Benzonase® (MerckMillipore) abgebaut. Nach 1-stündiger Inkubation (RT) und anschließender Sedimentation (20 min, 10.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand zusammen mit 5 ml Säulenmaterial (in Äquilibrationpuffer resuspendiert) für 30 min auf dem Roller bei RT inkubiert und anschließend in eine Leersäule überführt. Unspezifisch gebundene Verunreinigungen wurden durch 2-maliges Waschen mit 20 ml Waschpuffer entfernt, das Protein mit 10 ml Elutionspuffer eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert und der Imidazolgehalt des Elutionspuffers zur Optimierung der Aufreinigung der jeweiligen Proteine variiert.

2.3.7 Umpufferung und Konzentrierung von Proteinen

Zur Einengung oder Umpufferung von Proteinen wurden Amicon Ultrazentrifugationssäulen (Merck Millipore, Darmstadt) mit einer Filtergröße von 10 oder 5 kDa verwendet. Dazu wurde die Proteinlösung in die Säule überführt, das Lösungsmittel durch mehrmalige Zentrifugation (10 – 30 min, 4.000 x g, 4 °C) entfernt und mit dem gewünschten Puffer oder Milli-Q-H₂O aufgefüllt. Bei größeren Puffervolumina > 40 ml (z.B. bei der Aufreinigung von nAra h 8) wurde ein Amicon-Filtriersystem unter Verwendung von Gasdruck benutzt. Hierzu wurde das Lösungsmittel unter Rühren mit Hilfe von Stickstoff (4 bar, RT) durch den Rundfilter (Moleküldurchmesser 10 kD) gepresst und entfernt. Durch mehrmaliges Auffüllen mit Milli-Q-H₂O wurde eine schnelle Umpufferung erreicht.

2.3.8 Beladung von rAra h 8 mit Erdnussöl

Um den Einfluss von Erdnussöl auf die proteolytische Stabilität von Ara h 8 zu untersuchen, wurde rAra h 8 mit Erdnussöl beladen. Hierfür wurden 1 ml frisches Erdnussöl (siehe unten) mit 1 mg lyophilisiertem rAra h 8 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation des Protein/Öl-Gemisches (1 min, 10.000 x g, RT) wurde das Sediment in 4 ml Puffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid,

pH 8) aufgenommen und zusammen mit 2,5 ml äquilibrierten Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic Säule) Agarose-beads (Qiagen, Venlo) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Aufreinigung über den His-tag (siehe 2.3.6) durchgeführt und das saubere Protein mit 5 x 1 ml Elutionspuffer (1 mM Imidazol) eluiert. Der Proteingehalt der Eluate wurde mittels Bradford-Methode bestimmt und die Fraktionen mit Ara h 8 gepoolt, über Nacht bei 4 °C mit Milli-Q-H₂O dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Herstellung von Erdnussöl

Zur Beladung von rekombinantem Ara h 8 mit Erdnussöl wurde das Öl manuell aus Erdnüssen abgepresst. Hierfür wurden 20 g Erdnüsse gepellt und ohne Stickstoff-Vorbehandlung im Mörser zerrieben, bis eine Erdnussbutter entstand. Nach 30-minütiger Erhitzung bei 50 °C wurde die Butter sedimentiert (10 min, 10.000 x g, RT) und das frische Öl abgenommen und sofort weiterverwendet (siehe 2.3.8).

2.3.9 Proteinsequenzierung

Die Bestimmung der Proteinsequenz erfolgte durch den stückweisen Abbau der Peptidkette ausgehend vom N-terminalen Proteinende nach der Methode von Edman (1970) und die anschließende Bestimmung mittels reversed-phase Chromatographie. Bei dieser Methode wird Phenylisothiocyanat (PITC) unter basischen Bedingungen an die N-terminale Aminosäure eines Proteins gekoppelt. Durch Absenkung des pH-Wertes durch Zugabe von TFA (Trifluoressigsäure) wird die Abspaltung der endständigen Aminosäure und die Umwandlung zu einem Phenylthiohydantion (PTH)-Aminosäure-Derivat erreicht. Die PTH-Aminosäure-Derivate, die durch die mehrmalige Wiederholung der Prozedur entstanden, werden anschließend mittels reversed-phase Chromatographie analysiert und mit den Standard-PTH-Aminosäure-Derivaten verglichen. Die Durchführung erfolgte mit den aus der PVDF-Membran ausgeschnittenen Proteinspots in einem Procise Proteinsequencer (PE Biosystems, Weiterstadt).

Passive Adsorption von Proteinen auf eine PVDF-Membran:

Für die passive Adsorption (Reuter et al. 2005) wurde ein Proteinspot nach der SDS-PAGE (2.3.3) aus dem Gel herausgeschnitten und in einer Speedvac (SPD12P, Thermo Savant, Holbrook, USA) getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Gelstück in 50 µl 200 mM

Tris/HCl (pH 8,5) mit 2 % SDS rehydratisiert, die vorher in Methanol aktivierte PVDF-Membran sowie 200 µl Milli-Q-H₂O hinzugefügt und für 24 h (RT) inkubiert. Anschließend wurde Methanol in einer Endkonzentration von 10 % zugefügt und die passive Adsorption für 5 Tage (RT) durchgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die PVDF-Membran 5 x mit 10 % Methanol gewaschen, anschließend getrocknet und für die Proteinsequenzierung verwendet.

Färbung für die Proteinsequenzierung:

Die PVDF-Membran wurde mit 0,1 % Coomassie in 50 % Methanol ca. 30 min gefärbt und anschließend 3 x 10 min mit 50 % Methanol entfärbt.

2.3.10 CD-Spektroskopie

Mithilfe der Messung des Circular dichroismus (CD) kann der Anteil der Sekundärstrukturelemente eines Proteins bestimmt werden, da Aminosäuren chiral sind. Chirale Moleküle sind optisch aktiv, d.h. sie drehen die Polarisationssebene von linear polarisiertem Licht. Dieser Effekt wird durch unterschiedliche Brechungsindizes n_r und n_l für rechts und links zirkular polarisiertes Licht hervorgerufen, weshalb ein chirales Molekül als zirkular doppelbrechend bezeichnet wird. Durch die beiden verschiedenen Brechungsindizes unterscheiden sich auch die Absorptionsintensitäten I_l und I_r für links bzw. rechts zirkular polarisiertes Licht. Diese Differenz ($I_l - I_r$) wird beim Circular dichroismus gemessen und ist abhängig von der Konformation. Durch den Vergleich mit dem CD-Spektrum von Poly-L-Lysin, welches in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur entweder in α -Helix oder β -Faltblatt-Struktur (oder ungeordnet) vorliegt, können die Anteile der α -helikalen und β -Faltblatt-Bereiche von Proteinen berechnet werden. Zusätzlich werden für die Auswertung CD-Spektren von Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur herangezogen.

Die CD-Messungen erfolgten mit einer Proteinkonzentration von 10 µmol in 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,5) in einer 1 mm Quartz-Küvette im Jasco J-715 A Spectropolarimeter (Japan spectroscopic Co., Tokyo, Japan). Die Analyse der Sekundärstruktur wurde im fernen UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 190 – 260 nm bei 20 °C durchgeführt. Zur Berechnung des α -Helix- und β -Faltblatt-Anteils wurden die Programme DichroCalc und K2D3 (Louis-Jeune et al., 2012) verwendet. Für die Analyse der

Hitzestabilität wurde das Spektrum bei 210 nm aufgenommen und dabei die Temperatur von 40 °C auf 95 °C erhöht.

2.3.11 Massenspektrometrie (Peptid-Fingerprinting)

Mithilfe der Massenspektrometrie können Molekulargewichte von Molekülen gemessen werden. Die zu analysierende Substanz wird dazu in die Gasphase überführt, ionisiert und anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt. Nach ihrem Masse-zu-Ladung-(m/z)-Verhältnis werden sie im Analysator sortiert und vom Detektor detektiert. Mit dieser Methode kann außer der Molekülmasse auch die Aminosäuresequenz von Proteinen bestimmt werden (Peptidmassen-Fingerabdruck-Methode). Hierzu müssen die Proteine jedoch zuerst in einem enzymatischen Verdau mit dem Enzym Trypsin in kleinere Peptid-Fragmente zerlegt werden. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Peptidmassen in einem MALDI-TOF Massenspektrometer. Durch den Abgleich der Peptidmassen mit den Massen bekannter Peptide aus den Proteindatenbanken (z.B. Mascot) wird die Aminosäuresequenz ermittelt.

2.3.11.1 Trypsinierung

Für den tryptischen Verdau wurden die Proteinbanden nach der SDS-PAGE (2.3.3) mit einem Skalpell ausgeschnitten, 10 min mit Milli-Q-H₂O gespült, und in ein Gemisch aus Acetonitril und 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) in einem Verhältnis von 1:1 überführt und 15 min inkubiert. Nach Trocknung des entfärbten Gelstücks in der Speedvac (ca. 30 min) wurden 20 µl Trypsinlösung (10 µg Trypsin, Sequenzierungsgrad, Roche, Mannheim) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) zugefügt und der Verdau über 24 h bei 37 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Überstand mit den Proteinfragmenten in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Extraktion der im Gel verbliebenen restlichen Peptide erfolgte schrittweise durch drei aufeinanderfolgende Inkubationsschritte à 15 min mit folgenden Lösungen: a) 20 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0), b) 20 µl 5 % ige Ameisensäure, c) 20 µl Acetonitril. Die Überstände wurden nach jedem Schritt abgenommen, mit dem ersten Überstand gepoolt und zusammen in der Speedvac auf ein Volumen von 10 µl eingeeengt. Die Aufreinigung des Peptidgemischs erfolgte mittels reversed-phase Chromatographie und einer C18-Säule (HyPurity Elite C18, 5 µM, Thermo Hypersil-Keystone, Runcorn, U.K.) in einem ÄKTA purifier (GE Healthcare) mit einem

Konzentrationsgradienten von Puffer A (0,1 % TFA in Milli-Q-H₂O) und Puffer B (80 % Acetonitril, 0,08 % TFA in Milli-Q-H₂O) mit einer Flussrate von 1 ml/min (100 % Puffer B in 10 min). Die Peptidfraktionen wurden anschließend gepoolt, in der Speedvac getrocknet und in 2 µl eines Gemisches aus 0,1 % TFA und Acetonitril (Volumenverhältnis: 2:1) aufgenommen.

2.3.11.2 MALDI-TOF- MS

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeitanalysator-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) wurde für die Molekülmassen-Analyse von natürlichem Defensin und Ara h 8 nach Auftrennung mittels SDS-PAGE verwendet. Bei dieser Methode wurden die Proben aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und durch den Zusatz der Protease Trypsin in Proteinfragmente zerlegt (2.3.11.3). Die Proteinfragmente wurden mit der Matrix (α -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure, Bruker Daltonics (gesättigte Lösung in 0,1 % TFA)) im Verhältnis von 1:1 gemischt und zusammen auf einem Edelstahl-Probenträger kristallisiert. Das kokristallisierte Peptid/Matrix-Gemisch wurde durch Laserbeschuss im Hochvakuum verdampft, ionisiert und durch Anlegen einer Spannung von 20 kV im elektrischen Feld beschleunigt. Die Auftrennung der Ionen erfolgte im Hochvakuum nach dem Durchlaufen einer definierten Flugstrecke, wobei die für die Flugstrecke erforderliche Zeit abhängig von Masse und Ladung der Ionen ist. Die ankommenden Ionen wurden anschließend von einem Detektor detektiert. Die MALDI-TOF MS-Messungen wurden in einem Reflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonics) mit linearer und Reflektor-TOF-Konfiguration durchgeführt. Die externe Kalibrierung des Messbereichs erfolgte mit einem Standard-Peptid-Gemisch mit bekannten Molekülmassen. Die Auswertung der tryptischen Proteinfragmente wurde mit dem Computerprogramm biotool 2.0 (Bruker Daltonics) durchgeführt.

2.3.12 Ribonukleaseaktivitätstests

RNase-Nachweis im Agarosegel

Mithilfe dieses Experiments sollte RNA als Substrat zusammen mit der Probe inkubiert werden und anschließend die nicht abgebaute RNA mittels Agarosegelelektrophorese untersucht werden. Hierfür wurde 2 µg rRNA aus der Torula Hefe (Sigma) zusammen mit dem Protein mit vermuteter RNase-Aktivität in einem 20 µl Volumen für 1 h bei 38 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser und rekombinantes

Erdnussoleosin mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe mit 5 µl Probenpuffer versetzt und die Agarosegelelektrophorese mit einem 1,2 % Agarose-Gel durchgeführt (siehe 2.2.4).

Photometrischer RNase-Nachweis

Für die quantitative Analyse der Ribonukleaseaktivität wurde die photometrische Methode nach Rosenberg und Dyer (1995) mit Änderungen verwendet. Dazu wurde 20 µg tRNA (Torula Hefe) mit Ara h 8-Konzentrationen zwischen 0 – 2 µg in 800 µl 40 mM Na₃PO₄ (pH 7) versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die nicht abgebaute RNA durch Zugabe von 500 µl 20 mM La(NO₃)₃ und 3 % Perchlorsäure für 15 min auf Eis gefällt und die hydrolysierte RNA nach Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, 4 °C) im Überstand bei 260 nm im Photometer gemessen. Zum Vergleich wurde RNase A (bovine pancreas) unter den gleichen Bedingungen analysiert und RNase-freies Wasser sowie rekombinantes Erdnussoleosin als Negativkontrollen eingesetzt.

2.3.13 ANS-Bindungstest

Prinzip: Um hydrophobe Bindungsbereiche von Proteinen zu analysieren, wurde der Fluoreszenzfarbstoff ANS (8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure) verwendet. Der Farbstoff zeigt keine Fluoreszenz in polarer Umgebung und polaren Lösungsmitteln, wie z.B. Wasser. Durch Bindung an hydrophobe Proteinbereiche wird eine Fluoreszenz bei 474 nm messbar.

Durchführung: Die Experimente erfolgten nach Mogensen et al. (2002) mit den genannten Änderungen. ANS wurde in 1 ml DMSO gelöst und mit Milli-Q-H₂O auf 100 ml aufgefüllt, um eine 1 mM Stammlösung zu erhalten. Anschließend wurden 10 µM ANS mit steigenden Proteinkonzentrationen von 1 – 80 µM in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) versetzt, 5 min im Dunkeln inkubiert und die emittierte Fluoreszenz im TECAN infinite M 200 ELISA reader (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gemessen (Anregung: 380 nm, Emission: 574 nm).

2.3.14 ANS-Verdrängungstest

Zur Untersuchung von möglichen Lipidliganden des Allergens Ara h 8 wurde ebenfalls der Fluoreszenzfarbstoff ANS verwendet. Hierfür wurde 2,5 μM rekombinantes Ara h 8.0201 in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit jeweils 5, 15 und 100 μM Ölsäure, Stearinsäure oder Desoxycholat vermischt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach Zugabe von 10 μM ANS die emittierte Fluoreszenz bei 474 nm im TECAN infinite M 200 ELISA reader gemessen (Anregung: 380 nm). Zum Vergleich wurde 2,5 μM Ara h 8 in 50 mM Phosphatpuffer ohne Lipide gemessen. Die Abnahme der ANS-Fluoreszenz zeigt die Verdrängung des Farbstoffs durch die Bindung des Lipids an. Da die Bindungsstelle durch Liganden besetzt ist, kann ANS dort nicht mehr binden und folglich keine Fluoreszenz emittieren.

2.3.15 Proteolytische Stabilitätstests

Pepsinverdau

Zur Untersuchung der Stabilität von Ara h 8 im Magen wurde ein Verdau mit dem Magenenzym Pepsin, wie bei Pali-Schöll et al. (2010) beschrieben, mit Modifikationen durchgeführt. Dazu wurden 0,0072 Units Pepsin zu 20 μg des zu untersuchenden Proteins in 20 mM Natriumacetat (pH 2,0) gegeben und zusammen bei 37 °C inkubiert. Insgesamt wurden pro Protein 7 Versuchsansätze parallel durchgeführt und der Verdau zu verschiedenen Zeiten (nach 0, 1, 5, 10, 20, 30 bzw. 60 Minuten) durch die Zugabe von 10 μl 100 mM Natriumhydroxid auf Eis beendet. Die Proben wurden anschließend mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100 °C erhitzt, in der SDS-PAGE (2.3.3) aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt (2.3.3.1).

Verdau mit Enzynorm f® Kreon®

Um die Stabilität von Ara h 8 unter dem Einfluss von Bauchspeicheldrüsen- (Pankreas-) Enzymen zu untersuchen, die an der Zersetzung von fetthaltigen Speisen im Darm beteiligt sind (Lipasen), wurde ein kombinierter Verdau mit einem Magensaft- und anschließend mit

einem Pankreas-Surrogat nach Kortekangas-Savolainen et al. (1993) mit Modifikationen durchgeführt.

Hierfür wurde jeweils eine Tablette Enzynorm f® (Nordmark Arzneimittel, Uetersen) als Magensaftäquivalent bzw. Kreon® (Abbott Laboratories, Illinois, USA) als Pankreasäquivalent mit dem Mörser zermahlen und in isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % (w/v) NaCl) auf Eis gelöst, filtriert und jeweils der pH-Wert eingestellt (Enzynorm f®: pH 2,0; Kreon®: pH 7,0). Der Verdau wurde zuerst mit Enzynorm f® in einem Protein/Enzym-Verhältnis von 10 µg Ara h 8:0,067 µg Enzynorm f® (entspricht 0,000046 Ph.Eur.E (European Pharmacopoeia Unit) in 320 µl Gesamtvolumen angesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung des Verdau wurden sofort nach Zugabe von Enzynorm f® 7 Proben à 20 µl abgenommen und separat bei 37 °C inkubiert. Diese wurden zu unterschiedlichen Zeiten (nach 0, 5, 10, 20, 30, 60 bzw. 120 min) durch die Zugabe von jeweils 15 µl 1 M NaOH auf Eis gestoppt, entsalzt (Protein Desalting Columns, Thermo Fisher, Massachusetts, USA), mit jeweils 7 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE (2.3.3) und Coomassie-Färbung (2.3.3.1) analysiert.

Mit dem restlichen bereits für 2 h lang bei 37 °C inkubierten Ara h 8/Enzynorm f®-Ansatz wurde anschließend der Verdau mit dem Pankreassurrogat Kreon® durchgeführt. Dazu wurde Kreon® in einem Protein/Enzym-Verhältnis von 10 µg Ara h 8 : 0,57 µg Kreon® (entspricht 0,002287 Ph.Eur.E) zum Enzynorm®-Ansatz gegeben und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Der Verdau wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Zusätzlich wurden, wie beim Magensaftverdau, direkt nach der Zugabe von Kreon® 7 Proben à 40 µl abgenommen, separat bei 37 °C inkubiert und der Verdau zu unterschiedlichen Zeiten (nach 0, 5, 10, 20, 30, 45 bzw. 60 min) mit 15 µl 1 M NaOH auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend entsalzt (Protein Desalting Columns, Thermo Fisher) und auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel untersucht.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Bet v 1-homologe Erdnussallergen Ara h 8 erstmalig genau untersucht. Die Analyse der biologischen Funktion und der Stabilität des Allergens standen hierbei im Fokus, da insbesondere die Stabilität im Zusammenhang mit der Symptomstärke bei Allergien steht. Für die molekulare Charakterisierung musste eine neue Isolationsmethode entwickelt werden, damit Experimente mit dem natürlichen Protein durchgeführt werden konnten, das mit herkömmlichen Methoden bisher nicht gewonnen werden konnte.

3.1 Ara h 8

Ara h 8 wurde erstmalig von Riecken und Kollegen (2008) aus der Erdnuss isoliert. Die Isolierung mit Standardmethoden erwies sich jedoch als äußerst schwierig, sodass lediglich sehr geringe Ara h 8-Mengen gewonnen werden konnten. Zudem mussten die Erdnussallergene Ara h 8 und Ara h 6 mit Hilfe einer chemischen Modifizierung (Reduktion und Alkylierung der Cysteinreste) voneinander getrennt werden, welche die Proteinstruktur unbeabsichtigt beeinträchtigen könnte. Deshalb sollte eine neue Methode entwickelt werden, die eine höhere Ara h 8-Ausbeute ermöglicht, damit die molekularen Eigenschaften des Proteins untersucht werden können.

3.1.1 Aufreinigung und Isolierung von Ara h 8

Um Ara h 8 aus Erdnussmehl zu isolieren, wurden zunächst die Extraktionsbedingungen bestimmt und optimiert. Hierzu wurde nicht entfettetes Erdnussmehl mit wässrigen Puffern extrahiert und der pH-Wert und die Extraktionsdauer variiert. Mit einer Extraktionsdauer von einer Stunde wurde das beste Ergebnis ermittelt. Mit Aceton entfettetes Erdnussmehl zeigte keine Veränderung im Protein- und Allergenspektrum. Die Analyse der angereicherten Proteine im Extrakt erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung. Für den Ara h 8-Nachweis im Immunoblot wurde ein Kaninchenserum verwendet, das gegen das Bet v 1-homologe Allergen der Sojabohne Gly m 4 generiert wurde und mit Ara h 8 kreuzreagiert.

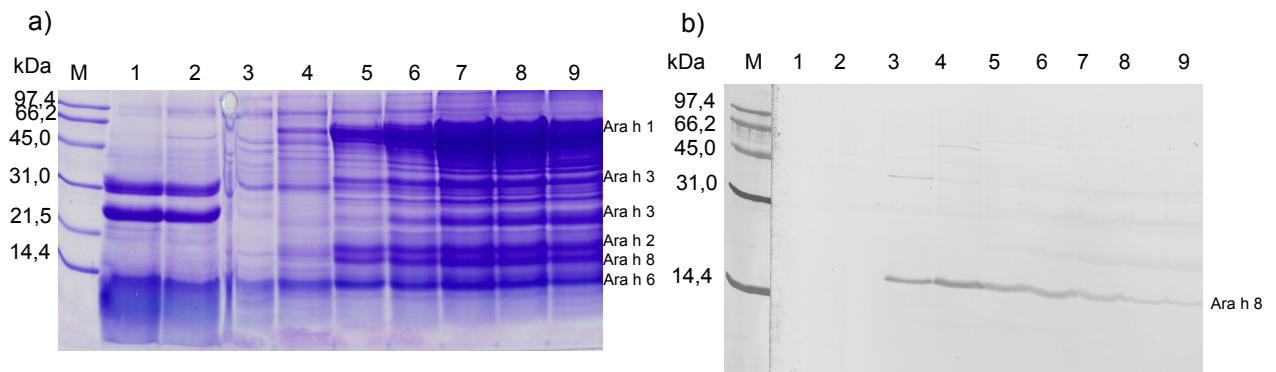


Abbildung 2: Anreicherung von Erdnussallergenen mit Puffern auf Wasserbasis (pH 3-6). SDS-PAGE, 15 % Acrylamid, reduzierende Bedingungen, 15 µg Extrakt. a) Coomassie-Färbung, b) Immunoblot mit Ara h 8-kreuzreagierendem Kaninchenserum (anti-Gly m 4). (M) Marker, (1) pH 3, (2) pH 4, (3) pH 5, (4) pH 6, (5) pH 7, (6) pH 8, (7) pH 9, (8) pH 10, (9) pH 11 (Marker wurde mit India Ink gefärbt).

Das Coomassie-Gel in Abb. 2a zeigt deutlich, dass bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Proteine im Extrakt angereichert wurden. Nach saurer Extraktion bei pH 3 und 4 (Probe Nr. 1 u. 2) sind neben zahlreichen Proteinen von sehr geringer Konzentration 3 intensivere Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 14, 28 und 32 kDa detektiert worden. Die 14 kDa-Bande entspricht dem Laufverhalten des Erdnussallergens Ara h 6 (MW = 15 kDa) in der SDS-Gelelektrophorese (Becker und Jappe 2014, Riecken et al. 2008). Das 28 kDa große Protein könnte der basischen Untereinheit des Erdnussallergens Ara h 3/4 zugeordnet werden (Becker und Jappe 2014), wohingegen die 32 kDa-Bande keinem bekannten Erdnussallergen entspricht. Jedenfalls konnte bei diesen beiden sauren pH-Werten kein Ara h 8 (17 kDa) im Erdnussextrakt nachgewiesen werden (Abb. 2a und 2b).

Ab pH 5 (Spur Nr. 3) nahm mit steigendem pH-Wert die extrahierte Proteinkonzentration zu. Auf dem Coomassie-Gel aus Abb. 2a sind in den Extrakten von pH 5 bis pH 11 (Proben Nr. 3-9) neben zahlreichen anderen Proteinen vor allem 6 intensivere Protein-Banden zu erkennen. Diese Proteine entsprechen dem Laufverhalten von Ara h 6 (15 kDa), Ara h 8 (17 kDa), Ara h 2 (17 bzw. 18 kDa), Ara h 3 (basische Untereinheit: 28 kDa), Ara h 3 (saure Untereinheit: 43 kDa) und Ara h 1 (64 kDa) (Becker und Jappe 2014).

Im Immunoblot (Abb. 2b) wurde die 17 kDa-Bande mit dem anti-Gly m 4 Antikörper als Ara h 8 bestätigt, da das Kaninchenserum mit Ara h 8 kreuzreagiert (Riecken et al. 2008). Demnach konnte Ara h 8 unter neutralen und basischen Bedingungen in wässrigen Extraktionspuffern angereichert werden, wobei die Gesamtproteinkonzentration in den basischen Extrakten am höchsten war.

Um die Ara h 8-Menge noch weiter zu erhöhen, wurde mit dem basischen Erdnussextrakt (pH 9) eine Lipidextraktion mit Chloroform und Methanol (v/v = 5/4) durchgeführt. Dabei soll-

ten die Lipid-assoziierten ("lipophilen") Proteine im Extrakt angereichert werden. Entsprechend der Hypothese, dass Ara h 8 an Lipide in der Erdnuss gebunden vorliegt, könnte hierdurch eine vermehrte Ara h 8-Anreicherung erreicht werden.

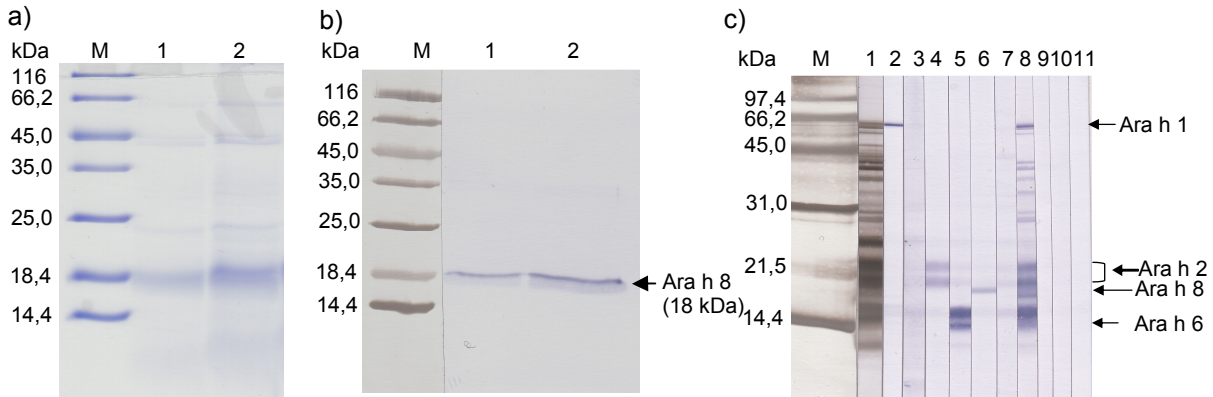


Abbildung 3: Anreicherung von Erdnussproteinen durch Lipidextraktion (pH 11). SDS-PAGE (15 % Acrylamid, red. Bed). a) Coomassie-Färbung, b) Immunoblot mit anti-Gly m 4 Kaninchenserum. (M) Marker, (1) 10 µg, (2) 20 µg Extrakt. c) Immunoblot mit mono- und polyklonalen Antikörpern, 17 µg/cm Extrakt. (M) Marker, (1) India Ink, (2) anti-Ara h 1 mAk (Pn-t), (3) anti-Ara h 3/4 mAk (Pn-x), (4) Kaninchen anti-Ara h 2 (MAP 3), (5) Kaninchen anti-Ara h 6, (6) Kaninchen anti-Gly m 4 (Ara h 8), (7) Kaninchen anti-Oleosin (MAP) Antikörper, (8) Patientenserum JG3, (9) anti-Maus IgG + IgM, (10) anti-Kaninchen IgG, (11) anti-Human IgE.

Wie in Abb. 3a und 3b zu sehen ist, wurde durch die Lipidextraktion vor allem Ara h 8 (17 kDa) im Extrakt angereichert. Es waren jedoch auch Spuren weiterer Proteine bei ca. 64 kDa, 44 und 43 kDa und 24 kDa im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 3a) erkennbar. Um diese zu identifizieren, wurde ein Immunoblot mit monoklonalen und polyklonalen Erdnussallergen-Antikörpern durchgeführt, der in Abb. 3c dargestellt ist. Der Immunoblot zeigt deutlich, dass der Extrakt neben Ara h 8 (Spur 6) vor allem Ara h 1 (63 kDa, Spur 2), zwei Ara h 2-Isoformen (17 und 19 kDa, Spur 4) und Ara h 6 (14,5 kDa, Spur 5) enthält. Die Proteindoppelbande bei 43 und 44 kDa in Abb. 3a entspricht dem Molekulargewicht der sauren Untereinheit von Ara h 3/4. Dies konnte jedoch im Immunoblot nicht bestätigt werden (Abb. 3c, Spur 3). Die Gesamtproteinfärbung mit India Ink (Spur 1) zeigte sehr deutlich, dass zusätzlich noch andere Proteine im niedermolekularen Bereich zwischen 66 und 9 kDa in geringer Menge im Extrakt vorhanden waren.

Demnach konnte durch die Kombination der basischen Extraktionsmethode mit einer anschließenden Lipidextraktion der Ara h 8-Gehalt im Extrakt deutlich erhöht werden, während die Anzahl der Fremdproteine gleichzeitig verringert wurde.

Um Ara h 8 aus dem Extrakt sauber zu isolieren, wurden verschiedene Trennverfahren und Trennansätze ausprobiert.

3.1.1.1 Trennverfahren zur Aufreinigung von nAra h 8

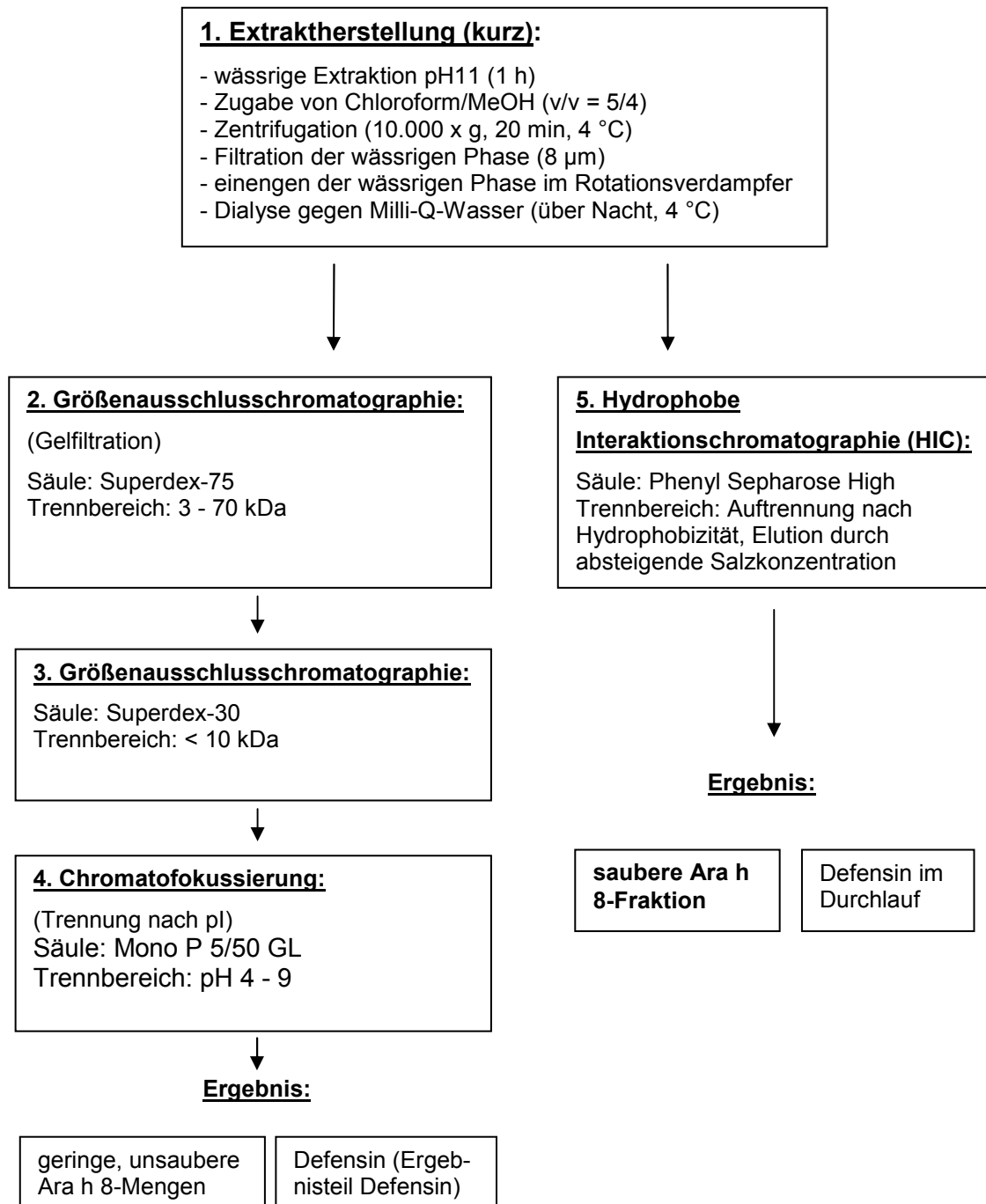


Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Trennmethode, die zur Ara h 8-Aufreinigung aus Erdnussextrakt durchgeführt wurden.

Größenausschlusschromatographie (Schritte Nr. 2 und Nr. 3):

Um die kontaminierenden Proteine abzutrennen und Ara h 8 aufzureinigen, wurde der lipophile Extrakt nacheinander über zwei unterschiedliche Gelfiltrationssäulen getrennt. Die Superdex-75 Säule trennte insbesondere im Bereich zwischen 3 – 70 kDa auf, während die Superdex-30 Säule Proteine mit einer Größe unterhalb von 10 kDa optimal isolieren sollte.

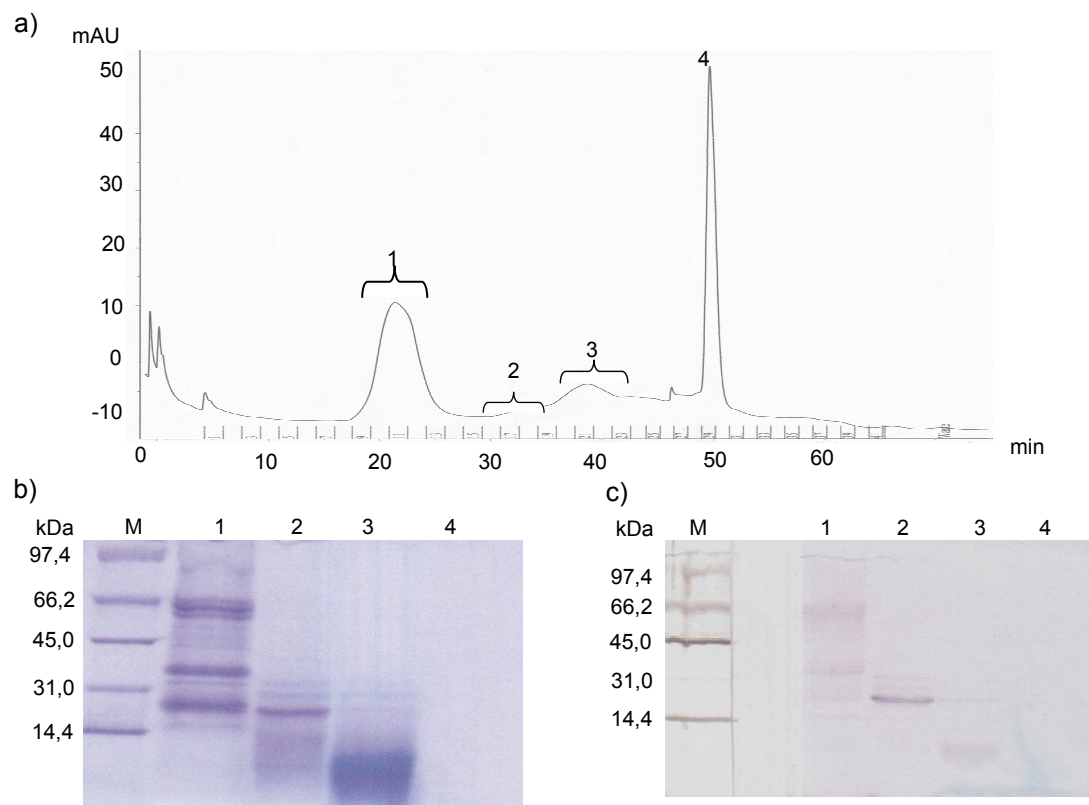


Abbildung 5: Trennung der lipophilen Erdnussextraktkomponenten mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex-75 Säule). a) Chromatogramm (280 nm); b) SDS-PAGE (15% Acrylamid, red. Bedingungen), Coomassie-Färbung; c) Immunoblot mit anti-Gly m 4 Kaninchenserum zur Detektion von Ara h 8. (M) Marker, (1) Fraktion 9-13 (Peak 1), (2) Fraktion 17-19 (Peak 2), (3) Fraktion 20-22 (Peak 3), Fraktion 29-30 (Peak 4).

Mit der Superdex-75 Säule wurden 4 Proteinfractionen voneinander separiert, die im Chromatogramm durch 4 deutliche Peaks dargestellt sind (Abb. 5a). In der ersten Fraktion befinden sich die größeren Proteine von ca. 30, 33 und 64 kDa (Abb. 5b). Der zweite Peak enthält neben wenigen Fremdproteinen im niedermolekularen Bereich vor allem Ara h 8 (Abb. 5a),

wie der Immunoblot bestätigt (Abb. 5c). Zuletzt wurden Proteine < 14 kDa abgetrennt, die im Wesentlichen eine Proteinbande bei ca. 8 kDa in der dritten Fraktion zeigte (Abb. 5b). In der vierten Fraktion wurden keine Proteine detektiert. Die Fraktion Nr. 2 enthielt neben Ara h 8 noch weitere Proteine, die abgetrennt werden sollten. Deshalb wurde eine weitere Größenausschlusschromatographie mit der Probe durchgeführt. Da die Fremdproteine vor allem im niedermolekularen Bereich lagen, wurde hierfür die Superdex-30 Säule verwendet, welche Proteine unterhalb von 10 kDa abtrennt.

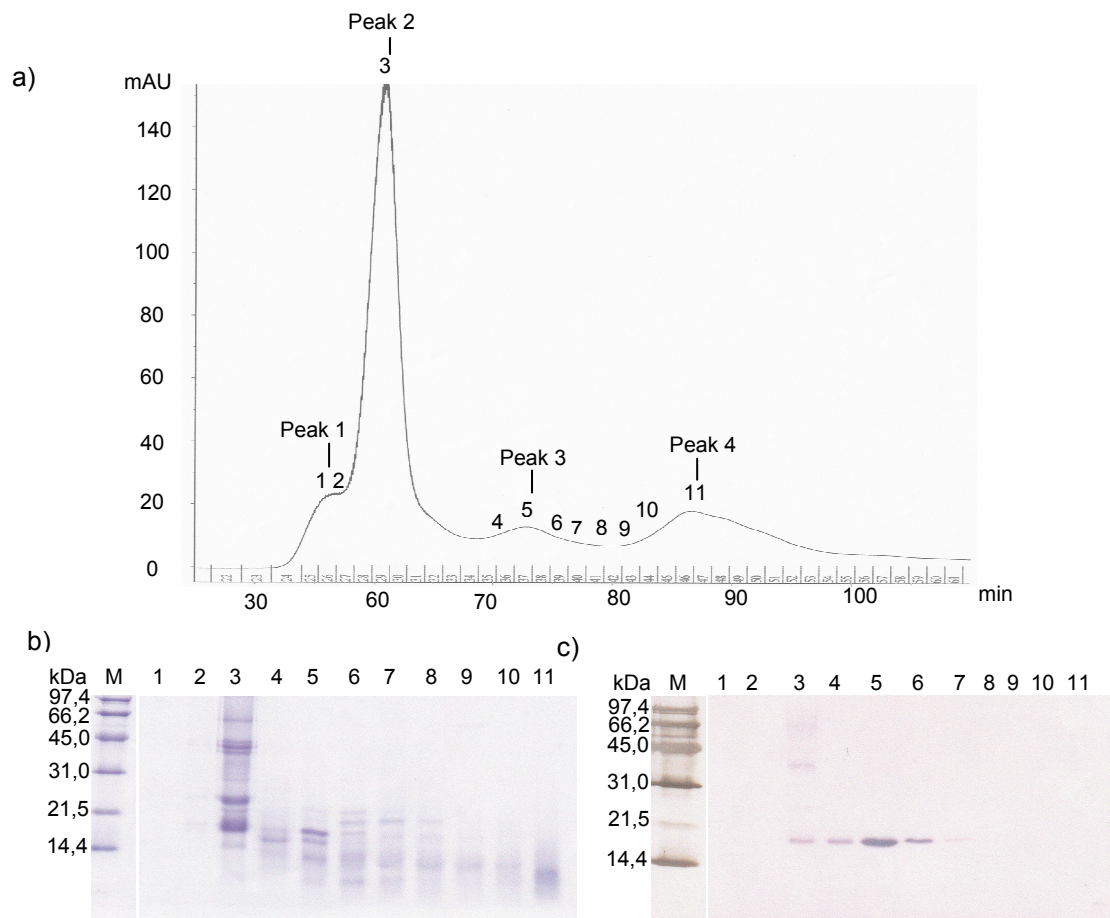


Abbildung 6: Größenausschlusschromatographie von lipophilem Erdnussextrakt mit der Superdex-30 Säule. a) Chromatogramm; b) SDS-PAGE (15 % Acrylamid, red. Bedingungen), Coomassie-Färbung, c) Immunoblot zur Detektion von Ara h 8 mit anti-Gly m 4 Kaninchenserum. (M) Marker, (1) Fraktionen 24-26, (2) Fraktion 27, (3) Fraktionen 28-31, (4) Fraktion 35, (5) Fraktionen 36-38, (6) Fraktion 39, (7) Fraktion 40, (8) Fraktion 41, (9) Fraktion 42, (10) Fraktion 43, (11) Fraktionen 44-53.

Das Chromatogramm in Abb. 6a zeigt 4 Peaks. Im zweiten Peak wurden die meisten Proteine gefunden, wie auf dem Coomassie-gefärbten Gel zu sehen ist (Abb. 6b, 3). Dieser enthielt neben Ara h 8 (17 kDa) noch weitere Proteine bei ca. 23, 43 und 64 kDa. Wie im

Immunoblot zu sehen ist (Abb. 6c), enthielt der dritte Peak (Fraktion 5) den höchsten Ara h 8-Gehalt. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt jedoch zusätzlich eine Reihe anderer Proteine, die kleiner als 17 kDa sind. Von den Fraktionen zwischen den Peaks enthielten die Proben Nr. 4 und 6 eine geringe Menge Ara h 8. Aufgrund der geringen Konzentration und den Verunreinigungen mit anderen Proteinen sind sie jedoch für weitere Trennschritte ungeeignet. Da im dritten Peak (Fraktion 5) der höchste Ara h 8-Gehalt bei einer vergleichsweise geringen Konzentration von Fremdproteinen detektiert wurde, sollte die Probe für die weitere Aufreinigung verwendet werden.

Chromatofokussierung (Schritt Nr. 4):

Die Abtrennung der restlichen Fremdproteine nach den vorangegangenen Gelfiltrations-Schritten sollte weiter mittels Chromatofokussierung erfolgen, um die Proteine nach dem isoelektrischen Punkt aufzutrennen (theoretischer pI von Ara h 8: 5,07).

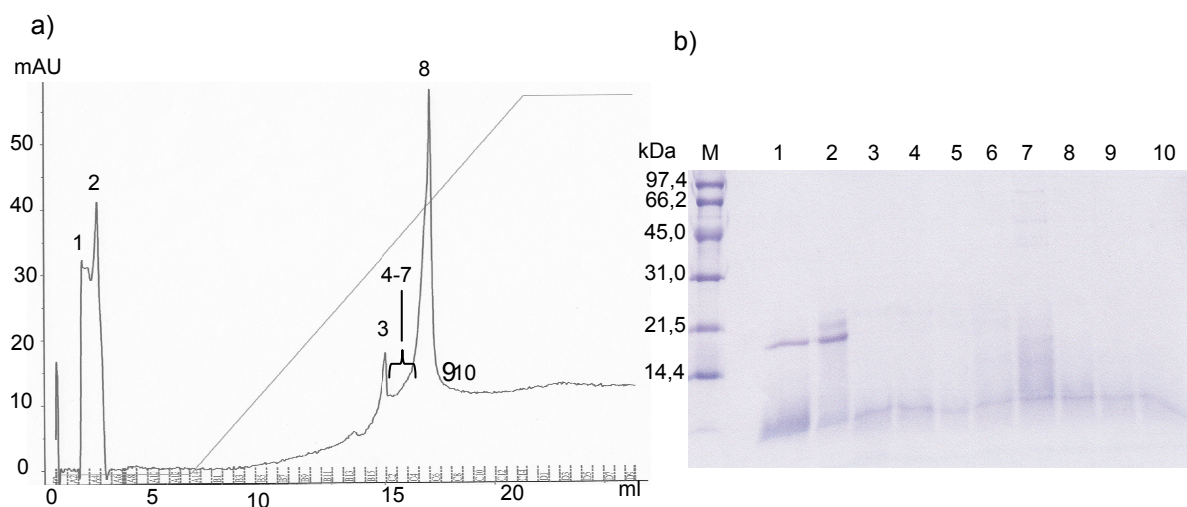


Abbildung 7: Aufreinigung der Fraktion Nr. 5 aus der Größenausschlusschromatographie mittels Chromatofokussierung. a) Chromatogramm, b) SDS-PAGE, Coomassie-Färbung (15 % Acrylamid, reduzierende Bedingungen), (M) Marker, (1) Fraktion A3, (2) Fraktion A4, (3) Fraktion C1, (4) Fraktion C2, (5) Fraktion C3, (6) Fraktion C4, (7) Fraktion C5, (8) Fraktion C6, (9) Fraktion C7, (10) Fraktion C8.

Mit dieser Methode konnten die Fremdproteine jedoch nicht vollständig entfernt werden. Zwar enthielten die Fraktionen 1 und 2 jeweils eine Proteinbande in der Größe von Ara h 8 (17 kDa), jedoch waren noch Fremdproteine bei 10 und 20 kDa zu erkennen (Abb. 7b). Das

Protein mit einer Größe von ca. 10 kDa konnte in den Fraktionen 3-10 hingegen mit hoher Reinheit isoliert und identifiziert werden (siehe Ergebnisteil Defensin). Die Fraktionen 1 und 2 enthielten zu niedrige Ara h 8-Konzentrationen, sodass sie für eine weitere Aufreinigung ungeeignet waren.

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) (Schritt Nr. 5):

Da die Aufreinigungsmethode, die insgesamt drei Reinigungsschritte nacheinander umfasste, keine reine Ara h 8-Fraktion enthielt, wurde eine andere Reinigungsmethode entwickelt. Basierend auf der Hypothese, dass Ara h 8 ähnlich wie Bet v 1 hydrophobe Proteinbereiche aufweist, um an Lipide zu binden, wurde eine Methode gewählt, welche Proteine nach ihrer Hydrophobizität voneinander trennt. Hierfür wurde erneut Ara h 8-angereicherter Erdnussextrakt (siehe Schritt Nr. 1 in der Übersichtsdarstellung) hergestellt und anschließend mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) aufgetrennt.

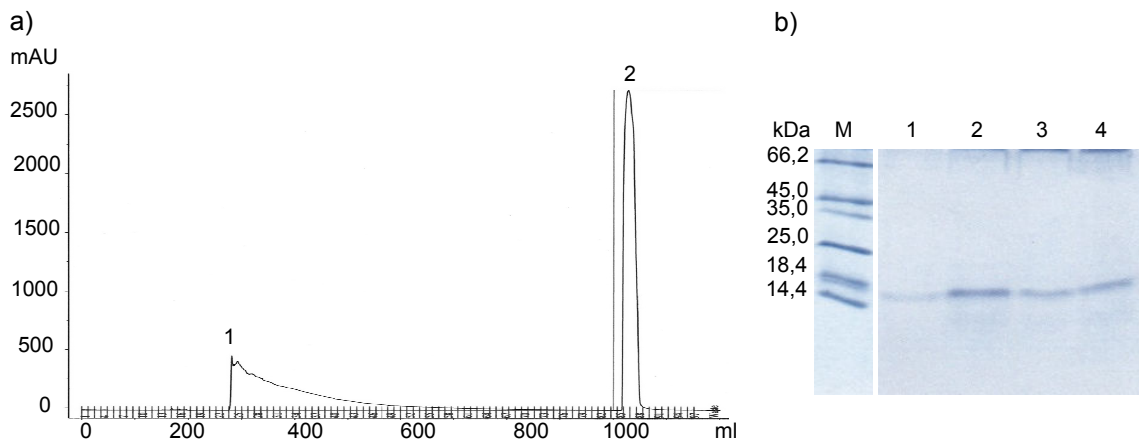


Abbildung 8: Trennung von lipophilem Erdnussextrakt mittels Hydrophober Interaktionschromatographie. a) Chromatogramm, b) SDS-PAGE (15 % Acrylamid, reduzierende Bedingungen). (M) Marker, (1) Fraktion 1 (10 µg), (2) Fraktion 1 (20 µg), (3) Fraktion 2 (10 µg), (4) Fraktion 2 (20 µg). Coomassie-Färbung

Da bei der HIC die Hydrathüllen der Proteine durch Zugabe von Salzionen zunächst entfernt werden müssen, damit die hydrophoben Proteinbereiche frei sind und an die Säulenmatrix binden können, wurde die Salzkonzentration der Probe auf eine Endkonzentration von 1 M Ammoniumsulfat eingestellt. Nach Bindung an die Säule wurden die Proteine durch eine Absenkung der Salzkonzentration in einem Konzentrationsgradienten von der Säule eluiert.

Hierzu wurde Milli-Q-Wasser verwendet. Das Chromatogramm aus Abb. 8 zeigt einen deutlichen Peak (Nr. 1), der durch die Verringerung der Salzkonzentration erreicht wurde. Zur Reinheitskontrolle wurde diese Fraktion in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im SDS-Gel untersucht. Die Probe enthielt eine Proteinbande von ca. 17 kDa, die mittels N-terminaler Proteinsequenzierung und Peptid-Fingerprintmethode als Ara h 8.0201 identifiziert wurde. Um die Säule für weitere Aufreinigungen von etlichen, noch an der Säule verbliebenen Proteinresten zu reinigen, wurde anschließend ein Reinigungsschritt mit 50 % Ethanol durchgeführt. Hierbei wurde eine weitere Proteinfraction sauber eluiert (Peak Nr. 2), die im SDS-Gel überprüft und durch N-terminale Proteinsequenzierung und Peptid-Fingerprint-Methode ebenfalls als Ara h 8.0201 identifiziert wurde.

Somit konnte Ara h 8 mit Hilfe einer neuen Extraktionsmethode in verhältnismäßig großen Konzentrationen im Extrakt angereichert werden. Hierdurch konnte eine neue einschrittige Aufreinigungsstrategie für natürliches Ara h 8 entwickelt werden. So gelang es erstmalig, natürliches Ara h 8 in ausreichender Konzentration (20 µg Ara h 8 pro Gramm Erdnussmehl) zu isolieren, um das Allergen anschließend charakterisieren zu können.

3.1.2 Molekulare Charakterisierung von Ara h 8

3.1.2.1 Immunoblotting und 2D-Elektrophorese

Um die IgE-Reaktivität von Ara h 8 zu untersuchen, wurden Westernblots mit 5 verschiedenen Erdnussallergiker-Seren durchgeführt. Die Patienten hatten eine kombinierte Birkenpollen- und Erdnussallergie und litten am oralen Allergiesyndrom. Als Negativkontrolle wurde das Serum eines Nichtallergikers eingesetzt. Zum Vergleich wurden Immunoblots mit wässrigem Erdnussextrakt, lipophilem Extrakt (Extrakt, der für die Isolierung von Ara h 8 verwendet wurde), natürlichem Ara h 8 (nAra h 8) und rekombinantem Ara h 8 (rAra h 8) durchgeführt.

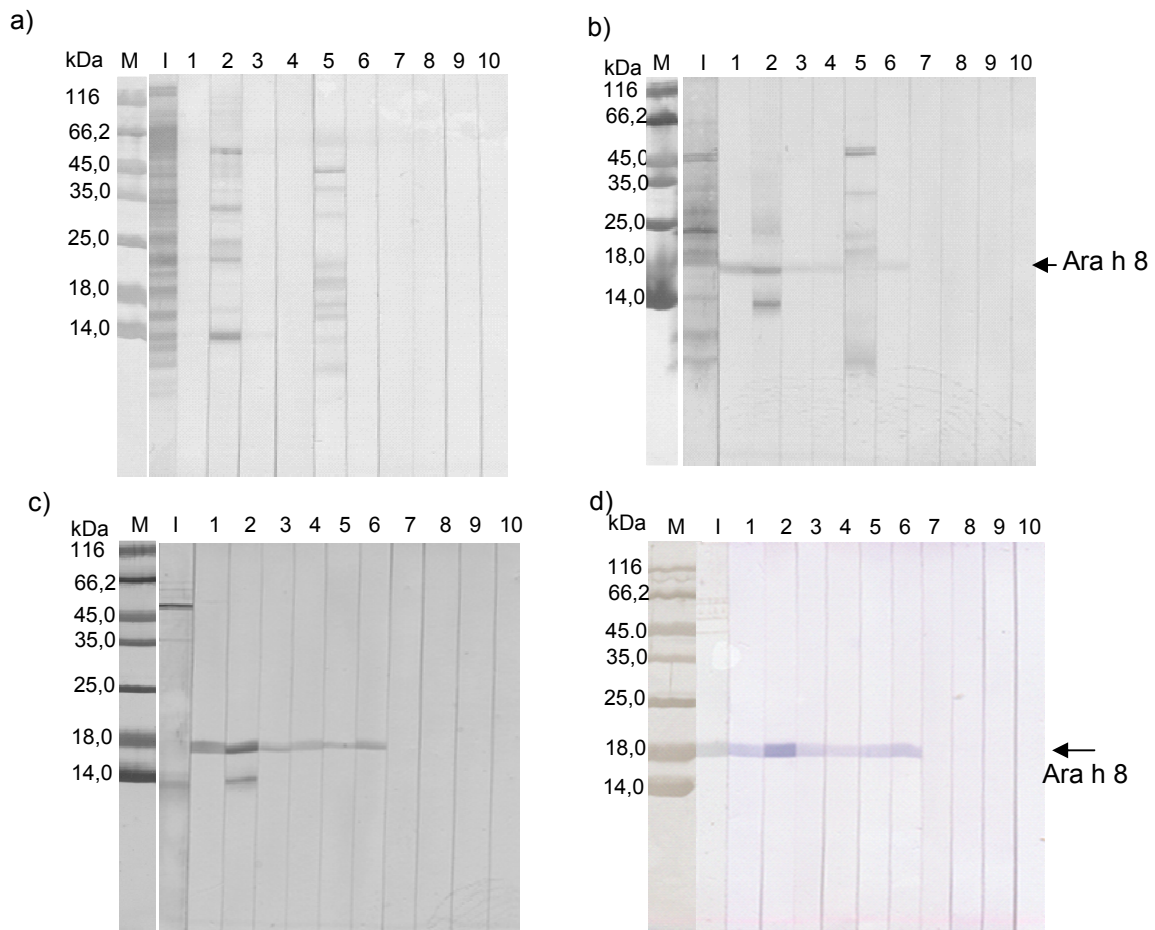


Abbildung 9: Immunoblot mit Patientenseren zur Überprüfung der IgE-Reaktivität von Ara h 8 im Erdnussextrakt. a) wässriger Extrakt, b) lipophiler Extrakt (pH 11), c) isoliertes nAra h 8, d) rekombinantes Ara h 8. (M) Marker, (I) India ink, (1) anti-Gly m 4 Kaninchenserum, (2-6) Patientenseren, (7) Serum eines Nichtallergikers (Negativkontrolle), (8) anti-Kaninchen IgG, (9) anti-Human IgG, (10) Pufferkontrolle.

Abbildung 9a zeigt den Immunoblot des wässrigen Erdnussextraktes. Obwohl zahlreiche Proteine detektiert wurden, ist mit dem Anti-Gly m 4 Kaninchenserum kein Ara h 8 nachgewiesen worden (Spur 1). Im lipophilen Extrakt ist hingegen eine deutliche Ara h 8-Bande erkennbar, die auch von den Patientenseren Nr. 2-6 detektiert wurde (Abb. 9b). Demzufolge weist Ara h 8 eine starke IgE-Reaktivität auf und ist ein wichtiges Allergen für Patienten mit einer kombinierten Erdnuss- und Birkenpollenallergie. Der Immunoblot von nAra h 8 (Abb. 9c) und rAra h 8 (Abb. 9d) zeigte ebenfalls bei allen fünf verwendeten Patientenseren eine deutliche Ara h 8-spezifische Proteinbande, was die IgE-Reaktivität von Ara h 8 bestätigt. Bei einem Patientenserum (Abb. 9c, Spur 2) wurde zusätzlich eine ca. 14 kDa große IgE-reaktive Proteinbande detektiert. Hierbei handelt es sich vermutlich um das Erdnuss-Profilin Ara h 5 (14 kDa) (persönliche Mitteilung von Dr. W-M. Becker).

Für die Charakterisierung des aufgereinigten nAra h 8 wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde nAra h 8 zuerst mithilfe der isoelektrischen Fokussierung nach dem isoelektrischen Punkt in einem pH-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt. Parallel wurde eine 2D- Elektrophorese unter den gleichen Bedingungen mit anschließendem Immunoblot durchgeführt und Ara h 8 mit dem anti-Gly m 4 Kaninchenserum spezifisch nachgewiesen. Zur Überprüfung der IgE-Reaktivität wurden Immunoblots mit Erdnussallergiker-Patientenseren durchgeführt.

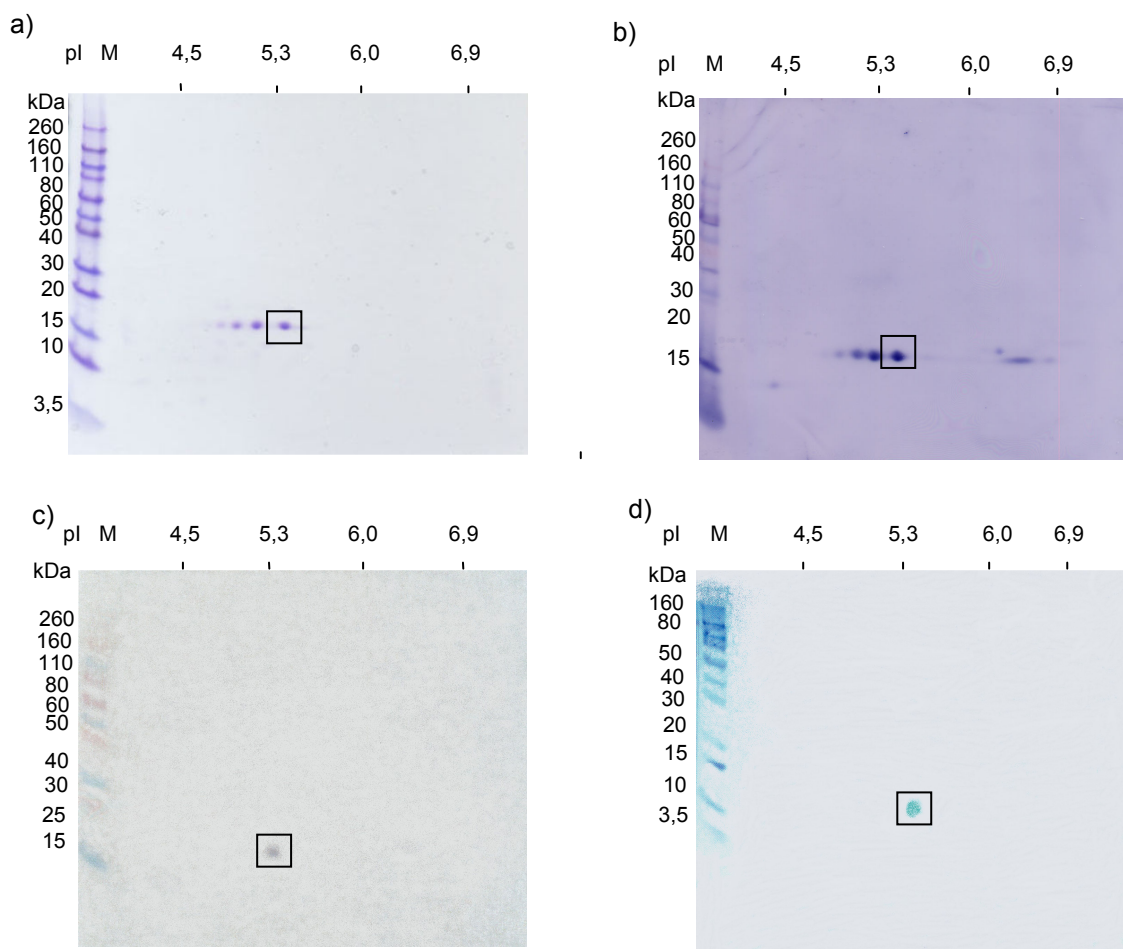


Abbildung 10: Überprüfung der Isoformen von nAra h 8. 2D-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen von 25 µg nAra h 8 mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 (IEF) und anschließender SDS-PAGE (4-20% Tris-Glycine Gel). a) Coomassie-Färbung; b) Immunoblot (PVDF Membran) mit anti-Gly m 4 Kaninchenserum und NBT/BCIP; c) Immunoblot mit einem Erdnussallergiker-Patientenserum; d) 2D-PAGE von rekombinantem Ara h 8.0201 mit Coomassie-Färbung. Das schwarze Kästchen zeigt die identifizierte Ara h 8.0201 Isoform.

In Abb. 10a ist eine 2D-Elektrophorese von natürlichem Ara h 8 mit anschließender Coomassie-Färbung dargestellt. Es waren insgesamt 4 Proteine mit gleicher Größe von ca. 17 kDa erkennbar, die jedoch verschiedene isoelektrische Punkte aufwiesen. Sie lagen mit pI 4,7, pI 4,9, pI 5,0 und pI 5,3 sehr nahe beieinander. Jedoch waren nicht alle vier Proteine mit der gleichen Intensität auf dem Gel zu erkennen. Der Proteinspot bei pI 4,7 war sehr schwach und kaum sichtbar. Der Spot bei pI 4,9 war etwas intensiver ausgeprägt. Am stärksten waren jedoch die Spots bei pI 5,0 und pI 5,3 zu erkennen, sodass hauptsächlich diese Proteine in der Ara h 8-Fraktion vorhanden waren. Die Überprüfung im Immunoblot mit dem Ara h 8-spezifischen anti-Gly m 4 Kaninchenserum (Abb. 10b) zeigte bei allen 4 Proteinen eine Immunoreaktivität an. Demnach sind Verunreinigungen durch andere Proteine auszuschließen. Das Ergebnis deutet auf verschiedene Ara h 8-Isoformen hin, die durch Austausch einzelner Aminosäuren in der Proteinsequenz zustande kommen können. Die mit dem Kästchen markierte Isoform wurde nach der 2D-PAGE ausgeschnitten, auf eine PVDF-Membran transferiert und der N-Terminus mittels Edman-Abbau analysiert. Es handelte sich hierbei um Ara h 8.0201.

Um die IgE-Reaktivität zu überprüfen, wurde mit der Ara h 8-Fraktion nach der 2D-PAGE ein Immunoblot mit einem Erdnussallergiker-Serum durchgeführt (Abb. 10c). In Abbildung 10c ist deutlich zu erkennen, dass das Erdnussallergiker-Patientenserum nur mit der Ara h 8-Isoform bei pI 5,3, die vorher in der N-terminalen Proteinsequenzierung als Ara h 8.0201 nachgewiesen wurde, reagierte. Die anderen Isoformen zeigten keine IgE-Reaktivität. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde rekombinant hergestelltes Ara h 8.0201 ebenfalls in der 2D-PAGE untersucht (Abb. 10d). Der Proteinspot im Immunoblot entsprach dem IgE-reaktiven Spot aus Abbildung 10c (dem Blot mit dem Patientenserum). Demnach war in der aufgereinigten Fraktion hauptsächlich Ara h 8.0201 als IgE-reaktives Allergen vorhanden.

3.1.2.2 Kreuzreaktivität mit Bet v 1

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität von Ara h 8 wurden Kreuz-Inhibitionstests mit dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 durchgeführt. Hierfür wurde ein Ara h 8-reaktives Patientenserum mit rekombinant hergestelltem Bet v 1a (rBet v 1.0101) vorinkubiert. Anschließend wurde im Immunoblot überprüft, ob die Ara h 8-spezifische IgE-Reaktivität noch vorhanden war. Als Kontrolle wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Inhibitor eingesetzt.

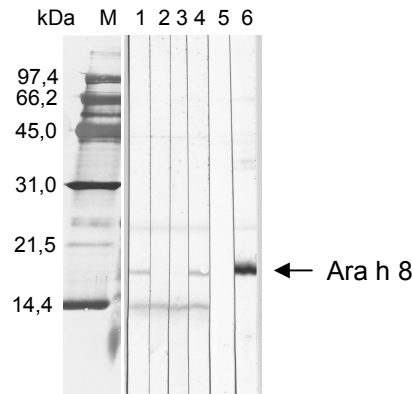


Abbildung 11: Inhibitionstest zur Untersuchung der IgE-Kreuzreaktivität von Ara h 8 mit Bet v 1. Immunoblot mit lipophilem Erdnussextrakt. (M) Marker; Präinkubation des Patientenserums (1) mit 25 µg BSA (Negativkontrolle), (2) mit 25 µg rBet v 1, (3) mit 25 µg rAra h 8.0201 (Positivkontrolle), (4) ohne Vorinkubation; (5) Pufferkontrolle; (6) Kontrolle detektiert mit Gly m 4 Antiserum.

In der ersten Probe befindet sich die BSA-Kontrolle (Abb. 11). Diese zeigt eine deutliche IgE-reaktive Bande, die Ara h 8 entspricht. Demnach hatte das BSA keinen inhibierenden Effekt. Die zweite Probe wurde mit Bet v 1 vorinkubiert, was zur Inhibierung der Ara h 8-IgE-Reaktivität führte. Folglich konnten die Bet v 1-Moleküle an die Allergen-spezifischen IgE-Antikörper im Patientenserum binden. Durch die Blockierung der Bindungsstellen konnten die IgE-Antikörper nicht mehr an dem Ara h 8 auf der Blotmembran binden, weshalb keine Ara h 8-Bande detektiert werden konnte. Die Inkubation des Serums mit Ara h 8 (Spur 3) führte zu dem gleichen Ergebnis (Selbst-Inhibition). (In allen Proben wurde ein Protein von ca. 14,5 kDa vom Patientenserum detektiert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das 14,5 kDa große Allergen Ara h 6, das als Verunreinigung im Extrakt vorhanden war (siehe Abb. 3c, Nr.5)).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Allergen-spezifischen IgE-Antikörper des getesteten Patientenserums auch mit dem Birkenpollenmajorallergen Bet v 1 reagieren. Durch die Bindung an Bet v 1 wurden die Bindungsstellen auf der Oberfläche der IgE-Antikörper blockiert und waren für Ara h 8 im Folgeschritt auf der Blotmembran nicht mehr frei zugänglich. Da beide Allergene von denselben Antikörpern erkannt werden, kommt es zu Kreuzreaktionen zwischen den Allergenen, die Kreuzallergien verursachen können. Demnach sind die spezifischen IgE-Antikörper wahrscheinlich gegen Bet v 1 gebildet worden und erkennen Ara h 8 aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Bet v 1.

3.1.2.3 Analyse der Sekundärstruktur und Thermostabilität

Um die Proteinstruktur und die Thermostabilität zu untersuchen, wurden CD-Spektren von rekombinantem und natürlichem Ara h 8 im kurzwelligen UV-Bereich (170 - 250 nm) aufgenommen. Zum Vergleich wurde natürliches Bet v 1 mit analysiert. Der Vergleich mit Referenz-Spektren von bekannten Proteinstrukturen ermöglicht die Berechnung der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente. Zur Untersuchung der Thermostabilität wurden anschließend CD-Spektren bei steigenden Temperaturen aufgenommen und Strukturänderungen im Bereich von 40 °C bis 95 °C analysiert.

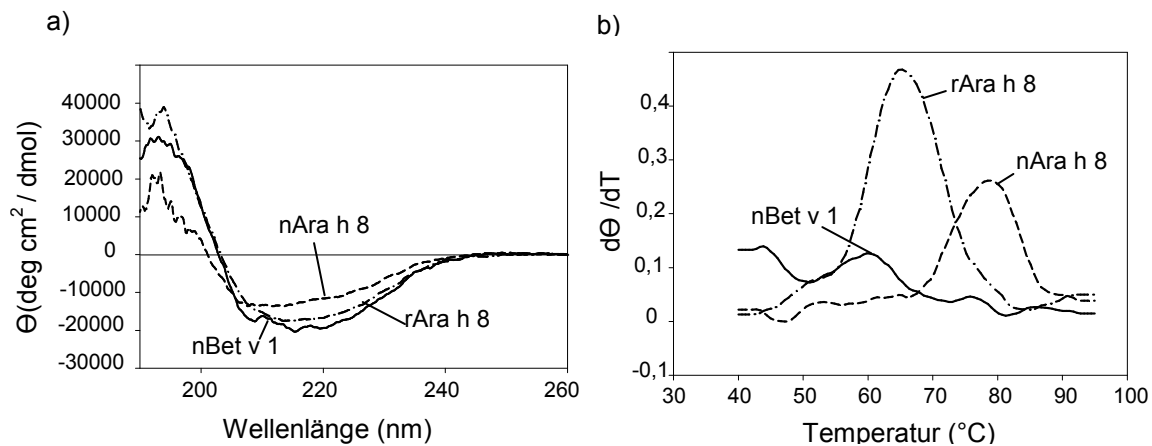


Abbildung 12: Untersuchung der Sekundärstruktur von Ara h 8 mittels CD-Spektroskopie. a) kurzwelliges UV-Spektrum von nAra h 8 aus ungerösteten Erdnüssen, rAra h 8.0201 und nBet v 1. b) Untersuchung der Thermostabilität von den drei Proben bei 210 nm (Kurvenminimum von a). Die CD-Spektren wurden bei steigender Temperatur aufgenommen. Alle Untersuchungen wurden in 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,4) und mit 10 µM Proteinkonzentration durchgeführt.

Die CD-Spektren in Abb. 12a zeigen deutlich, dass rAra h 8 und nBet v 1 in ihrer Sekundärstruktur sehr ähnlich sind. Die Auswertung der Spektren ergab für rAra h 8 einen α -Helix Anteil von 44 % und einen β -Faltblatt Anteil von 16 %. Beim Bet v 1 wurden 47 % α -helicale Bereiche und 14 % β -Faltblatt Elemente gemessen. Hingegen wies das Spektrum von natürlichem Ara h 8 klare Abweichungen auf. Natürliches Ara h 8 hatte einen geringeren α -Helix Gehalt von nur 28 % bei nahezu gleichbleibendem β -Faltblatt-Anteil (15 %). Dies könnte auf einen Lipidliganden hindeuten.

Um die Thermostabilität zu untersuchen, wurden CD-Spektren bei steigenden Temperaturen aufgenommen. Hierfür wurden die 3 Allergene in einem Temperaturgradienten von 40 °C auf 95 °C erhitzt und die Strukturänderungen bei 210 nm (Kurvenminimum aus Abb. 12a) dargestellt (Abb. 12b). Das Kurvenmaximum von rAra h 8 liegt bei 64 °C und zeigt dadurch eine deutliche Strukturveränderung an, was auf die Denaturierung des Moleküls hinweist. Bei nBet v 1 liegt das Maximum bereits bei 60 °C. Im Gegensatz dazu wird natürliches Ara h 8 erst bei 78 °C denaturiert.

Demzufolge ist natürliches Ara h 8 hitzebeständiger als das rekombinant hergestellte Allergen. Die Analyse der Sekundärstruktur zeigte zudem Unterschiede im α -Helix-Anteil. Demnach sind die molekularen Eigenschaften von natürlichem Ara h 8 nicht identisch mit dem rekombinanten Ara h 8, das üblicherweise in der kommerziellen Allergiediagnostik verwendet wird. Möglicherweise wurde die Strukturänderung durch einen Lipidliganden verursacht.

3.1.2.4 Proteolytische Stabilität von Ara h 8

Um die Stabilität während des Verdauungsprozesses zu untersuchen, wurde Ara h 8 mit verschiedenen Magenenzymen und Pankreasenzymen unter physiologischen pH- Bedingungen behandelt. Hierzu wurden zwei verschiedene *in-vitro*-Verdausysteme etabliert. Zur Simulation des Magensaftes wurde das Enzym Pepsin verwendet, das im Magensaft hauptsächlich vorhanden ist. Ein zweiter Test sollte nach dem Verdau im Magen auch die anschließende Passage durch den Dünndarm mit den dort wirksamen Proteinasen und Lipasen aus der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) berücksichtigen. Hierfür wurde Ara h 8 mit den aus den entsprechenden Schweineorganen isolierten Enzym-Präparaten Enzynorm f® (Magensaft-Surrogat) und Kreon® (Pankreas-Surrogat) nacheinander behandelt. Diese werden als Enzym-Ersatz bei chronischen Verdauungsbeschwerden (z.B. exokriner Pankreasinsuffizienz) eingesetzt, da die Enzymzusammensetzung weitestgehend mit dem Mensch identisch ist. Neben den wirksamen Enzymen enthalten diese Präparate auch die anderen natürlichen Bestandteile der Magenschleimhaut und der Bauchspeicheldrüse, was eine möglichst naturgetreue Simulation ermöglicht.

Verdau mit Pepsin

Natürliches Ara h 8 wurde mit Pepsin versetzt und nach verschiedenen Inkubationsintervallen im SDS-Gel analysiert. Zum Vergleich wurden rekombinantes Ara h 8 (Ara h 8.0201) und Bet v 1 (Bet v 1.0101) ebenfalls eingesetzt. Um den Einfluss von Lipiden auf die Stabilität zu untersuchen, wurde außerdem rekombinantes Ara h 8 eingesetzt, das vor dem Versuch mit Ölsäure versetzt wurde (rAra h 8 + Ölsäure).

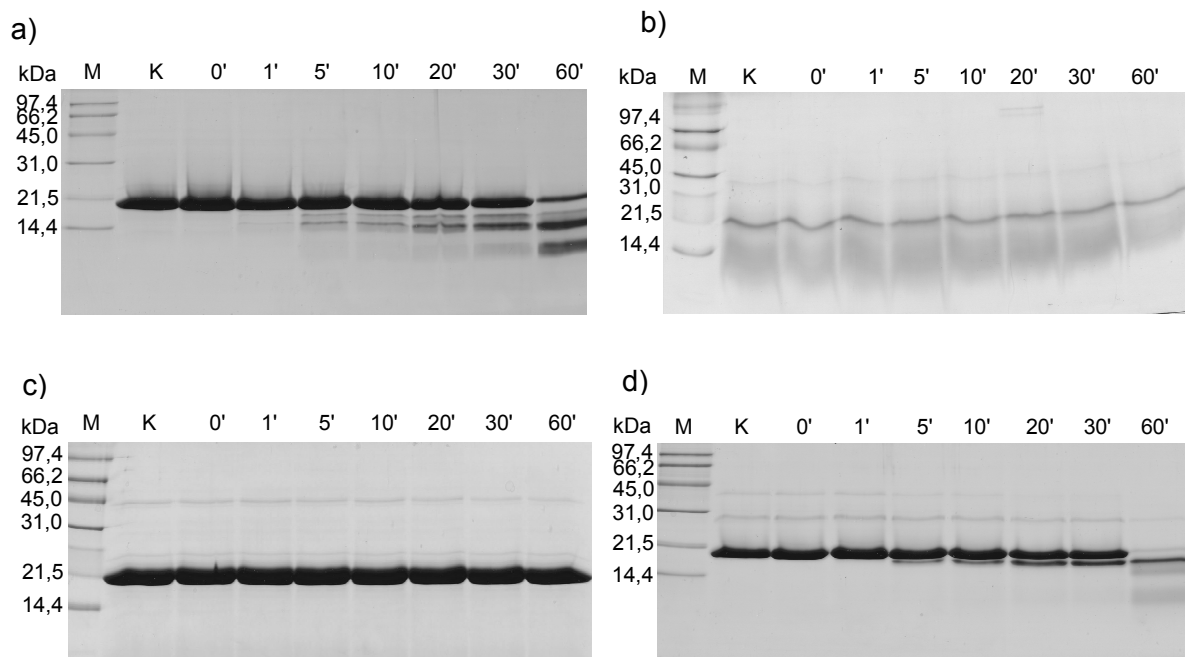


Abbildung 13: In-vitro Verdau mit dem Magenenzym Pepsin zur Überprüfung der proteolytischen Stabilität von Ara h 8. 15 % iges SDS-Gel mit Proben nach 0, 1, 5, 10, 20, 30 und 60 min Verdauzeit. a) rAra h 8 (20 µg/Probe), b) nAra h 8 (10 µg/Probe), c) rAra h 8 + Ölsäure (20 µg/Probe), d) rBet v 1 (20 µg/Probe). (M) Marker, (K) Kontrolle ohne Pepsin.

In Abb. 13a ist der Verdau von rekombinantem Ara h 8 dargestellt. Die Degradation von Ara h 8 setzte schnell ein. Neben unverdautem Ara h 8 sind bereits nach 5 min Inkubationszeit zwei Fragmente von ca. 15 und 16 kDa erkennbar. Mit zunehmender Verdauzeit nimmt der Gehalt dieser Abbau-Produkte zu, sodass nach einer Stunde fast das gesamte Ara h 8 degradiert worden ist. Nach 1 Stunde wurden auch die Abbau-Produkte weiter degradiert, sodass zusätzlich noch eine Bande bei 11 kDa nachweisbar war. Der Verdau von rekombinantem Bet v 1 lieferte ähnliche Ergebnisse (Abb. 13d). Auch hier setzte der Abbau nach 5 min ein, wobei jedoch nur ein Abbauprodukt bei ca. 16 kDa entstanden ist. Wie beim rAra h 8 nimmt der Gehalt des Abbau-Produkts mit zunehmender Verdauzeit zu. Nach einer Stunde ist kaum noch undegradiertes Bet v 1 nachweisbar. Auch die 16 kDa-Bande wurde weiter de-

gradiert, sodass noch zwei weitere Abbau-Produkte bei ca. 11 und 15 kDa auf dem SDS-Gel zu sehen sind.

Im Gegensatz zu rekombinantem Ara h 8 zeigt der Verdau von natürlichem Ara h 8 in Abb. 13b ein völlig anderes Ergebnis. Das natürliche Ara h 8 ist gegenüber dem Magenenzym Pepsin stabil, sodass keinerlei Abbau-Produkte während der gesamten Versuchsdauer erkennbar waren. Die gleiche Stabilität zeigte das rekombinante Ara h 8, das im Vorwege mit Ölsäure versetzt wurde (Abb. 13c). Auch hier ist keine Degradation durch Pepsin im SDS-Gel sichtbar.

Verdau mit Enzynorm f® und Kreon®

Um den Verdau im Magen in Kombination mit der anschließenden Passage durch den Dünndarm zu simulieren, wurde Ara h 8 mit dem Magen-Surrogat Enzynorm f® und anschließend mit dem Pankreas-Surrogat Kreon® behandelt. Zum Vergleich wurden rekombinantes und natürliches Ara h 8, sowie Ara h 8 + Ölsäure und nBet v 1 eingesetzt und nach verschiedenen Inkubationsintervallen auf einem SDS-Gel analysiert.

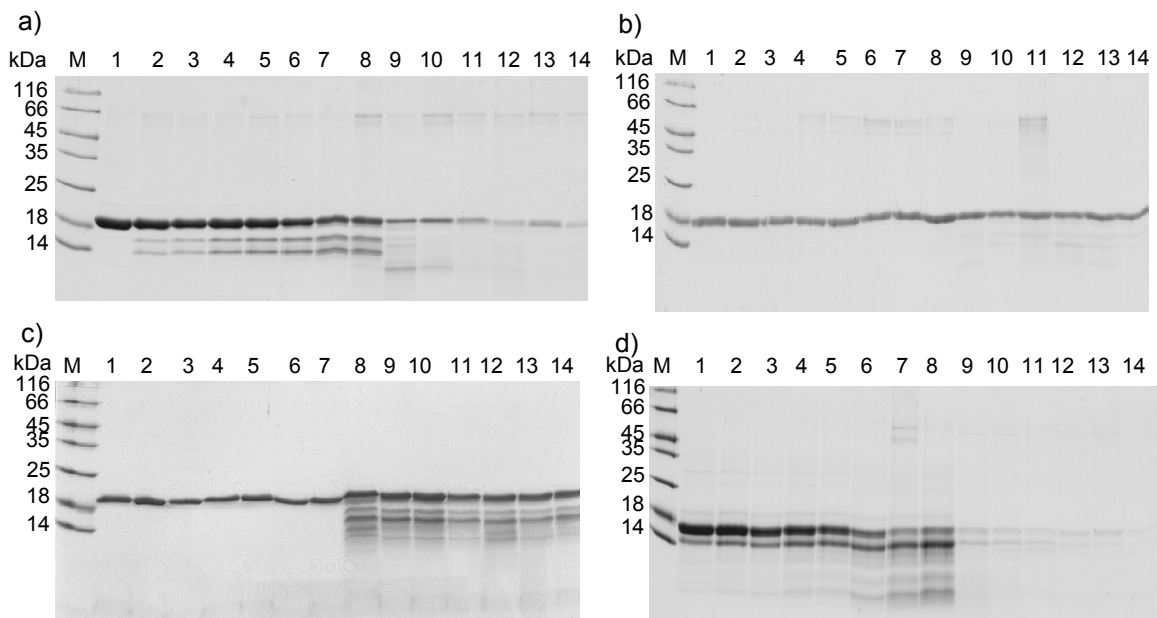


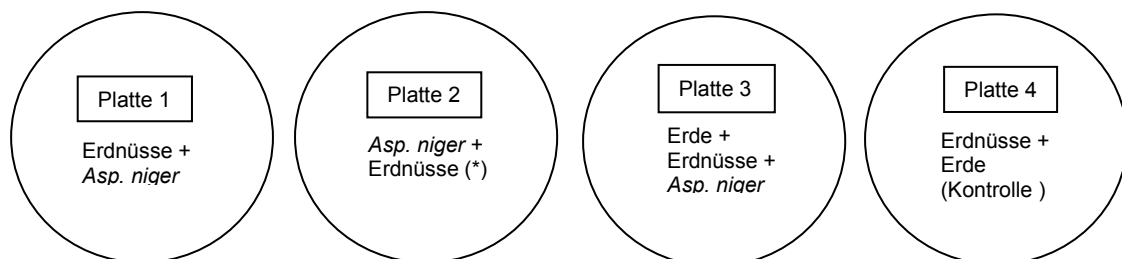
Abbildung 14: Kombiniertes Verdau mit Magensaft- und Pankreassurrogat von a) rAra h 8, b) nAra h 8, c) rAra h 8 + Ölsäure, d) nBet v 1. (M) Marker, (1 – 7) Enzynorm f® nach 0, 5, 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten, (8 – 14), anschließender Kreon®-Verdau nach 0, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten (15 % SDS-Gel, Coomassie-Färbung).

In Abbildung 14a ist der Abbau von rekombinatem Ara h 8 durch das Magen-Surrogat Enzynorm f® deutlich erkennbar. Im Wesentlichen entstehen durch den Magensaft bereits nach 5 Minuten zwei Abbauprodukte, die zusätzlich zum unverdauten Protein von 17 kDa drei kleinere Banden bei ca. 14 und 16 kDa im SDS-Gel aufweisen und auch nach zwei Stunden noch vorhanden sind (Nr. 2-7). Diese wurden durch die anschließende Behandlung mit dem Pankreas-Surrogat Kreon® weiter degradiert und waren nach weiteren 20 Minuten nahezu vollständig abgebaut (Nr. 13). Ein geringer Teil des Ara h 8 blieb über die gesamte Versuchsdauer unverdaut (Nr.14). Im Gegensatz dazu wurde natürliches Ara h 8 nicht durch die zwei Surrogate abgebaut und blieb über den gesamten Versuch in gleicher Konzentration nachweisbar (Abb. 14b). Mit Ölsäure versetztes rekombinantes Ara h 8 zeigte beim Enzynorm®-Verdau keine Abbauprodukte (Abb. 14c, Nr. 1-7), wurde jedoch durch die Pankreasenzyme von Kreon® sofort in vier kleinere Proteine von ca. 13-16 kDa degradiert, die über die Versuchsdauer weitestgehend erhalten blieben (Nr. 8-14). Zum Vergleich wurde der Versuch mit natürlichem Bet v 1 durchgeführt, das sofort nach Zugabe des gastrischen Surrogats degradierte (Abb. 14d, Nr. 1) und 20 Minuten nach Zugabe des Pankreassurrogats komplett abgebaut wurde (Nr. 10).

Somit konnte gezeigt werden, dass natürliches Ara h 8 gegenüber den Verdauenzymen aus Magensaft und Bauchspeicheldrüse stabil ist, während rAra h 8 abgebaut wurde. Folglich unterscheiden sich das rekombinant hergestellte und das natürliche Allergen in ihrer Stabilität voneinander. Im Vergleich konnte rekombinantes Ara h 8, das unter normalen Bedingungen schnell abgebaut wurde, in Kombination mit Ölsäure durch die Magenenzyme nicht zersetzt werden. Dies deutet darauf hin, dass der schützende Effekt auf Lipide zurückgeführt werden könnte. Die Stabilität von natürlichem Ara h 8 im Verdauungstrakt ist untypisch für Bet v 1-homologe Allergene, die normalerweise leicht abgebaut werden.

3.1.3 Expressionsregulation durch Pflanzenpathogene

Ara h 8 gehört zur Gruppe der PR-Proteine (Pathogenesis-related proteins), einer Gruppe von pflanzlichen Abwehrproteinen, die bei Schädlingsbefall vermehrt von der Pflanze gebildet werden können. Um den Einfluss des Erdnuss-pathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus niger* auf die Ara h 8 Expression zu untersuchen, wurden keimfähige Erdnüsse zusammen mit Pilzkulturen 10 Tage kultiviert und anschließend geerntet. Da Blumenerde häufig Verunreinigungen mit Schimmelpilzen aufweist, wurde der Versuch zum Vergleich parallel mit und ohne Blumenerde durchgeführt. Als Kontrolle wurden Erdnüsse ohne Pilzinfektion mit kultiviert. Zur Überprüfung der Keime in der verwendeten Erde wurde Blumenerde allein kultiviert und die gewachsenen Pilze und Bakterien analysiert. Zur Überprüfung des Mediums auf Verunreinigungen wurde außerdem eine Kulturplatte als Sterilkontrolle mitgeführt. Diese wies keine Pilz- und Bakterienkulturen nach 10 Tagen auf.



(*): *Aspergillus niger* wurde 3 Tage vorkultiviert, bevor die Erdnüsse hinzukamen (Platte 2).



Abbildung 15: Versuchsaufbau zur Kultivierung von keimfähigen Erdnüssen zusammen mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*. Jeweils 5 g keimfähige Erdnüsse wurden auf Sabouraud-Agar-Kulturplatten 10 Tage lang kultiviert. (1,2,3): mit *Aspergillus niger* Kulturen, (4): Kontrollplatte ohne *Asp. niger*, (B) Blumenerde ohne Erdnüsse, (S) Kulturplatte als Sterilkontrolle.

Nach 10 Tagen waren in allen Proben mit Erdnüssen Keimlinge gewachsen. Außerdem waren die infizierten Erdnüsse (1, 2, 3) mit einem schwarzen *Aspergillus*-Pilzrasen überzogen. Demzufolge waren die Kulturbedingungen sowohl für die Entwicklung der Erdnüsse als auch für das Wachstum der Pilzkulturen ideal gewählt worden. Die Vorkultivierung der Pilzkulturen (2) hatte keinen Einfluss auf das Pilzwachstum, da der Pilzrasen auch ohne Vorkultivierung (1) gleich stark ausgeprägt war. In der Platte mit nicht infizierten Erdnüssen (4) waren jedoch auch vereinzelte Pilzkulturen gewachsen, obwohl die Anzahl der Erreger ver-

glichen mit den infizierten Proben verschwindend gering war. Die mikrobielle Untersuchung der verwendeten Erde zeigte, dass das schwache Pilzwachstum (Platte 4) auf die in der Erde typischerweise vorhandenen Erreger (auch *Asp. niger*) zurückzuführen war.

Um den Ara h 8-Gehalt in den Erdnüssen zu untersuchen, wurden die Samen aus den Platten nach 10 Tagen geerntet, gereinigt und anschließend die lipophilen Erdnussproteine mittels Methanol/Chloroform-Methode extrahiert. Zur Analyse des Ara h 8-Gehaltes wurden die Extrakte auf einem SDS-Gel analysiert und ein Immunoblot mit dem kreuzreagierenden anti-Gly m 4 Kaninchenserum durchgeführt.

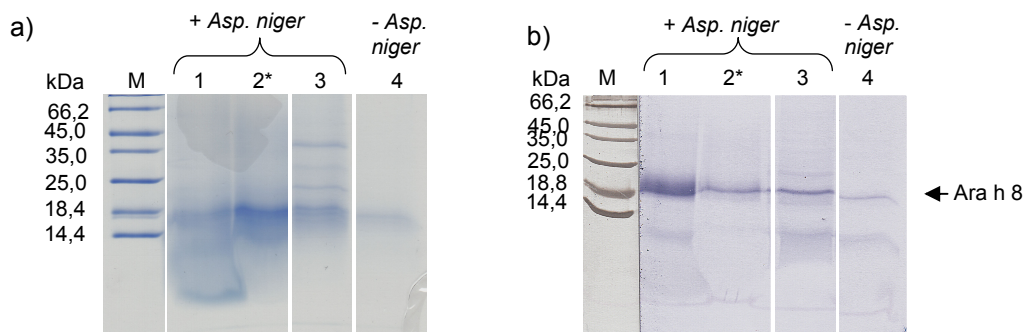


Abbildung 16: Ara h 8-Gehalt in mit *Aspergillus niger* kokultivierten Erdnüssen. Chloroform/Methanol-Extraktion von Erdnüssen nach 10-tägiger Kultivierung auf Sabouraud-Agar-Platten. 15 % SDS-Gel, 10 µg Extrakt pro Spur. a) Coomassie-Färbung, b) Immunoblot, detektiert mit α -Gly m 4 Kaninchenserum. (1,2) Erdnüsse mit *Asp. niger* infiziert; (3) Erdnüsse mit *Asp. niger* infiziert + Erde, (4) Erdnüsse ohne Infektion + Erde. (*) Der Schimmelpilz *Aspergillus niger* wurde auf der Sabouraud-Agar-Platte 3 Tage lang vorkultiviert, bevor die Erdnüsse hinzugegeben wurden.

Das SDS-Gel aus Abb. 16 a zeigt eine deutliche Bande bei 18 kDa in allen 4 Proben, die im Immunoblot (Abb. 16 b) als Ara h 8 identifiziert wurde. In den Extrakten mit *Aspergillus niger*-infizierten Erdnüssen (1, 2, 3) sind stärkere Ara h 8-Banden als auf der Kulturplatte ohne Pilzinfektion (4) erkennbar. Die Intensivität der Ara h 8-Bande ist bei den infizierten Proben ungefähr doppelt so stark ausgeprägt gewesen.

Somit konnte mit einem einfachen Versuchsaufbau gezeigt werden, dass die Ara h 8-Konzentration unter Einfluss von Pflanzenpathogenen wie dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* im Extrakt erhöht war. Allerdings wurden auch auf der Kontrollplatte und in der Blumen-erde *Aspergillus niger* Kulturen nachgewiesen. Demzufolge sind geringe Mengen des Pilzes auch unter Normalbedingungen in der Erde und auf Erdnüssen zu finden.

3.1.4 Ribonukleasefunktion

Bet v 1 und einige andere PR-10 Proteine verfügen über eine Ribonukleasefunktion, die wahrscheinlich mit der Abwehrfunktion zusammenhängt, was jedoch bisher nicht bestätigt werden konnte. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu Bet v 1 wurde untersucht, ob Ara h 8 eine ähnliche biologische Funktion aufweist.

Dazu wurde die Aminosäuresequenz von Ara h 8 auf konservierte Sequenzmuster hin überprüft, die auch bei anderen PR-10 Proteinen mit bekannter Ribonukleasefunktion vorhanden sind und mit der Funktion im Zusammenhang stehen. In Abbildung 16 ist das Proteinalignment von Bet v 1 mit Ara h 8 und den PR-10 Proteinen SPE-16 und LaPR10 dargestellt. Die Proteine SPE-16 und LaPR10 stammen aus der Yambohne (*Pachyrhizus erosus*) und aus der Lupine (*Lupinus albus*). Beide Proteine weisen, ebenso wie Bet v 1, Ribonukleaseaktivität auf. Ebenso wie die Erdnuss sind Yambohne und Lupine Hülsenfrüchtler und deshalb miteinander artverwandt.

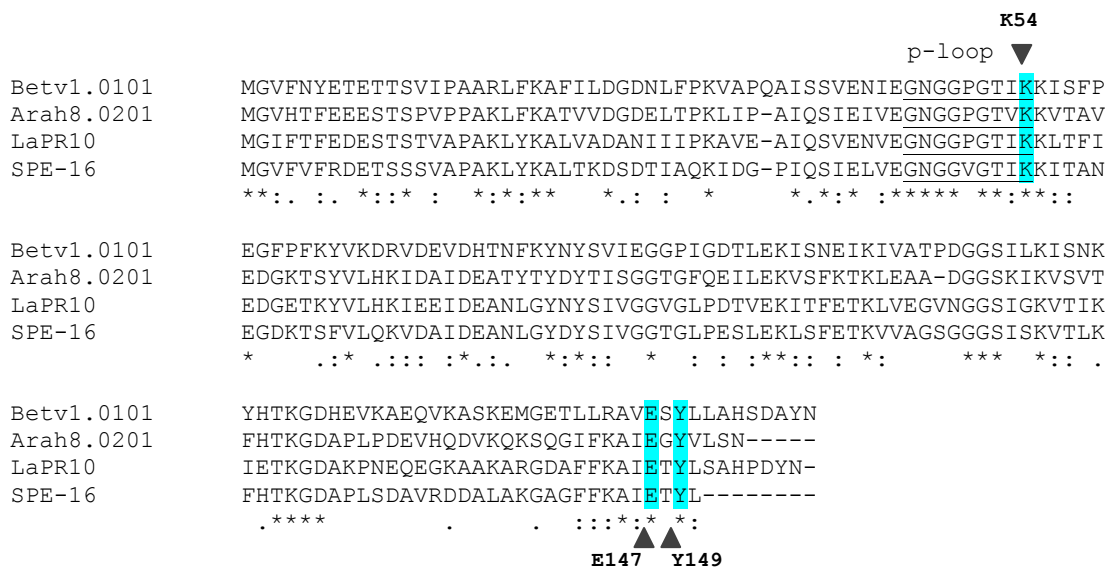


Abbildung 17: Vergleich der Ara h 8-Aminosäuresequenz (Ara h 8.0201) (BOYIU5) mit Bet v 1.0101 (P15494) und PR-10 Proteinen mit Ribonukleasefunktion: LaPR10 (CAA03926.1) (*Lupinus albus*), SPE-16 (AAR11455.1) (*Pachyrhizus erosus*). Konservierte Sequenzbereiche mit Hinweisen auf die Funktion sind türkis hervorgehoben. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren mit Punkten. Das Proteinalignment wurde mit Clustalomega (1.2.1) erstellt.

Obwohl Ara h 8 mit Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern kreuzreagiert, weist die Aminosäuresequenz nur eine Übereinstimmung von 41 % auf. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Kreuzreaktionen bei Bet v 1-homologen Allergenen vor allem auf Strukturhomologien zurückzuführen sind (Neudecker et al. 2003). In den identischen Sequenzabschnitten sind jedoch konservierte Muster erkennbar, die auch in der Lupine und der Yambohne zu finden sind. In erster Linie ist das die p-loop Region, ein Glycin-reiches Motiv, das für die Phosphat-Bindung von RNA bei Ribonukleasen verantwortlich ist. Diese p-loop-Region ist in der Aminosäuresequenz der vier PR-10 Proteine identisch (mit Ausnahme von einem Aminosäureaustausch bei SPE-16). Neben der p-loop Region sind außerdem bei allen vier PR-10

Proteinen die C-terminalen Aminosäuren E147 und Y149 identisch. Diese Aminosäuren liegen auch bei anderen Mitgliedern der PR-10 Proteinfamilie mit Ribonukleasefunktion streng konserviert vor, die hier nicht dargestellt sind (z.B. CaPR10 (*Capsicum annuum*), GaPR10 (*Gossypium arboreum*), LI PR10.1B (*Lupinus luteus*) u.a.). Demnach gibt es in der Aminosäuresequenz von Ara h 8 starke Hinweise auf eine Ribonukleasefunktion, die anhand von RNase-Aktivitätstests überprüft werden soll.

Da Ribonukleasen ubiquitär sind und unter anderem auch auf der menschlichen Haut vorkommen, sind Kontrollexperimente sehr wichtig, um eine unbeabsichtigte Verunreinigung mit RNasen auszuschließen. Deshalb wurden für die RNase-Aktivitätstests zwei gentechnisch veränderte Ara h 8-Proteine hergestellt, die als Kontrollproteine dienen sollten. Bei diesen Ara h 8-Mutanten wurden die für die Funktion wichtigen Bereiche durch Einzelaminosäure-Austausch verändert, um dadurch ein Herabsenken der RNase-Aktivität zu erreichen. Gleichzeitig wurde dadurch überprüft, welche Bereiche für die Funktion am wichtigsten waren. Dafür wurde bei einem Ara h 8-Protein die p-loop Region verändert, während bei der zweiten Ara h 8-Mutante die C-terminalen Aminosäuren E147 und Y149 ausgetauscht wurden.

3.1.4.1 Klonierung der Ara h 8-Mutante Ara h 8 K54N

Die Aminosäure K54 in der p-loop Region scheint besonders wichtig für die Ribonukleasefunktion zu sein. Dies wurde anhand der PR-10 Proteine GaPR10 aus Baumwolle (*Gossypium arboreum*), SPE-16 aus der Yambohne (*Pachyrhizus erosus*) und AhPR10 aus Erdnüssen (*Arachis hypogaea*) untersucht (Wu et al. 2003, Zhou et al. 2002, Chadha et al.

2006). Deshalb wurde in der Aminosäuresequenz von Ara h 8.0201 die Aminosäure K54 ausgetauscht und durch Asparagin ersetzt (Ara h 8 K54N). Hierzu wurden spezifische Oligonukleotide entworfen, um die Ara h 8-Gensequenz (EF 436550) mittels PCR-Mutagenese zu verändern und zu vervielfältigen. In Abbildung 18 ist die Klonierungsstrategie für die Ara h 8-Mutante Ara h 8 K54N systematisch dargestellt.

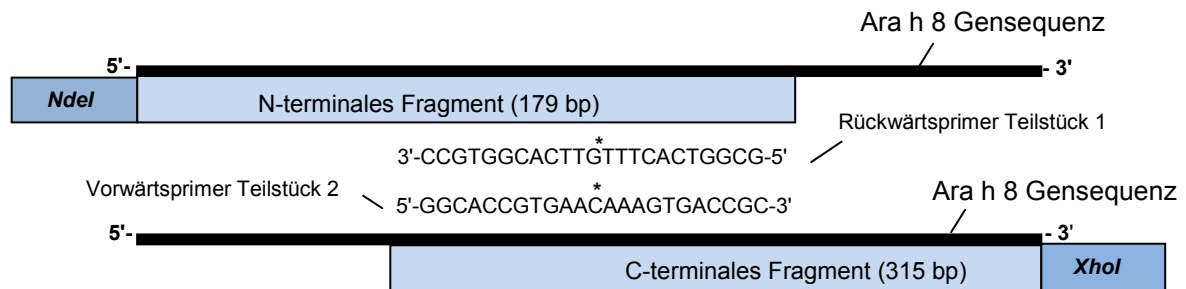


Abbildung 18: Übersicht der Klonierungsstrategie für die Ara h 8-Mutante Ara h 8 K54N, die eine Mutation in der p-loop Region beinhaltet. Es wurden zwei überlappende Ara h 8-Teilstücke der Ara h 8.0201-Gensequenz amplifiziert. Das mit * gekennzeichnete Basenpaar kodiert die Mutation.

Damit die Mutation in die Gensequenz eingefügt werden kann, wurden zunächst ein vorderes und ein hinteres Ara h 8-Teilstück hergestellt (Abb. 18). Hierfür wurde Vektor-DNA mit der Gensequenz der Ara h 8-Isoform Ara h 8.0201 aus einem Bakterienklon isoliert und mit speziell entworfenen Oligonukleotidprimern amplifiziert. Für die Synthese des N-terminalen Teilstücks wurde ein Vorwärtsprimer entworfen, der am 5'-Ende eine NdeI-Schnittstelle beinhaltet, der die Klonierung des Gesamtkonstrukts in die Leserahmen der Vektoren pCR[®]2.1-TOPO[®] und pET23b ermöglichte. Der passende Rückwärtsprimer für das Fragment wurde so gewählt, dass das Lysin kodierende Triplet AAA in der Ara h 8-Gensequenz durch AAC (Asparagin) ersetzt wurde. Deshalb trägt der Primer an der entsprechenden Stelle die zu Desoxycytidin komplementäre DNA-Base Desoxyguanin (mit * gekennzeichnet). Der Vorwärtsprimer des C-terminalen Ara h 8-Fragments enthielt ebenfalls die Mutation und ist vollständig komplementär zum Rückwärtsprimer des N-terminalen Fragments entworfen worden, damit die beiden Teilstücke anschließend miteinander fusioniert werden können. Am C-terminalen Ende sollte eine XhoI-Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in die Vektoren pCR[®]2.1-TOPO[®] und pET23b angehängt werden. Deshalb wurde der Rückwärtsprimer für das C-terminale Fragment mit einer XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende aufgebaut.

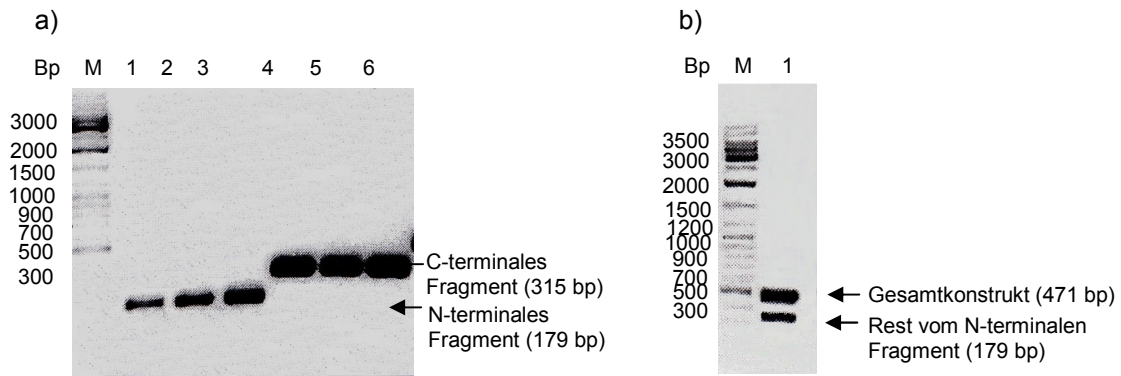


Abbildung 19: Überprüfung der Größe der synthetisierten Ara h 8-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese (1,5 % Agarose, Färbung mit Ethidiumbromid). a) Synthese der Teilfragmente mittels PCR-Mutagenese: (M) Marker, (1-3) N-terminales Fragment mit 25, 50 bzw. 100 mM MgSO₄; (4-6) C-terminales Fragment mit 25, 50 bzw. 100 mM MgSO₄. b) fusioniertes Gesamtfragment (M) Marker, (1) Fusionsprodukt.

Das N-terminale und das C-terminale Ara h 8-Fragment konnten mit den erwarteten Größen von 179 bp und 315 bp mittels Mutagenese-PCR amplifiziert werden (Abb. 19 a). Der Zusatz von höheren MgSO₄-Konzentrationen führte beim N-terminalen Fragment zu einer besseren Ausbeute des Amplifikationsproduktes, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis beim C-terminalen Fragment. Deshalb wurde für die Fusionierung der beiden Teilstücke das PCR-Produkt mit 25 mM MgSO₄ (Nr. 1 und 4) verwendet, da hohe MgSO₄-Konzentrationen bei der Klonierung stören können. In Abbildung 19 b ist das Ergebnis der Fusions-PCR der beiden Ara h 8-Fragmente dargestellt. Deutlich erkennbar konnte das Gesamtkonstrukt Ara h 8 K54N mit der erwarteten Größe von 471 bp synthetisiert werden. Neben dem Fusionsprodukt war noch eine weitere Bande im Gel erkennbar. Dabei handelte es sich um den nicht fusionierten Rest vom N-terminalen Fragment (179 bp). Das Genkonstrukt wurde in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ligiert und anschließend in *E.coli* Top 10 Zellen transformiert. Die Identifikation positiver Klone erfolgte durch PCR. Anschließend wurde ein positiver Klon in den Expressionsvektor pET23b umkloniert, in *E.coli* DH5- α -Zellen transformiert und die DNA einzelner Kolonien mittels Restriktionsverdau analysiert.

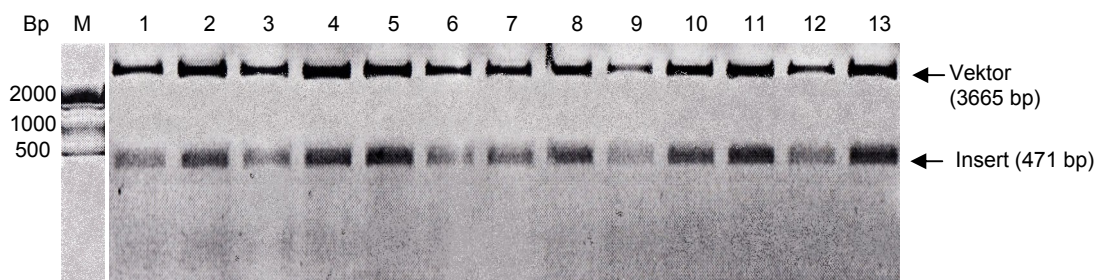


Abbildung 20: Überprüfung der pET23b-Ara h 8 K54N Konstrukte durch Minipräparation und DNA-Restriktion mit den Enzymen *Nde*I und *Xho*I. (M) Marker, (1-13) restringierte DNA einzelner Klone. DNA-Gelelektrophorese mit einem 1,5 %-igen Agarosegel, Färbung: Ethidiumbromid.

Durch die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* wurde bei allen Klonen das Genkonstrukt mit der Größe von 471 bp herausgeschnitten, wie das Agarosegel in Abb. 20 zeigt. Die DNA der Klone Nr. 4, 5 und 13 wurde sequenziert. Die drei überprüften Klone enthielten die korrekte Sequenz mit dem Aminosäureaustausch K54N in der p-loop Region. Für die Proteinexpression von Ara h 8 K54N wurde die DNA aus Klon Nr. 13 in den *E.coli* Stamm BL 21 (DE3) transformiert und auf Selektivmedium inkubiert. Aus einer Bakterienkolonie wurde eine Übernachtskultur angesetzt und die Expression über drei Stunden durchgeführt. Die Proteinaufreinigung erfolgte mittels Immobilisierter Adhäsionschromatographie (IMAC) über den C-terminalen Histidin-Tag, der durch die Klonierung in den Vektor pET23b angefügt wurde.

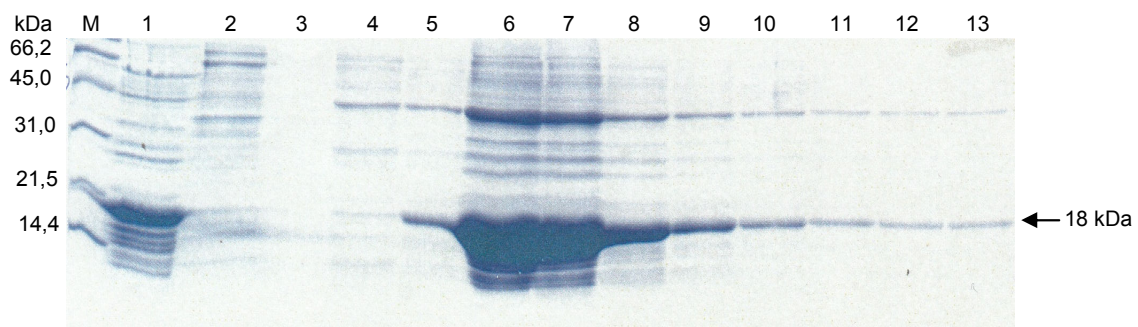


Abbildung 21: Expression und Reinigung von Ara h 8 K54N mittels Ni^{2+} -Chelat Affinitätschromatographie. 15 % SDS-Gel, reduzierende Bedingungen, Coomassie-Färbung. (M) Marker, (1) Zellpellet, (2) Durchfluss, (3) Äquilibrierungspuffer, (4) Waschpuffer, (5-13) Eluatfraktionen.

Auf dem SDS-Gel ist die Expression des mutierten Ara h 8 K54N Proteins mit einer Größe von 18 kDa erkennbar, das in den Eluatfraktionen nach der Proteinaufreinigung (Spur 11-13) sauber isoliert werden konnte.

3.1.4.2 Klonierung der Ara h 8 E147A/Y149A-Mutante

Für die Herstellung der Ara h 8-Mutante mit verändertem C-Terminus sollten in der Proteinsequenz die Aminosäuren E147 und Y149 ausgetauscht und durch Alanin ersetzt werden. Hierfür wurden in der Gensequenz von Ara h 8.0201 (EF436550) die entsprechenden Basentriplets GAA (E) für Glutaminsäure und TAT (Y) für Tyrosin durch GCC (A) für Alanin ersetzt. Um eine Klonierung in den Vektor pET23b zu ermöglichen, wurde am 5'-Ende eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt. Das Gen-

konstrukt wurde von der Firma GeneArt hergestellt und im Vektor pMA kloniert geliefert. Nach der Umklonierung in den Vektor pET23b wurde die DNA in *E.coli* BL 21 (DE3)-Zellen transformiert und die Sequenz einzelner Klone überprüft. Aus einer Kolonie mit korrekter DNA-Sequenz wurde eine Übernachtskultur angesetzt und das Protein anschließend über eine Expressionsdauer von drei Stunden exprimiert.

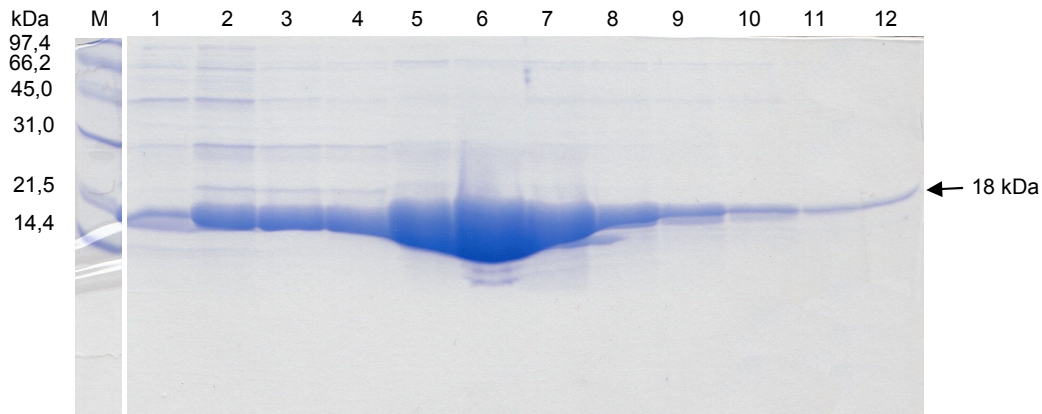


Abbildung 22: Reinigung des exprimierten Proteins Ara h 8 E147A/Y149A über den C-terminalen His-Tag. Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie, 15 % SDS Gel, Coomassie-Färbung. (M) Marker, (1) Waschpuffer, (2-12) Eluatfraktionen.

Das Protein Ara h 8 E147A/Y149A konnte durch Metallchelate-Affinitätschromatographie mit zweiwertigen Nickelionen über den C-terminalen Histidin-Tag aufgereinigt werden. Das veränderte Allergen ist mit einer Größe von 18 kDa exprimiert worden und konnte in den Fraktionen 11 und 12 sauber eluiert werden (Abb. 22). Das aufgereinigte Protein wurde für die Ribonuklease-Aktivitätstests verwendet.

3.1.4.3 RNase-Aktivitätstests der Ara h 8-Mutanten

Um Ara h 8 auf eine mögliche Ribonukleasefunktion hin zu untersuchen, wurden zwei verschiedene RNase-Aktivitätstests mit rekombinantem Ara h 8 durchgeführt. Als Kontrolle wurden die beiden gentechnisch veränderten Ara h 8-Proteine eingesetzt. Hierdurch sollte gleichzeitig überprüft werden, ob die p-loop Region oder der C-Terminus einen Einfluss auf die Funktion haben.

RNase-Nachweis im Agarosegel

Für den RNase-Aktivitätstest wurden 2 µg RNA mit verschiedenen Ara h 8-Konzentrationen versetzt und 60 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde RNase A verwendet. Da Ribonukleasen ubiquitär vorkommen und sehr reaktiv sind, musste sorgfältig auf Verunreinigungen durch RNasen geachtet werden, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Neben den beiden gentechnisch veränderten Ara h 8-Mutanten wurden zusätzlich das verwendete RNase-freie Wasser und rekombinantes Erdnuss-Oleosin (Ara h 14 ohne hydrophoben Mittelteil. Das Plasmid zur rekombinanten Herstellung wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Krause zur Verfügung gestellt.) als Negativkontrollen mitgeführt. Rekombinantes Erdnussoleosin und Ara h 8 wurden unter den gleichen Bedingungen aufgereinigt. Dadurch sollten eventuelle Verunreinigungen ausgeschlossen werden, die bei der Proteinaufreinigung entstanden sein könnten.

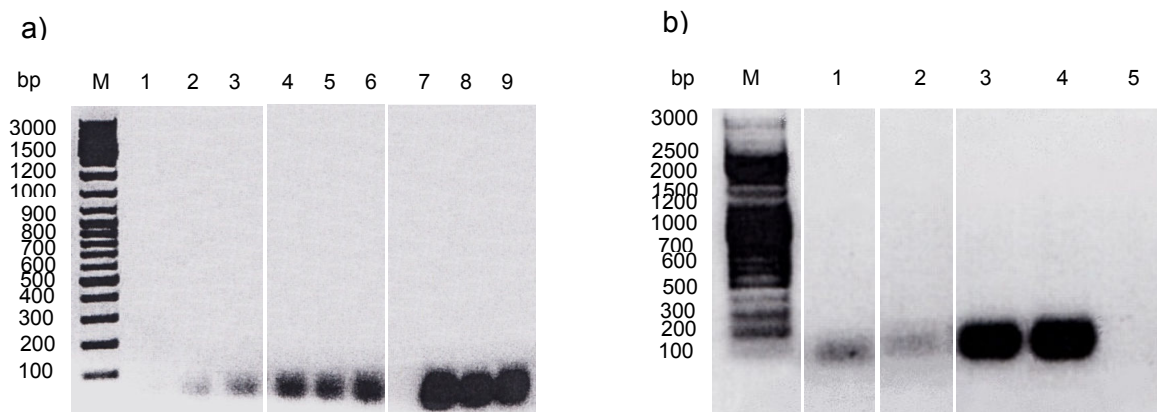


Abbildung 23: Vergleich der Ribonukleaseaktivität von rAra h 8 mit den Ara h 8-Mutanten. RNase-Aktivitätsnachweis durch Abbau von Hefe-RNA im Agarosegel. a) rAra h 8 und Ara h 8 K54N: (M) Marker, (1-): rAra h 8 (1) 2 µg, (2) 0,5 µg, (3) 0,2 µg; (4-6): Ara h 8 K54N (4) 2 µg, (5) 0,5 µg, (6) 0,2 µg; (7) 0,5 µg RNase A; (8) RNase-freies Wasser; (9) 2 µg Oleosin. b) rAra h 8 und Ara h 8 E147A/Y149A: (M) Marker; (1) 1 µg Ara h 8 E147A/Y149A, (2) 1 µg rAra h 8, (3) 2 µg Oleosin, (4) RNase-freies Wasser, (5) 2 µg RNase A.

In Abbildung 23 a ist der RNase-Aktivitätstest mit rekombinantem Ara h 8 und Ara h 8 K54N abgebildet. Die Negativkontrollen mit RNase-freiem Wasser und rekombinantem Erdnuss-Oleosin (8 und 9) zeigen eine RNA-Bande mit einer Größe von ca. 100 Basenpaaren. Diese Bande wurde durch die Inkubation mit 2 µg Ara h 8 vollständig abgebaut (1). Geringere Ara h 8-Konzentrationen konnten die eingesetzte RNA nur teilweise zersetzen (2-3). Hingegen konnte bereits durch 0,5 µg der Ribonuklease RNase A (Positivkontrolle) die gesamte RNA abgebaut werden (7). Demnach war die Ribonuklease-Aktivität von Ara h 8 wesentlich schwächer als die Aktivität von RNase A. Die Ara h 8-Mutante mit der veränderten p-loop Region Ara h 8 K54N zeigte hingegen im Agarosegel keine Aktivität (4-6). Demnach ist die

im Test dargestellte Aktivität von Ara h 8 nicht auf Verunreinigungen zurückzuführen. Mit der C-terminal veränderten Ara h 8-Mutante konnte noch eine geringe Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 23b, 1). Demzufolge hatte der Aminosäureaustausch in der p-loop Region eine stärkere Einschränkung der Ribonuklease-Funktion zur Folge als die Mutationen am C-Terminus.

Photometrischer Nachweis der Ribonukleaseaktivität

Um die RNase-Aktivität quantitativ zu bestimmen, wurde ein Aktivitätstest durchgeführt, bei dem die abgebauten RNA-Fragmente photometrisch gemessen wurden. Hierzu wurde 20 µg Hefe t-RNA eingesetzt und mit verschiedenen Ara h 8-Konzentrationen zwischen 0 und 2 µg für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die hydrolysierte RNA im Photometer bei 260 nm bestimmt. Als Positivkontrolle wurde RNase A eingesetzt und im Vergleich mit Ara h 8 und den gentechnisch veränderten Ara h 8-Mutanten gemessen. Wie in der Bestimmung im Agarosegel dienten rekombinantes Erdnusssoleosin und RNases-freies Wasser als Negativkontrollen.

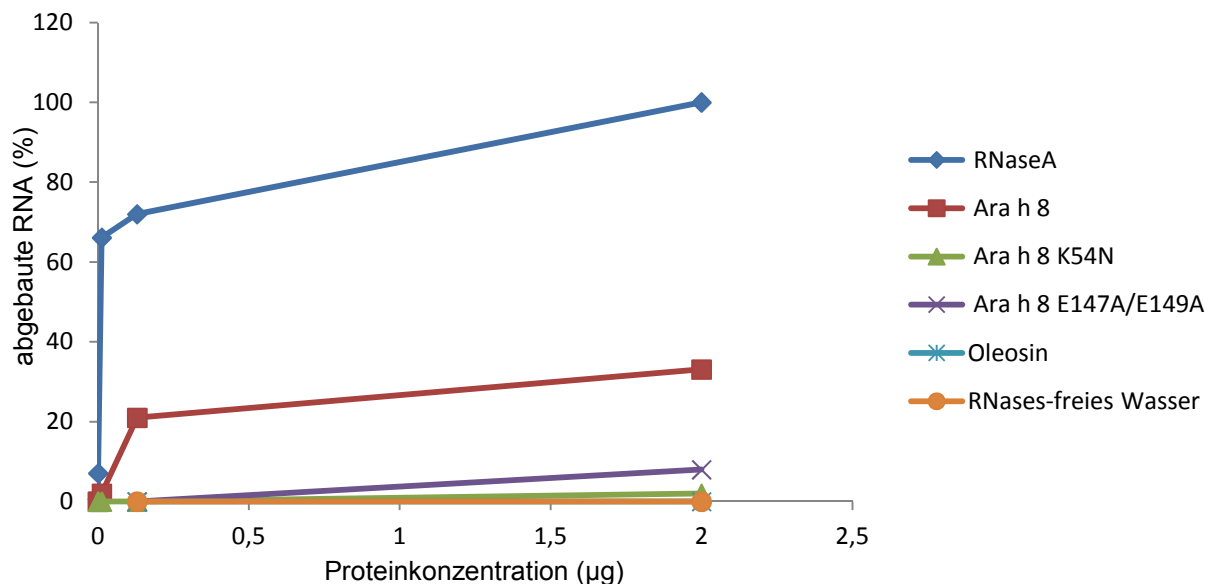


Abbildung 24: Ribonukleaseaktivität von Ara h 8 im Vergleich mit RNase A. Photometrische Bestimmung der abgebauten RNA-Fragmente bei 260 nm nach Zugabe von 0 – 2 µg Ara h 8, Ara h 8 K54N, Ara h 8 E147A/Y149A, RNase A, Erdnusssoleosin und RNase freiem Wasser.

Der photometrische Ribonukleaseaktivitäts-Test zeigt in der Tendenz die gleichen Ergebnisse wie im Agarosegel. Durch die Zugabe von 2 µg RNase A wurden bereits 98 % der

eingesetzten RNA abgebaut, während 2 µg Ara h 8 nur 28 % der RNA zersetzen konnte. Demnach ist die Ribonukleasefunktion von Ara h 8 wesentlich geringer als bei RNase A und weist nur ca. ein Viertel der Aktivität verglichen mit RNase A auf. Die Mutante mit veränderter p-loop Region (Ara h 8 K54N) wies eine kaum messbare Aktivität auf. Mit 2 µg wurden lediglich 1 % der RNA fragmentiert. Die C-terminale Mutante (Ara h 8 E147A/Y149A) war nur unwesentlich reaktiver. Durch 2 µg Ara h 8 E147/Y149 wurden 9 % der RNA abgebaut.

Demnach verfügt Ara h 8 über eine Ribonuklease-Funktion, die ungefähr 1/4 der Reaktivität von RNase A aufweist. Durch die Mutationen in der p-loop Region und am C-Terminus wurde die Funktion stark eingeschränkt. Demzufolge kommt die RNase-Aktivität tatsächlich durch das Ara h 8 zustande und kann nicht auf eine Verunreinigung zurückgeführt werden. Die Veränderung der p-loop Region hatte einen stärkeren Einfluss auf die Funktion als der C-Terminus, deshalb ist in erster Linie die p-loop Region für die Aktivität wichtig.

3.1.5 Ara h 8 als Lipid-bindendes Protein

Neben der Ribonukleaseaktivität verfügt Bet v 1 über die Fähigkeit, Lipide, Flavonoide (sekundäre Pflanzenstoffe) und Cytokinine (Wachstumshormone) zu binden (Mogensen et al. 2002). Erst kürzlich wurde das Flavonoid Quercetin-3-O-Sophorosid als natürlicher Bet v 1-Ligand identifiziert (Seutter von Loetzen et al. 2014). Aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Bet v 1 sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Ara h 8 ebenfalls Lipide binden kann und damit eine Funktion beim Lipidtransport haben könnte.

Die Bindung findet beim Bet v 1 über eine hydrophobe, taschenförmige Einstülpung statt, die in die dreidimensionale Struktur hineinragt und drei verschiedene Eingänge ($\epsilon 1$ - $\epsilon 3$) besitzt (Kofler et al. 2012). Die dritte Öffnung ($\epsilon 3$) wird teilweise von der p-loop Region flankiert, unter anderem ist auch der Lysinrest K54 an der Bildung des Tunnels beteiligt. Deshalb sollte auch das gentechnisch veränderte Protein Ara h 8 K54N mit untersucht werden, bei dem der Lysinrest durch Asparagin ersetzt wurde.

3.1.5.1 Identifizierung von hydrophoben Proteinbereichen

Zur Analyse der hydrophoben Bindungsregion wurde der Fluoreszenzfarbstoff ANS (8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure) verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert nach Bindung an unpolare Regionen, die sich im Innern der Proteinstruktur befinden und für den Farbstoff zugänglich sind. Wie Untersuchungen beim Bet v 1 zeigten, bindet ANS spezifisch und reversibel in der hydrophoben Proteintasche, wodurch eine Fluoreszenz bei 474 nm (Emissionsmaximum) emittiert wurde. Die Bindung wurde durch NMR-Experimente bestätigt (Mogensen et al. 2002). Um die Ara h 8-Struktur auf die Existenz einer solchen hydrophoben Proteintasche hin zu untersuchen, wurde ANS mit steigenden Ara h 8-Konzentrationen versetzt und die Fluoreszenz im Vergleich mit Bet v 1 gemessen. Die Fluoreszenz des rekombinant hergestellten Allergens wurde mit der des natürlichen Proteins und der Ara h 8-Mutante Ara h 8 K54N verglichen. Lysozym und das Lieschgraspollenallergen nPhl p 6 dienten als Negativkontrollen.

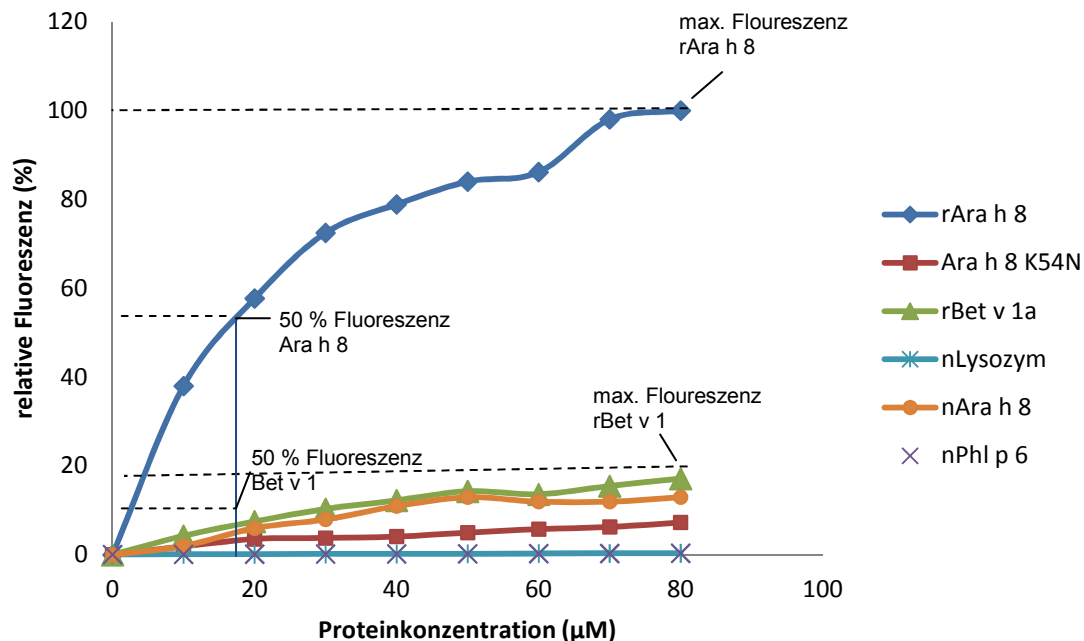


Abbildung 25: Analyse der hydrophoben Proteintasche des Ara h 8 mittels ANS-Bindungsassay. Im Vergleich wurden in einer Verdünnungsreihe rAra h 8.0201, rBet v 1.0101, rAra h 8 K54N und nAra h 8 mit jeweils 10 µM ANS eingesetzt. Lysozym und nPhl p 6 dienten als Negativkontrollen.

In dem Diagramm aus Abb. 25 sind die Bindungskurven dargestellt, die durch die Titration von ANS mit Ara h 8 und Bet v 1 bestimmt wurden. Die Bindung von ANS an die Proteine führte zu einem Fluoreszenzanstieg bei steigenden Proteinkonzentrationen in einer Sättigungskurve. Mit Ausnahme der beiden eingesetzten Kontrollproteine Lysozym und nPhl p 6 konnte für jedes Protein eine charakteristische Bindungskurve detektiert werden. Die stärksten Signale wurden mit rekombinantem Ara h 8 gemessen. Verglichen mit rekombinant hergestelltem Bet v 1 war die Signalintensität ca. 5 mal stärker. Obwohl die Fluoreszenz wesentlich höher war, verliefen die beiden Kurven jedoch parallel zueinander. Interessanterweise zeigte natürliches Ara h 8 eine ähnliche Kurve wie Bet v 1. Demnach reduzierte sich die Signalstärke um den Faktor 5 gegenüber dem rekombinant hergestellten Allergen, was auf eine schlechtere Bindungsfähigkeit des ANS hinweist. Die Kurve der Mutante Ara h 8 K54N wich stark von der Kurve des rekombinanten Ara h 8 ab. Durch die Mutation in der p-loop Region, die an der Bildung der hydrophoben Tasche beteiligt sein soll, konnte nahezu keine Fluoreszenz mehr gemessen werden. Demzufolge wurde durch den Austausch des Aminosäurerests K54 die Proteinfaltung derart verändert, dass die hydrophobe Proteintasche kaum noch zugänglich war.

Beim rekombinant hergestellten Ara h 8 ist damit ebenso wie beim Bet v 1 eine hydrophobe Bindungsregion nachgewiesen worden, die möglicherweise zur Bindung von Lipidliganden dient. Essentiell für diese Bindungsregion ist die p-loop Region, deren Zerstörung zum vollständigen Verlust der ANS-Bindungsfähigkeit führte. Beim natürlichen Ara h 8 hingegen konnte nur eine schwache ANS-Fluoreszenz gemessen werden. Demnach war das natürliche Protein kaum zugänglich für den Fluoreszenzfarbstoff ANS. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf einen bereits gebundenen Liganden (z.B. ein Lipid), der die hydrophobe Tasche besetzte.

3.1.5.2 Charakterisierung von Ara h 8-Liganden

Zur Untersuchung, ob Lipide an Ara h 8 binden können, wurden Verdrängungsexperimente mit ANS durchgeführt. Die Bindung an Ara h 8 wird durch die Verdrängung des ANS angezeigt, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Für die Versuche wurde rekombinantes Ara h 8 verwendet, da die hydrophobe Tasche des natürlichen Proteins durch Liganden besetzt sein könnte, was die Ergebnisse verfälschen würde. Für die Versuche wurden 2,5 μM Ara h 8 mit jeweils 5, 15 und 100 μM der Lipide versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fluoreszenz nach Zugabe von 10 μM ANS bei 474 nm gemes-

sen. Als Referenzwerte wurde Ara h 8 ohne Lipide (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) gemessen.

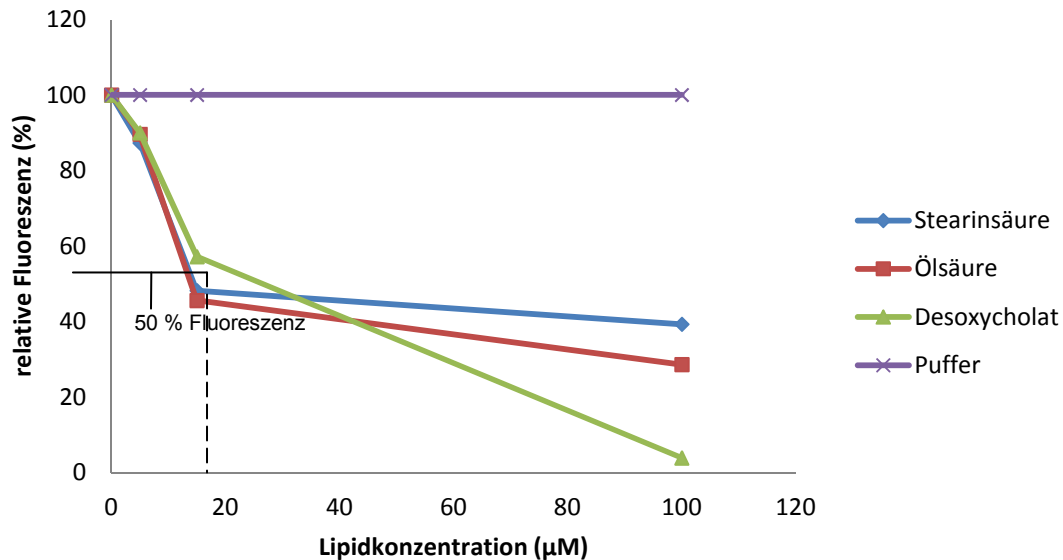


Abbildung 26: ANS-Verdrängungsassay zur Charakterisierung von Liganden des rAra h 8. Messung der ANS-Fluoreszenz von rAra h 8.0201 nach über Nacht-Inkubation mit verschiedenen Stearinsäure-, Ölsäure- und Desoxycholat-Konzentrationen (5, 15, 100 µM). Als Kontrolle wurde rAra h 8 ohne Lipide in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gemessen.

In Abbildung 26 ist die ANS-Verdrängung durch Lipide dargestellt. ANS wurde mit zunehmenden Lipidkonzentrationen verdrängt, was durch eine Abnahme der Fluoreszenzstärke angezeigt wurde. Am besten wurde ANS durch Desoxycholat verdrängt, da nach Inkubation mit 100 µM des Steroids fast keine Fluoreszenz mehr detektiert wurde. Jedoch wurde ANS auch durch die gesättigte Fettsäure Stearinsäure und durch die einfach ungesättigte Ölsäure aus der Bindungsregion entfernt. Beide Fettsäuren zeigten eine ähnliche Kurve, wobei beide Liganden eine 50 %-ige Fluoreszenzabnahme bei der gleichen Konzentration (15 µM) erreichten (gestrichelte Linie). Allerdings nimmt die Fluoreszenz zwischen 15 und 100 µM kaum noch ab, was auf eine Sättigung hinweist. Demnach können Ölsäure und Stearinsäure gleich gut an Ara h 8 binden.

3.2 Defensin

Bei der Isolierung und Aufreinigung von natürlichem Ara h 8 aus Erdnussextrakt wurde ein bisher unbekanntes Protein von geringer Molekülgröße (ca. 10 kDa) entdeckt. Zur Identifizierung wurde dieses Protein aufgereinigt, die N-terminale Proteinsequenz bestimmt und ein Homologie-Abgleich in der Proteindatenbank durchgeführt.

3.2.1 Isolierung und Identifikation

Zur Isolierung des 10 kDa Proteins wurde der Chloroform/Methanol-Extrakt zunächst mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) über eine Säule aufgetrennt, um das natürliche Ara h 8 abzutrennen (siehe Abschnitt 3.1.1). Anschließend wurde der erhaltene Durchlauf mittels Gelfiltrations-Chromatographie über eine Superdex 30 Säule getrennt, um die Proteine < 10 kDa zu isolieren. Die Proteinfractionen dieses Säulenlaufs wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen und mit der sauberen 10 kDa-Fraktion (Probe Nr. 9 in Abb. 20 a) anschließend eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt.

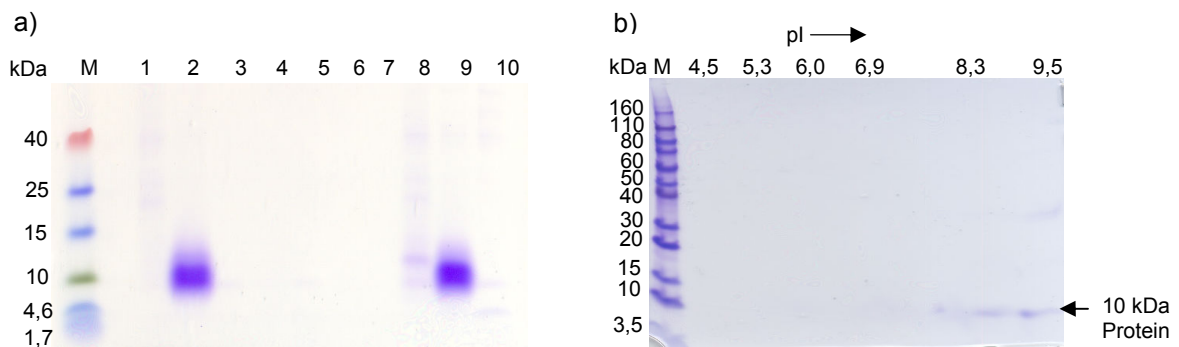


Abbildung 27: Isolierung eines 10 kDa Erdnussproteins aus lipophilem Erdnussextrakt. a) Coomassie-gefärbtes Gel der Proteinfractionen nach der Gelfiltration (15 %, reduzierende Bedingungen) (M) Marker, (1) F 10-13, (2) F 15-22, (3) F 23-25, (4) F 27-28, (5) F 29-34, (6) F 36-39, (7) F 42-46, (8) F 86-94, (9) 96-100, (10) F 102-119; b) 2-D Gelelektrophorese des isolierten Proteins (25 µg) unter reduzierenden Bedingungen (IEF: pH 4-9, SDS-PAGE: 4-20 % Tris-Glycine Gel).

bioinformatische Analyse der beiden Sequenzen ergab, dass jeweils eine N-terminale Signalsequenz vorhanden war, die zwischen den Aminosäuren an Pos. 21 und 22 vom Protein abgespalten werden kann (grau unterlegte Bereiche in Abb. 28). Das in der Erdnuss exprimierte "reife" Protein würde nach Abspaltung der Signalsequenz demnach mit der Aminosäure K an Position 22 beginnen. Die reifen Defensin-Sequenzen ohne Signalpeptid stimmten mit der detektierten Sequenz zu 100 % (EE124955) bzw. zu 93 % (EY396019) überein. Demnach handelt es sich bei dem neuen isolierten Erdnussprotein wahrscheinlich um ein Erdnuss-Defensin. Zudem sind die beiden EST-Sequenzen miteinander bis auf 4 Aminosäuren identisch, weshalb es sich vermutlich um zwei Isoformen des gleichen Proteins handelt.

Die theoretisch berechneten isoelektrischen Punkte der beiden Erdnuss-Defensine entsprachen beide den Werten aus der 2D-PAGE in Abb. 26 (siehe Tabelle 10). Jedoch wich die theoretisch ermittelte Molekülmasse mit ca. 5 kDa stark von der im SDS-Gel bestimmten Größe (ca. 10 kDa) ab (Tabelle 10). Da die Gelelektrophorese jedoch unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, ist die geringere Laufstrecke und damit das scheinbar höhere Molekulargewicht wahrscheinlich durch die Aufspaltung der Disulfidbrücken verursacht worden.

Tabelle 10: Vergleich der Erdnussdefensin-EST-Sequenzen

EST-Sequenz Nr.	pl (theoretisch)	pl (Abb.20)	MW (theoretisch)	MW (Abb.20)
EE 124955	8,21	8 - 9	5,4542 kDa	10 kDa
EY 396019	8,2	8 - 9	5,4843 kDa	10 kDa

Demnach wurde ein neues Erdnussprotein isoliert, welches wahrscheinlich zur Proteinfamilie der Defensine gehört. Die Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenz zeigte eine starke Homologie mit zwei Erdnuss-Defensinen. Beide Erdnuss-Defensine sind bis auf 4 Aminosäuren identisch, sodass es sich wahrscheinlich um zwei verschiedene Isoformen handelt. Das isolierte Protein stimmte mit dem N-Terminus des Erdnuss-Defensins EE 124955 zu 100 % überein; deshalb handelt es sich wahrscheinlich um diese Isoform. Eine genaue Identifizierung mittels Massenspektrometrie konnte bis zum Ende dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden.

3.2.2 Sequenzalignment mit anderen Defensinen

Mit der Erdnussdefensin-Sequenz (EE124955) wurde ein "BLAST-Search" in der UniProtKB Datenbank (für Eukaryoten) nach ähnlichen Proteinsequenzen durchgeführt. Die Suche ergab zahlreiche ähnliche Defensine und Defensin-ähnliche Proteine. Von diesen Sequenzen sind fünf ausgewählt worden, die eine besonders starke Ähnlichkeit (hohen "Hit-Score") mit dem Erdnussdefensin aufwiesen. Das Sequenzalignment ist in Abb. 29 dargestellt.

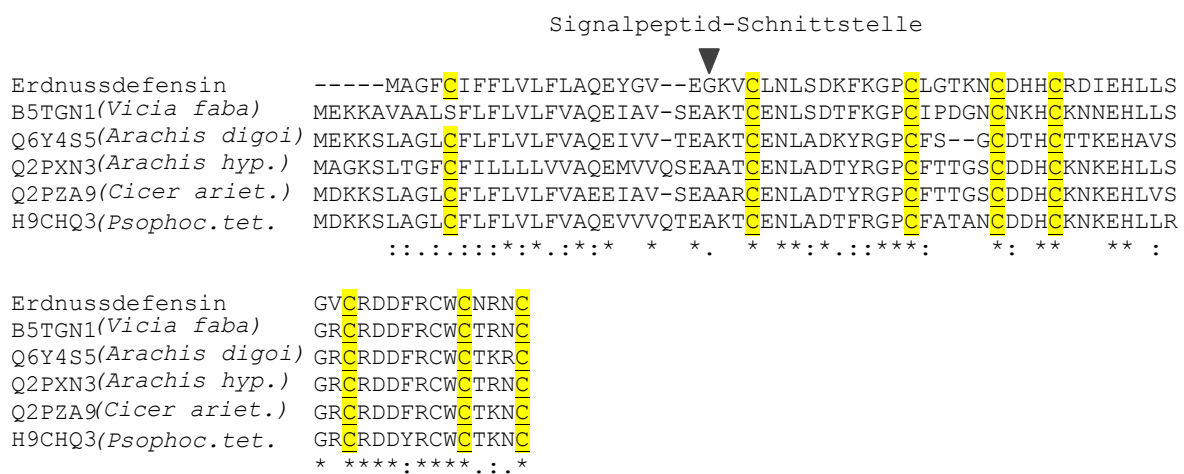


Abbildung 29: BLAST-Search mit der Erdnussdefensin-Sequenz (EE124955) nach ähnlichen Proteinen in der Proteindatenbank. Die Suche wurde mit dem Programm BLASTP (Version 2.2.29) auf www.expasy.org in der UniProtKB Proteindatenbank für Eukaryoten durchgeführt. B5TGN1 (*Vicia faba*) (Ackerbohne) Hit score: 95,7, H9CHQ3 (*Psophocarpus tetragonolobus*) (Goabohne) Hit score: 96,6, Q6Y4S5 (*Arachis digoi*) (Erdnuss, wildtyp) Hitscore: 84,9, Q2PXN3 (*Arachis hypogaea*) (Erdnuss) Hitscore: 90,1, Q2PZA9 (*Cicer arietinum*) (Kichererbse) Hitscore: 91,8. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren mit Punkten. Cysteinreste sind gelb unterlegt.

Die in Abb. 29 dargestellten Proteine gehören zur Proteinfamilie der Defensine, lediglich das Ackerbohneprotein B5TGN1 wird als Defensin-ähnlich in der UniProt Datenbank geführt. Dies liegt daran, dass beim B5TGN1 statt der für Defensine charakteristischen acht Cysteinreste nur sieben vorhanden waren. Anstelle des Cysteins an Position Nr. 10 steht beim B5TGN1 die Aminosäure Serin. Bei der Suche nach homologen Proteinen wurden vor allem Defensine von Hülsenfrüchtlern angezeigt. So zählen auch die in Abb. 29 aufgeführten Proteine zu dieser Gattung, zu der auch Erdnüsse gehören. Für alle Proteine wurde eine Beteiligung an der Abwehr von Pflanzenpathogenen nachgewiesen; das Defensin aus dem

Erdnuss-Wildtyp Q6YAS5 ist als antimykotisches Protein eingetragen. Das neu entdeckte Erdnussdefensin weist eine starke Ähnlichkeit mit den anderen Defensinen auf. Die Sequenzidentität liegt bei den Proteinen zwischen 52 % (Q6Y4S5, Q2PXN3) und 57 % (B5TGN1), die Ähnlichkeit sogar bei 70 %. Aufgrund der starken Ähnlichkeit ist es wahrscheinlich, dass das neue Erdnussdefensin ebenfalls an der Pathogenabwehr beteiligt ist. Jedoch ist für keines der aufgeführten Proteine bisher eine IgE-Reaktivität beschrieben worden.

Um das Risiko von Kreuzreaktionen mit dem Erdnussdefensin abzuschätzen, wurde die Aminosäuresequenz mit Allergenen aus der Defensin-Proteinfamilie verglichen. In Abb. 30 ist das Proteinsequenzalignment mit den bisher bekannten IgE-reaktiven Defensinen dargestellt.

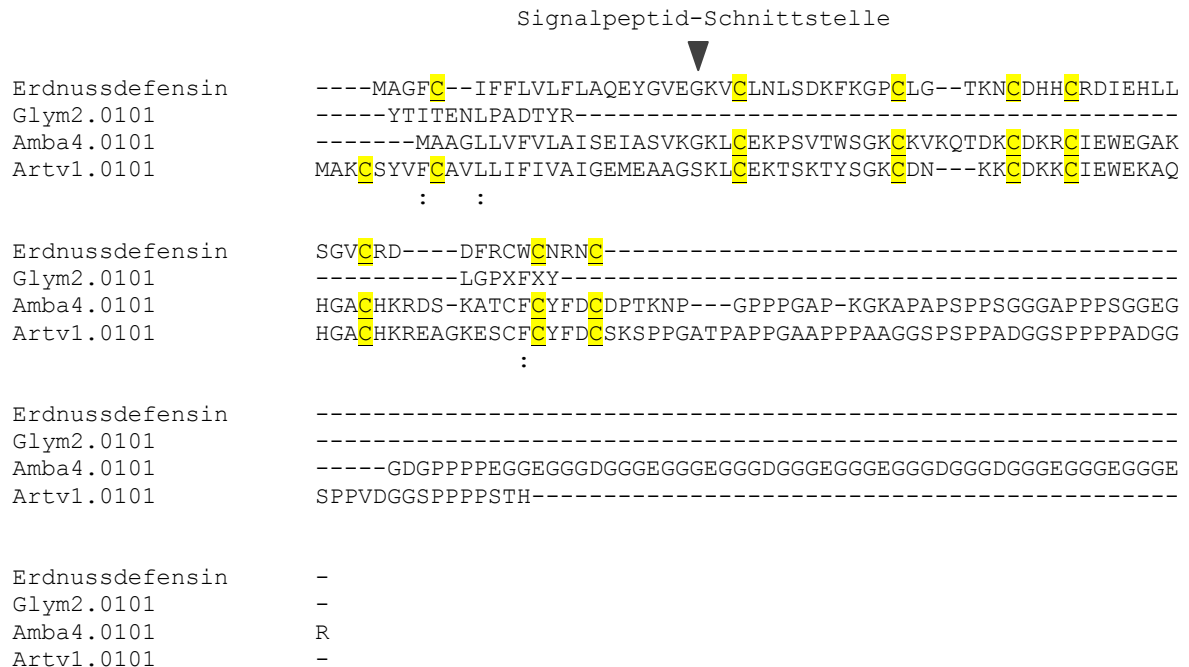


Abbildung 30: Vergleich des Erdnussdefensins (EE124955) mit Allergenen aus der Defensin-Proteinfamilie (Programm: clustal omega 1.2.1). Die Proteine Gly m 2.0101 aus Soja (*Glycine max*) NCBI Accession Nr. A57106, Amb a 4.0101 aus Beifuß-Traubenkraut (*Ambrosia artemisiifolia*) UniProt Nr. D4IHC0 und Art v 1.0101 aus Beifuß (*Artemisia vulgaris*) UniProt Nr. Q84ZX5 sind bei der IUIS als Allergen gemeldet. Ähnliche Aminosäuren sind mit Punkten gekennzeichnet, die Cysteinreste sind gelb unterlegt.

Bisher sind nur drei Allergene mit ihren allergenen Isoformen bei der IUIS registriert worden, die zur Proteinfamilie der Defensine gehören. Dazu zählt das zur Familie der Hülsenfrüchtler gehörende Sojabohnenprotein Gly m 2 sowie die Proteine Amb a 4 und Art v 1 der Korbblütler Ambrosia (Amb a 4) und Beifuß (Art v 1). Wie in Abb. 30 zu sehen ist, weist das Erdnussdefensin bis auf die Defensin-typischen acht Cysteinreste keine Ähnlichkeiten mit den Aller-

genen auf. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit, dass Kreuzreaktionen mit diesen Proteinen auftreten, sehr gering. Die IgE-Reaktivität des Erdnussdefensins konnte bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nicht untersucht werden, da entsprechende Patientenserum nicht zur Verfügung standen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionsweise und die Stabilität des Erdnussallergens Ara h 8 untersucht. Aufgrund seiner starken strukturellen Ähnlichkeit mit dem Hauptallergen aus Birkenpollen (Bet v 1) gehört Ara h 8 zur Bet v 1-Proteinfamilie. Vertreter dieser Gruppe können durch die Ähnlichkeit mit Bet v 1 bei Birkenpollenallergikern Kreuzallergien auslösen. Die allergischen Reaktionen beschränken sich in der Regel auf lokal begrenzte Reaktionen an der Mundschleimhaut (OAS) und sind nicht schwerwiegend.

Bei Erdnussallergien hingegen, die durch Ara h 8 ausgelöst werden, konnten im Einzelfall auch starke systemische Reaktionen mit Atemnot bis hin zum anaphylaktischen Schockzustand beobachtet werden (Glaumann et al. 2014). Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Ara h 8 andere molekulare Eigenschaften als die übrigen Bet v 1-homologen Allergene aufweist und dadurch eine schwerere Symptomatik verursacht.

Da die Stabilität der Nahrungsmittelallergene eine zentrale Rolle für die Intensität der allergischen Reaktionen und für die Sensibilisierungsrouten spielt, wurde die Stabilität von Ara h 8 gegenüber Enzymen des Verdauungstrakts genau untersucht. Hierzu wurden das natürliche Ara h 8 und das rekombinant hergestellte Allergen in einem neu etablierten Testsystem mit gastrischen und Pankreas-Enzymen behandelt und miteinander verglichen.

Zur molekularen Charakterisierung gehört unter anderem auch die Analyse der biologischen Funktionsweise. Für einige Mitglieder der Bet v 1-Proteinfamilie wurde eine Ribonukleaseaktivität publiziert, die wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Abwehrfunktion gegen Pflanzenschädlinge (v.a. Pilze) steht. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Ara h 8 über eine RNase-Aktivität verfügt, welche die RNA von pathogenen Erregern zerstören kann. Für eine optimale Abwehrfunktion wird die Expression der betreffenden Proteine in den Pflanzen häufig hochreguliert. Eine dadurch verursachte vermehrte Allergenaufnahme könnte auch in Zusammenhang mit einer stärkeren Symptomatik stehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem einfachen Versuchsaufbau der Ara h 8-Gehalt in mit *Aspergillus niger* kokultivierten Erdnüssen analysiert.

Lipide könnten theoretisch die Passage eines Proteins durch die Epithelbarriere erleichtern und außerdem die Stabilität im menschlichen Verdauungstrakt erhöhen. Demzufolge könnte ein Lipidligand direkten Einfluss auf die allergenen Eigenschaften von Ara h 8 ausüben. Beim Bet v 1 wurde bereits nachgewiesen, dass die Bindung von Lipiden an die Molekülstruktur

möglich ist (Mogensen et al. 2002); demzufolge wird vermutet, dass Bet v 1 eine Rolle beim pflanzlichen Lipidtransport spielt. Als physiologischer Ligand wurde kürzlich ein zur Gruppe der Flavonoide gehörendes Molekül (Quercetin-3-O-sophorosid) identifiziert (Seutter von Loetzen et al. 2014). Im Gegensatz zu Birkenpollen weisen Erdnüsse einen sehr hohen Ölgehalt auf (ca. 50 %). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob insbesondere Fettsäuren an die Ara h 8-Struktur binden können und ob dadurch die Stabilität beeinflusst wird.

Um Untersuchungen am natürlichen Allergen durchführen zu können, wurde zunächst eine neue Methode zur Ara h 8-Isolierung entwickelt, da Ara h 8 mit den herkömmlichen Methoden bisher kaum gewonnen werden konnte (Mittag et al. 2004, Riecken et al. 2008). Bei dieser neuen Methode wurde die Theorie berücksichtigt, dass Ara h 8 eventuell Lipide binden kann und dadurch lipophile Eigenschaften aufweist. Durch diese lipophile Isolierungsmethode wurde neben Ara h 8 auch ein kleines, bisher noch nicht bekanntes Erdnussprotein entdeckt. Nach der Aufreinigung konnte das Protein als Erdnussdefensin identifiziert werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurden noch geeignete Patientenserien für die Überprüfung der IgE-Reaktivität des Proteins gesucht. Deshalb konnte noch nicht geklärt werden, ob es sich bei dem Erdnuss-Defensin um ein neues Allergen handelt. Zur Abschätzung des Risikos von Kreuzreaktionen wurde die Proteinsequenz mit bekannten Allergenen aus der Defensin-Familie verglichen.

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Ara h 8

Mit dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Isolierung des Erdnussallergens Ara h 8 entwickelt, das bei Patienten mit einer Birkenpollenallergie zu Erdnussallergien führen kann (Mittag et al. 2004). Dadurch war es erstmalig möglich, die molekularen Eigenschaften des natürlichen Allergens zu untersuchen.

Die Schwierigkeiten bei der Isolierung von natürlichem Ara h 8 sind bekannt: Ara h 8 kommt in herkömmlichen Erdnussextrakten nur in sehr geringen Konzentrationen vor (Riecken et al. 2008). Zudem ist das Allergen extrem labil und empfindlich gegenüber Denaturierungsprozessen bei der Proteinaufreinigung (Marsh et al. 2008). Aus diesen Gründen konnte Ara h 8 mit den bisherigen Methoden kaum aus der Erdnuss isoliert werden (Mittag et al. 2004, Riecken et al. 2008). Üblicherweise werden Erdnussextrakte mithilfe wässriger Puffersysteme hergestellt. Dies setzt voraus, dass die betreffenden Proteine wasserlöslich sind. Das

mit Ara h 8 strukturverwandte Birkenpollenallergen Bet v 1 zeigte in verschiedenen Experimenten, dass Lipide an die Allergenstruktur binden können (Mogensen et al. 2002, Markovic-Housley et al. 2003). Auf Basis der Hypothese, dass Ara h 8 aufgrund seiner ähnlichen Struktur ebenfalls Lipide binden kann, wurde eine neue Reinigungsmethode entwickelt. Für eine bessere Ara h 8-Anreicherung wurde eine alkalische Extraktion (pH 11) mit einer anschließenden Chloroform/Methanol-Lipidextraktion durchgeführt. Auf diese Weise konnte der Ara h 8-Gehalt signifikant erhöht werden. Während der wässrige Extrakt kaum Ara h 8 enthielt, konnte im Immunoblot des lipophilen Extrakts eine ca. zehnmal höhere Ara h 8-Menge isoliert werden. Interessanterweise unterschied sich das Ara h 8 hierin von dem strukturverwandten Birkenpollenallergen Bet v 1, das gut mit wasserbasierenden Puffern isoliert werden kann (Ipsen und Løwenstein 1983, Schenk et al. 2009). Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich zum einen die wesentlich größere Bet v 1-Menge in den Birkenpollen (ca. 10 - 20 % des Gesamtproteingehaltes (Schenk et al. 2009)), die dazu führt, dass neben dem Ligand-gebundenen Bet v 1 auch eine große Menge ungebundenes Bet v 1 im Pollen vorhanden ist. Zum anderen werden sich die physiologischen Lipidliganden von Bet v 1 und Ara h 8 vermutlich unterscheiden, da die Zusammensetzung der Lipide in den Birkenpollen und den Erdnüssen unterschiedlich ist. Tatsächlich wurde als physiologischer Bet v 1-Ligand erst kürzlich das wasserlösliche Flavonoid Quercetin-3-O-sophorosid identifiziert (Seutter von Loetzen et al. 2014). Erdnüsse haben mit ca. 50 % einen wesentlich höheren Ölgehalt als Birkenpollen und enthalten vor allem ungesättigte Fettsäuren (ca. 70 - 80 % Ölsäure, ca. 20 % Linolsäure) und gesättigte Fettsäuren (ca. 5 - 10 % Stearinsäure und Palmitinsäure) (Vassiliou et al. 2009). Deshalb wird ein möglicher Ara h 8-Ligand vermutlich auch lipophil sein, was die Ergebnisse erklären würde.

Die Fremdproteine im lipophilen Erdnussextrakt (u.a. Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6, Ara h 3/4) konnten mithilfe einer hydrophoben Säulenmatrix chromatographisch entfernt werden (HIC). Die Ara h 8-Ausbeute war mit 8 µg pro Gramm Erdnuss zwar gering, reichte jedoch für die weiteren Untersuchungen aus. Interessanterweise wurden bei der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) insgesamt zwei reine Ara h 8-Fractionen eluiert. Die erste Fraktion konnte mit Milli-Q-Wasser von der Säule gelöst werden. Das Protein konnte im Immunoblot eindeutig als Ara h 8 nachgewiesen werden. In der 2D-Gelelektrophorese wurde jedoch deutlich, dass die Ara h 8-Fraktion insgesamt vier unterschiedliche Ara h 8-Isoformen enthielt. Die Proteinspots hatten zwar alle das gleiche Molekulargewicht von 17 kDa, unterschieden sich jedoch in ihren isoelektrischen Punkten voneinander. Zudem reagierte jedes der Proteine mit dem anti-Gly m 4 Kaninchenserum, das mit Ara h 8 kreuzreagiert. Demnach ist die Verschiebung der isoelektrischen Punkte vermutlich auf den Austausch bestimmter Aminosäuren in den Proteinsequenzen zurückzuführen, und es handelt sich um

verschiedene Isoformen. Verschiedene Isoformen wurden bereits bei anderen Bet v 1-homologen Allergenen nachgewiesen sowie für das Bet v 1 selbst (Schenck et al. 2006, Reuter et al. 2005, Breiteneder et al. 1993). Die Isoformen können dabei unterschiedlich stark IgE-reaktiv sein (Larsen et al. 1992, Ferreira et al. 1997). Beim Bet v 1 gibt es sogar einige Isoformen, die gar keine IgE-Reaktivität aufweisen (Ferreira et al. 1996). Die Isoformen in der Ara h 8-Fraktion waren unterschiedlich stark vertreten. Die intensivsten Proteinspots waren bei pI 5,0 und 5,3 zu erkennen. Jedoch konnte nur beim Proteinspot bei pI 5,3 eine IgE-Reaktivität mit einem Patientenserum nachgewiesen werden. Die anderen Isoformen wurden nicht von dem Patientenserum detektiert. Bei dem WHO/IUIS Allergen Nomenklatursubkommittee sind bisher nur zwei IgE-reaktive Ara h 8-Isoformen registriert worden; diese wurden als Ara h 8.0101 und Ara h 8.0201 bezeichnet. Der IgE-reaktive Proteinspot wurde als Ara h 8.0201 mittels Massenspektrometrie (MS-TOF) identifiziert und wies denselben experimentellen pI wie rekombinantes Ara h 8.0201 auf. Die Analyse des N-Terminus bestätigte, dass es sich hierbei um Ara h 8.0201 handelte. Leider konnte die IgE-Reaktivität der einzelnen natürlichen Isoformen nicht weiter untersucht werden, da keine weiteren Patientenseren für diese Experimente, bei denen große Serum-Mengen benötigt werden, zur Verfügung standen. Ein Proteinspot stellt vermutlich die allergene Ara h 8-Isoform Ara h 8.0101 dar. Ein weiterer Proteinspot könnte auf das PR-10 Protein AhPR10 hinweisen, das Chadha und Das (2006) in der cDNA eines 6 Tage alten Erdnuskeimlings entdeckten. Dieses Protein weist eine 85,1 %-ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von Ara h 8.0201 auf. Bis auf den N-Terminus sind die beiden Proteine fast komplett identisch. Eine vierte Ara h 8-Isoform ist bisher nicht beschrieben worden. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass es nötig ist, die Isoallergene in der Einzelkomponenten-aufgelösten Allergie-Diagnostik zu berücksichtigen. Nur wenn IgE-reaktive Isoformen in den Tests verwendet werden, ist eine sichere Diagnose möglich. Möglicherweise sind nicht alle Patienten auf die gleichen Isoformen sensibilisiert. Standardmäßig wird in den Allergie-Tests jedoch rekombinant hergestelltes Ara h 8.0101 verwendet. Die Ergebnisse legen nahe, dass es für eine sichere Diagnostik sinnvoll wäre, zukünftig auch rekombinantes Ara h 8.0201 mit einzusetzen.

Um noch die restlichen an der Säule befindlichen Proteine zu entfernen, wurde die Säule nach der Ara h 8-Aufreinigung mit 50 % (v/v) Ethanol gespült. Überraschenderweise konnte bei diesem Reinigungsprozess nochmals ein 17 kDa großes Protein eluiert werden, welches ebenfalls mit dem Ara h 8-spezifischen Kaninchenserum reagierte. Die N-terminale Sequenzierung bestätigte, dass es sich hierbei ebenfalls um Ara h 8.0201 handelte. Demnach wurden zwei scheinbar identische Proteine isoliert, die jedoch unterschiedliche Eigenschaften aufwiesen. Das mit Ethanol eluierte Ara h 8 muss wesentlich stärker an die

Säule gebunden gewesen sein als die Wasser-Fraktion. Demnach war das Protein viel hydrophober, was auf Änderungen in der Molekülstruktur hinweist. Dies könnte z.B. durch die Denaturierung des Proteins bei der Aufreinigung verursacht worden sein (z.B. hoher Druck, hohe Salzkonzentrationen). Druck und Salzkonzentration waren jedoch nicht höher, als normalerweise bei Proteinaufreinigungen üblich ist. Die veränderte Hydrophobizität könnte jedoch auch auf einen Lipidliganden hindeuten. Bei dem strukturverwandten Birkenpollenallergen Bet v 1 wurde erst kürzlich entdeckt, dass die Bindung des Lipids Desoxycholat zu einer Änderung der Struktur führte (Grutsch et al. 2014). Die Bindung des Liganden verursachte bei dem Birkenpollenallergen eine kompaktere Allergenstruktur. Eine kompaktere Struktur durch einen Lipidliganden könnten beim Ara h 8 dazu beigetragen haben, dass die hydrophoben Proteinbereiche nicht mehr so gut zugänglich waren, weil sie z.B. durch den Liganden abgeschirmt wurden. Dadurch würde das Protein hydrophiler und wäre entsprechend mit Wasser von der Säule abtrennbar, so wie es bei der ersten Ara h 8-Fraktion beobachtet wurde. Demnach könnte die wässrige Fraktion des Ara h 8 ein gebundenes Lipid enthalten, die Ethanolfraktion hingegen Ara h 8 ohne Lipid. Diese Hypothese konnte aus Zeitgründen jedoch leider nicht näher untersucht werden. Sollte Ara h 8 eine Rolle beim pflanzlichen Lipidtransport spielen, so wären wahrscheinlich beide Formen des Proteins (freies Ara h 8 und Lipid-gebundenes Ara h 8) in der Erdnuss vorhanden.

Die beiden gereinigten Proteine wurden nach der Elution mit Milli-Q-Wasser dialysiert und in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Beide Proteine verhielten sich identisch und wiesen auch keine Unterschiede in der IgE-Reaktivität auf. Da eine 50 %-ige Ethanolösung zur Denaturierung von Proteinen führen kann, wurde für die weitere molekulare Charakterisierung jedoch nur Ara h 8 verwendet, das mit Milli-Q-Wasser eluiert wurde. Zum Vergleich wurde rekombinant hergestelltes Ara h 8.0201 in den Experimenten mit untersucht. Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes Ara h 8.0201 wie auch natürliches Ara h 8 IgE-reaktiv waren. Die eingesetzten fünf Patientenserum reagierten mit beiden Proteinen und zeigten keine Unterschiede in der Intensität. Die Ergebnisse des Kreuzinhibitions-Tests zeigten, dass die IgE-Reaktivität auf eine Kreuzreaktion mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 zurückzuführen war. Demnach tritt eine Sensibilisierung nur bei Patienten auf, die gleichzeitig unter einer Erdnuss- und unter einer Birkenpollenallergie leiden. Kreuzreaktionen werden bei Bet v 1-homologen Allergenen in erster Linie durch konformationelle Epitope verursacht. Deshalb ist es nicht ungewöhnlich, dass die Aminosäuresequenzen teilweise stark voneinander abweichen. Die Proteinsequenzen von Ara h 8 und Bet v 1 stimmen nur zu 41 % überein. Jedoch zeigten die CD-Untersuchungen deutlich, wie ähnlich die Sekundärstrukturen sind. Natürliches Bet v 1 und rekombinantes Ara h 8 wiesen eine nahezu identische Verteilung von α -helicalen Bereichen

(rAra h 8: 44%, nBet v 1: 47 %) und β -Faltblatt Elementen (rAra h 8: 16 %, nBet v 1: 14 %) auf. Interessanterweise wich das CD-Spektrum des natürlichen Ara h 8 von dem rekombinanten Allergen und Bet v 1 ab. Das natürliche Allergen hatte einen geringeren α -Helix Gehalt (28 %) bei fast gleichbleibendem β -Faltblatt Anteil (15 %). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ein Lipidligand am natürlichen Allergen gebunden sein könnte. Röntgenkristallographische Untersuchungen von rekombinant hergestelltem Ara h 8.0101 konnten erst kürzlich beweisen, dass eine Ligand-Bindung beim Ara h 8 die Molekülstruktur verändern würde (Hurlburt et al. 2013). Hierzu wurde rekombinantes Ara h 8 alleine und im Komplex mit verschiedenen Liganden (MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) und Epicatechin (Flavonoid)) kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht. Danach besteht rekombinantes Ara h 8 aus drei α -Helices, die ein siebenfach-gefaltetes, antiparalleles β -Faltblatt flankieren. Die längste Helix befindet sich am C-Terminus des Proteins. Durch die Bindung von MES in der hydrophoben Tasche des Proteins wurde vor allem der C-Terminus des Moleküls verändert. Dies könnte die Abweichung im CD-Spektrum von natürlichem Ara h 8 erklären, da ein gebundener Ligand demzufolge den C-Terminus und damit die längste α -Helix des Allergens verändern würde.

Interessanterweise weist das natürliche Ara h 8 auch eine höhere Thermostabilität auf. Während rekombinantes Ara h 8 und Bet v 1 bereits bei Temperaturen von 64 °C bzw. 60 °C zerstört wurden, blieb natürliches Ara h 8 bei Temperaturen bis 78 °C stabil. Die höhere Stabilität könnte ebenfalls auf einen Lipidliganden hindeuten. Beim Bet v 1 führte die Bindung des Lipids Desoxycholat jedenfalls zu einer Erhöhung der Temperaturresistenz (Asam et al. 2014). Allerdings konnte bei dem Birkenpollenallergen nur eine um 3 °C erhöhte Schmelztemperatur durch die Bindung des Lipids erreicht werden. Beim Ara h 8 war der Effekt mit 12 °C um ein Vierfaches größer. Da Bet v 1-homologe Allergene in der Regel hitzeempfindlich sind, lösen sie nur bei dem Verzehr von rohem Gemüse oder Obst allergische Beschwerden aus (Bohle et al. 2006). Die höhere Thermostabilität des Ara h 8 könnte jedoch dazu führen, dass auch verarbeitete Erdnussprodukte Symptome auslösen können.

Ein zentrales Merkmal für das allergene Potential von Nahrungsmittelallergenen ist die Stabilität im Verdauungstrakt. Sie entscheidet zum einen über den Sensibilisierungsweg und ist zum anderen auch für die Stärke der allergischen Reaktionen mitverantwortlich (Jevaloyes et al. 2012). Viele Proteine werden durch die Proteasen des Gastrointestinaltrakts zersetzt, sodass im Darm nur noch Proteinfragmente von der Darmschleimhaut in den Körper aufgenommen werden können. Jedoch können nur Allergene, die unfragmentiert über den Darm in den Körper gelangen, dort eine Sensibilisierung auslösen (Astwood et al. 1996). Protease-

resistente Allergene führen zudem häufig auch zu sehr starken Allergiesymptomen (z.B. Ara h 2 und Ara h 9) (Maleki et al. 2003, Lauer et al. 2009). Ara h 8 gehört zur Bet v 1-Proteinfamilie, deren Vertreter normalerweise schnell durch gastrische Enzyme wie Pepsin abgebaut werden und dadurch die IgE-Bindungsfähigkeit verlieren (Jensen-Jarolim et al. 1999, Vieths et al. 1999). Interessanterweise war das in dieser Arbeit untersuchte natürliche Ara h 8 im Pepsin-Verdau stabil, während das rekombinante Ara h 8 hingegen schnell zerstört wurde. Auch das zum Vergleich mit eingesetzte Bet v 1 wurde nach kurzer Zeit abgebaut, so wie es für Bet v 1-homologe Allergene üblich ist. Demzufolge unterschieden sich das natürliche und das rekombinante Allergen auch in der Protease-Resistenz voneinander. Spezifisch gebundene Lipidliganden (Desoxycholat) können beim Bet v 1 zu einer Strukturänderung führen, die gleichzeitig die proteolytische Resistenz und die Thermostabilität erhöht (Asam et al. 2014). Um zu überprüfen, ob die erhöhte Stabilität des Ara h 8 durch einen Lipidliganden prinzipiell verursacht werden kann, wurden Experimente mit rekombinatem Ara h 8 und zugesetzter Ölsäure durchgeführt. Ölsäure ist eine einfach ungesättigte Fettsäure, die den Hauptbestandteil des Öls in der Erdnuss darstellt (Vassiliou et al. 2009). Durch die Kombination von rekombinatem Ara h 8 mit Ölsäure sollte eine Bindung von Ölsäure an das Ara h 8 simuliert werden. Erstaunlicherweise wurde das rekombinante Allergen dadurch ebenfalls Pepsin-resistent und es konnten interessanterweise auch vermehrt Ara h 8-Dimere detektiert werden. Beim Bet v 1 wurde beobachtet, dass die Bildung von Dimeren für die Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper essentiell ist (Schöll et al. 2005, Kofler et al. 2014). Demnach könnten Lipide beim Ara h 8 auch eine Rolle für die IgE-Bindung spielen.

Möglicherweise könnten auch unspezifisch an die Proteinoberfläche angelagerte Lipide, die beim Aufreinigungsprozess nicht gänzlich entfernt wurden, das natürliche Ara h 8 "abgeschirmt" und den proteolytischen Abbau dadurch verhindert haben. Um dies zu untersuchen, wurde ein *in-vitro* Verdau etabliert, der zusätzlich zu den Magenenzymen auch die Lipasen aus der Bauchspeicheldrüse beinhaltet. Neben den Gallensalzen, die zur Emulgation fettreicher Speisen benötigt werden, sind vor allem die in der Bauchspeicheldrüse produzierten Lipasen für den Lipidabbau verantwortlich (Moreno 2007). Diese werden bei den üblichen Testsystemen zur Analyse der Proteasestabilität von Nahrungsmittelallergenen jedoch nicht berücksichtigt. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Testsystem mit Magensaft- (Enzynorm f®) und Pankreas-Surrogaten (Kreon®) etabliert, um physiologischere Verdauungsbedingungen zu simulieren. Enzynorm f® wird aus Schweine-Magenschleimhaut hergestellt und beinhaltet neben Pepsin auch die anderen wichtigen natürlichen Komponenten der Magenschleimhaut. Das aus Schweine-Pankreas gewonnene Präparat Kreon® enthält sämtliche im Pankreas gebildeten Lipasen, Amylasen und Proteasen. Entsprechend den

Erwartungen wurden rekombinantes Ara h 8 und natürliches Bet v 1 im kombinierten Magen-Pankreas-Verdau schnell abgebaut. Natürliches Ara h 8 war hingegen auch unter dem Einfluss der Pankreas-Enzyme stabil. Die Pankreaslipase Steapsin baut Lipide wie z.B. Ölsäure schnell ab, wenn diese für das Enzym gut zugänglich sind (Mellanby und Woolley 1914). Demzufolge müssten unspezifisch angelagerte Lipide auf der Allergen-Oberfläche schnell durch das Kreon® abgebaut werden. Das Protein war jedoch weiterhin stabil, wodurch eine "Abschirmung" des natürlichen Ara h 8 durch unspezifisch angelagerte Lipide ausgeschlossen werden konnte. Hingegen wurde rekombinantes Ara h 8, das mit Ölsäure kombiniert eingesetzt wurde, schnell durch das Pankreas-Surrogat zersetzt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Ölsäure-Moleküle unspezifisch an der Oberfläche des Allergens gebunden waren, wo sie durch die Lipasen leicht abgebaut werden konnten.

Wie die Ergebnisse zeigten, unterschieden sich rekombinantes und natürliches Ara h 8 stark voneinander in Bezug auf die Thermostabilität und die Resistenz gegenüber Proteasen. Das natürliche Allergen ist hitzeresistenter und ist darüber hinaus gegenüber Verdauenzymen stabil, was für Bet v 1-homologe Allergene ungewöhnlich ist. Die höhere Stabilität scheint darüber hinaus in Zusammenhang mit natürlichen Erdnuss-Lipiden zu stehen, da die Protease-Stabilität des rekombinanten Proteins unter dem Einfluss von Ölsäure wesentlich erhöht wurde. Die Proteine der Bet v 1-Familie gehören zu den "Klasse II-Nahrungsmittelallergenen", die nur aufgrund von Kreuzreaktionen allergische Beschwerden verursachen. Diese Allergene weisen normalerweise nur eine geringe Stabilität auf, was mit ein Grund dafür ist, dass meistens nur schwache allergische Symptome ausgelöst werden (OAS) (Aalberse 2000). Nahrungsmittelallergene, die eine Sensibilisierung im Darm auslösen, sind hingegen im Verdauungstrakt stabil und werden als "Klasse I-Nahrungsmittelallergene" bezeichnet (Astwood et al. 1996). Die Allergiesymptome sind bei diesen Allergenen wesentlich stärker und können auch systemische Reaktionen einschließen. Es wird angenommen, dass die Symptomstärke mit der Stabilität in Zusammenhang steht, da in den meisten Fällen nur Allergene, die unfragmentiert in die Blutbahn gelangen eine IgE-Reaktion auslösen (Untersmayr und Jensen-Jarolim 2006). Mit der Protease-Resistenz besitzt das natürliche Ara h 8 demnach die Voraussetzung dafür, auch schwerere allergische Reaktionen auslösen zu können. Erst kürzlich wurde ein klinischer Fall publiziert, bei dem eine anaphylaktische Reaktion auf Ara h 8 zurückgeführt wurde (Glaumann et al. 2014). Die Patientin war lediglich gegen Ara h 8 sensibilisiert und wies auch keine Sensibilisierung gegen die Hauptallergene der Erdnuss auf. Allerdings wurde eine verhältnismäßig große Erdnussmenge (300 g) in einem kurzen Zeitraum konsumiert. Deshalb scheint auch die verzehrte Menge in Zusammenhang mit den starken Symptomen zu stehen. Dies konnte auch in einer anschließenden Studie mit 20 Kindern

gezeigt werden (Glaumann et al. 2015). Ein Zusammenhang zwischen Stabilität und Symptomstärke wurde auch bereits bei einem anderen Klasse II-Nahrungsmittelallergen aus der Erdnuss, dem Ara h 9, beobachtet. Ara h 9 ist ebenfalls Protease-resistent und kann schwere Symptome auslösen (Lauer et al. 2009). Interessanterweise gehört Ara h 9 zur Gruppe der nicht spezifischen Lipid-Transport-Proteine (LTP) (Krause et al. 2009) und steht demnach ebenfalls mit Lipiden in Zusammenhang.

4.2 Die biologische Funktion von Ara h 8

Die biologische Funktionsweise von Ara h 8 wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte erstmalig die biologische Funktion anhand von rekombinantem Ara h 8.0201 genau analysiert werden.

Im Gegensatz zu Ara h 8 wurde die Funktion des Birkenpollenallergens Bet v 1 schon eingehend untersucht. Wie auch viele andere PR-10 Proteine verfügt Bet v 1 über eine Ribonukleasefunktion, die wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Abwehr von Pilzen steht (Bufe et al. 1996, Wu et al. 2003, Bantignies et al. 2000). Für eine optimale Wirkung müssen die Abwehrproteine bei Bedarf in der Pflanze hochreguliert werden können. Deshalb wurde in dieser Arbeit überprüft, ob der Ara h 8-Gehalt durch eine Pilzinfektion von Erdnüssen gesteigert werden kann.

Verglichen mit den Hauptallergenen Ara h 1 und Ara h 2, die 12-16 % (Ara h 1) bzw. 6-9 % (Ara h 2) des Gesamtproteingehalts der Erdnuss darstellen (Koppelman et al. 2001, Bublin und Breiteneder 2014), ist die Ausbeute bei der Isolierung von natürlichem Ara h 8 mit 8 µg pro g Erdnuss sehr gering gewesen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Ara h 8-Expression unter normalen Bedingungen in der Erdnuss schwach ist. Dies ist vermutlich auch ein Grund für die meistens eher milden Allergiesymptome. Ara h 8 gehört zur Gruppe der PR-10 Proteine. Bei einigen Vertretern dieser Gruppe konnte nachgewiesen werden, dass die Expression unter bestimmten biotischen (z.B. Viren, Pilze, Bakterien) und abiotischen Stressbedingungen (z.B. Salzkonzentration) hochreguliert werden kann (Jain et al. 2006, Pinto et al. 1995, Robert et al. 2001).

Um zu überprüfen, ob die Ara h 8-Expression durch Pathogene induziert wird, wurde in dieser Arbeit ein Screeningversuch mit dem Erdnuss-pathogenen Pilz *Aspergillus niger* durchgeführt. Interessanterweise konnte ein höherer Ara h 8-Gehalt in Erdnüssen

nachgewiesen werden, die im Keimstadium mit dem Pilz befallen waren. Demzufolge wurde die Ara h 8-Expression durch den Pilzbefall so weit hochreguliert, dass diese im Extrakt nachgewiesen werden konnte. Die Expression stieg durch die Pilzinfektion ungefähr auf die doppelte Menge Ara h 8 an, wie anhand der Probe im Coomassie-gefärbten Gel abgeschätzt werden konnte. Demnach kann der Ara h 8-Gehalt in Erdnüssen variieren und durch im Boden befindliche hohe Pilzkonzentrationen stark ansteigen. Infolgedessen könnte der Verzehr solcher Erdnüsse mit einem erhöhten Allergengehalt zu stärkeren Allergiesymptomen führen. Dieses Risiko könnte auch für gentechnisch veränderte Erdnussarten bestehen. In einer salztoleranten sowie in einer *Aspergillus parasiticus*-immunen Erdnussart wurde eine vermehrte Ara h 8-Expression auf Genebene bereits nachgewiesen (Jain et al. 2006, Guo et al. 2008).

Da die Ara h 8-Expression durch Pflanzenschädlinge induziert werden kann, wurde untersucht, inwiefern das Allergen gegen Erreger wirksam ist. Viele PR-10 Proteine verfügen über eine Ribonukleasefunktion, die feindliche RNA abbauen kann (Bufe et al. 1996, Wu et al. 2006, Chadha und Das 2006). Deshalb wurde Ara h 8 auf eine Ribonuklease-Funktion hin untersucht. Die Aktivitätstests zeigten deutlich, dass rekombinantes Ara h 8 eine Ribonuklease-Funktion aufwies. Verglichen mit Ribonuklease A, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, war die Reaktivität jedoch relativ gering. Ribonuklease A konnte in der gleichen Zeit ca. 3,5-mal mehr RNA zersetzen als Ara h 8. Ribonukleasen sind ubiquitär vorhanden und darüber hinaus sehr stabil, da sie über mehrere Disulfidbrücken verfügen. Um sicherzugehen, dass die detektierte RNase-Aktivität beim Ara h 8 nicht durch Verunreinigungen verursacht wurde, wurden gentechnisch veränderte Ara h 8-Proteine mit verminderter Reaktivität hergestellt und als Kontrollen eingesetzt. Die für die Funktion wichtigen Bereiche wurden durch den Vergleich der Ara h 8-Aminosäuresequenz mit einigen PR-10 Proteinen mit RNase-Funktion identifiziert. Hierzu wurde das strukturverwandte Birkenpollenallergen Bet v 1 sowie die Proteine SPE-16 aus der mexikanischen Yambohne (*Pachyrrhizus erosus*) und das Lupinenprotein (*Lupinus albus*) LaPR10 (bzw. Lup a 4) herangezogen. Yambohne und Lupine sind ebenfalls Hülsenfrüchtler und deshalb artverwandt mit der Erdnuss. Durch den Aminosäuresequenz-Vergleich wurden zwei stark konservierte Sequenzregionen ermittelt ("p-loop Region" und C-Terminus), die bei den genannten Proteinen vorhanden waren und die mit der RNase-Aktivität in Zusammenhang stehen sollen (Wu et al. 2003, Chadha und Das 2006). Die "p-loop"-Region liegt bei PR-10 Proteinen mit RNase-Aktivität streng konserviert vor und ist als Phosphat-bindendes Motiv für die Interaktion mit den Phosphatresten von RNA und DNA verantwortlich (Liu und Ekramoddoullah 2006, Saraste et al. 1990, Wu et al. 2003, Bantignies et al. 2000). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die p-loop Region auch mit der Ribonuklease-Aktivität zusammenhängt. Beim Ara h 8

wird diese Region von den Aminosäuren 46-54 gebildet und ist mit der Sequenz GNGGPGTIK vollständig identisch mit Bet v 1 und dem Lupinenprotein LaPR10 (Lup a 4). In der p-loop Region sind einige Aminosäuren variabel, lediglich die Glycinreste (G) und der Lysinrest (K) am Ende liegen streng konserviert vor (GXGGXGXXK) (Saraste et al. 1990, Wu et al. 2003). Lysin ist eine relativ große Aminosäure, die zudem aufgrund ihrer positiven Ladung stark hydrophile Eigenschaften besitzt. Im Gegensatz dazu ist Glycin aufgrund seiner geringen Molekülgröße frei drehbar und zudem hydrophob. Deshalb wurde ein gentechnisch verändertes Ara h 8-Protein mit einer Punktmutation an dem Lysinrest K54 hergestellt, da durch eine Veränderung an dieser Stelle der größte Effekt auf diese Region erwartet wurde. Die positiv geladene Aminosäure Lysin wurde durch die ungeladene Aminosäure Asparagin (N) ersetzt, die weniger hydrophil ist. Das somit entstandene Protein wurde als Ara h 8 K54N bezeichnet. Im Ribonuklease-Aktivitätstest zeigte dieses gentechnisch veränderte Protein keine RNase-Aktivität mehr. Dies bewies, dass die p-loop Region für die RNase-Funktion beim Ara h 8 wichtig war. Vermutlich konnte das Protein nicht mehr an die Phosphatreste der eingesetzten RNA binden, da die Bindungsregion zerstört wurde. Das andere streng konservierte Sequenzmotiv ist an der C-terminalen Helix der PR-10 Proteine zu finden. Dieses wird durch die hydrophilen Aminosäurereste Glutaminsäure (E) 147 und Tyrosin (Y) 149 gebildet (Liu und Ekramoddoullah 2006). Deshalb wurde ein zweites, gentechnisch verändertes Ara h 8-Protein generiert, indem die hydrophilen C-terminalen Aminosäuren (E147 und Y149) durch die hydrophobe Aminosäure Alanin (A) ersetzt wurden. Das Protein Ara h 8 E147A/Y149A wies im Ribonuklease-Aktivitätstest nur noch eine sehr geringe Reaktivität auf. Dies deutete darauf hin, dass die C-terminale Helix ebenfalls für die Ribonuklease-Funktion bedeutsam ist, jedoch einen geringeren Einfluss als die p-loop Region besitzt. Auch bei anderen PR-10 Proteinen wurde bereits nachgewiesen, dass die p-loop Region und der C-Terminus für die RNase-Funktion wichtig sind (Chadha und Das 2006, Wu et al. 2003, Xu et al. 2014). Jedoch konnte bis heute nicht geklärt werden, welches Strukturmerkmal für die Funktion entscheidend ist. Die RNase-Funktion steht jedenfalls im direkten Zusammenhang mit der Abwehrfunktion (Chadha und Das 2006, Xu et al. 2014). Da die Ara h 8-Expression durch die Infektion mit *Aspergillus niger* Pilzkulturen anstieg, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Ara h 8 gegen Pilze wirksam ist.

Die Aufklärung der Bet v 1-Struktur mittels Röntgenkristallographie deckte eine dreidimensionale hydrophobe Tasche auf, die in das Molekül hineinragt (Mogensen et al. 2002). Diese Tasche bildet drei verschiedene Eingänge, an deren Seiten verschiedene Lipide gebunden werden können (Markovic-Housley et al. 2003, Kofler et al. 2012, Asam et al. 2014). Deshalb wird vermutet, dass Bet v 1 zwar eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielt, aber wahrscheinlich auch am pflanzlichen Lipidtransport beteiligt ist (Mogensen et al. 2002). Bei der

Isolierung von natürlichem Ara h 8 wurden die starken hydrophoben Eigenschaften des Allergens deutlich. Zudem ergaben die Untersuchung der Sekundärstruktur und der Stabilität starke Hinweise darauf, dass ein Lipid am natürlichen Ara h 8 gebunden vorliegt. Deshalb wurde in dieser Arbeit am rekombinanten Ara h 8 untersucht, ob das Allergen Lipide binden kann. Für die Funktion als Lipid-bindendes Protein müssen Proteinmoleküle hydrophobe Bindungsregionen aufweisen, die eine spezifische Ligandbindung ermöglichen. Diese Regionen konnten beim rekombinanten Ara h 8 mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs ANS (8-Anilino-1-Naphthalensulfonat) nachgewiesen werden. Nach Bindung an unpolare Proteinregionen emittierte der Farbstoff eine starke Fluoreszenzstrahlung bei ca. 474 nm, die mit steigenden Ara h 8-Konzentrationen zunahm. Im Vergleich zu Bet v 1 zeigte rekombinantes Ara h 8 im "ANS-Bindungstest" überraschenderweise eine ca. 5-fach stärkere Fluoreszenz. Dies könnte darauf hindeuten, dass die hydrophobe Bindungsregion mehrere ANS-Moleküle gleichzeitig binden kann. Röntgenkristallographische Untersuchungen der dreidimensionalen Ara h 8-Struktur bestätigten, dass bis zu drei Liganden gleichzeitig in der hydrophoben Tasche binden können. Auch die Bindung von mehreren ANS-Molekülen ist möglich, da ANS an alle drei Bindungsstellen beim Ara h 8 zu passen scheint (Hurlburt et al. 2013). Im Gegensatz dazu kann ANS nur von einer der Bindungsstellen beim Bet v 1 gebunden werden (Kofler et al. 2012). Die Aufklärung der Bet v 1-Kristallstruktur zeigte, dass die hydrophobe Tasche über drei verschiedene Eingänge verfügt ($\epsilon 1$ - $\epsilon 3$) (Kofler et al. 2012). Die Öffnung $\epsilon 3$ wird teilweise von der p-loop Region gebildet, wobei u.a. auch die Aminosäure K54 beteiligt ist. Zur Überprüfung, ob die p-loop Region auch für die Ligandenbindung beim Ara h 8 wichtig ist, wurde das gentechnisch veränderte Protein Ara h 8 K54N aus den RNase-Tests auch im ANS-Bindungstest untersucht. Ara h 8 K54N zeigte keine Fluoreszenz des ANS im Test, sodass die Lipid-Bindungsregion vermutlich zerstört worden ist. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die hydrophobe Tasche beim Ara h 8 ähnlich aufgebaut ist wie beim Bet v 1 und dass die p-loop Region an der Lipid-Bindung beteiligt ist.

Während beim rekombinant hergestellten Ara h 8.0201 eine starke Fluoreszenz messbar war, konnten beim natürlichen Allergen hingegen nur schwache Signale detektiert werden, sodass demnach keine hydrophobe Bindungsregion beim natürlichen Ara h 8 vorhanden ist. Dies könnte auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Zum einen könnte die Struktur bei der Aufreinigungsprozedur so stark verändert worden sein, dass die hydrophobe Tasche zerstört wurde. Auf der anderen Seite könnte auch ein bereits gebundener Ligand die Bindung des ANS an das Protein stören. Die Sekundärstrukturen von natürlichem und rekombinantem Ara h 8 wichen jedoch nur geringfügig voneinander ab. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass das Protein zerstört wurde, da eine Denaturierung wahrscheinlich auch eine Änderung der β -Faltblätter zur Folge gehabt hätte, die jedoch unverändert blieben. Zudem würde ein

Protein, dessen Struktur bei der Aufreinigung bereits verändert wurde, wahrscheinlich auch schnell von Proteasen abgebaut werden. Das natürliche Ara h 8 war im proteolytischen Verdau jedoch stabil. Vielmehr deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass bereits ein Lipidligand an das natürliche Ara h 8 gebunden vorlag.

Um potentielle physiologische Liganden zu identifizieren, wurden daraufhin Verdrängungstests mit Lipiden und ANS durchgeführt. Diese mussten mit dem rekombinanten Ara h 8 durchgeführt werden, da dieses lipidfrei war. Dafür wurde das Allergen zusammen mit verschiedenen Konzentrationen (5, 15 und 100 μM) der Lipide Desoxycholat, Stearinsäure oder Ölsäure inkubiert und die Fluoreszenz nach Zugabe von ANS gemessen. Zum Vergleich wurde die ANS-Fluoreszenz von Ara h 8 ohne Lipidzugabe detektiert. Die Besetzung der Bindungsregion durch einen Lipid-Liganden wurde durch eine Minderung der Signalstärke verglichen mit der Probe ohne Lipide angezeigt. Mit steigenden Lipidkonzentrationen wurde weniger ANS an Ara h 8 gebunden. Demzufolge wurde sowohl die gesättigte Fettsäure Stearinsäure als auch die einfach ungesättigte Fettsäure Ölsäure von dem Allergen gebunden. Sogar das zu den Steroiden gehörige Desoxycholat konnte an Ara h 8 binden. Dies legt den Schluss nahe, dass es nicht nur einen spezifischen Liganden bei dem Erdnussallergen gibt. Eher könnte Ara h 8 am Transport verschiedener Lipide beteiligt sein. Auch andere amphipathische Moleküle, wie z.B. Flavonoide wären als Liganden denkbar. Anhand der dreidimensionalen Strukturaufklärung wurde bewiesen, dass z.B. das Flavonoid Epicatechin theoretisch an Ara h 8.0101 binden kann (Hurlburt et al. 2013). Der physiologische Ligand, sofern es einen spezifischen Liganden gibt, wurde bisher jedoch noch nicht entdeckt.

Die Bindung von Lipid-Liganden könnte die Allergenität von Ara h 8 auch auf molekularer Ebene beeinflussen. So wurde erst kürzlich entdeckt, dass die Bindung des natürlichen Bet v 1-Liganden Quercetin-3-O-sophorosid (Flavonoid) zur Bindung eines Fe^{3+} -Ions führt. Dieses Eisen-Ion hat einen entscheidenden Einfluss auf die Allergenität des Birkenpollenallergens: in Abwesenheit von Fe^{3+} reifen TH-Zellen durch Bet v 1 zu TH_2 -Zellen aus, die zu Allergien führen können. Die Anwesenheit der Eisen-Moleküle verhindern hingegen eine TH_2 -Immunantwort (Roth-Walter et al. 2014). In der Molekülstruktur von Ara h 8.0101 wurde ebenfalls eine Metallionen-Bindungsstelle lokalisiert (Hurlburt et al. 2014). Allerdings wurden bisher noch keine Hinweise auf einen ähnlichen Mechanismus entdeckt, da der physiologische Ligand noch unbekannt ist. Da Ara h 8 Fettsäuren binden kann, ist auch eine Wechselwirkung mit Lipopolysacchariden (LPS) theoretisch möglich. Für das Bet v 1 existiert ein Modell für die Interaktion mit Phospholipid-Vesikeln (Mattila und Renkonen 2009), das auf Lipopolysaccharide übertragen werden kann (Kofler et al. 2012). Demzufolge könnten

Fettsäuren in die Öffnung $\epsilon 3$ über die p-loop Region in die hydrophobe Tasche gelangen, was eine Interaktion mit LPS ermöglicht. LPS sind starke Aktivatoren des angeborenen Immunsystems und können auch das erworbene Immunsystem induzieren und allergische Immunreaktionen beeinflussen (Akira et al. 2001). Aufgrund der starken Strukturähnlichkeit und der Ergebnisse, dass Ara h 8 Fettsäuren binden kann, ist es wahrscheinlich, dass eine ähnliche Funktion beim Ara h 8 möglich ist. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass die Bindung von Liganden beim Bet v 1 zu einer Stabilisierung der IgE-Epitope führte (Asam et al. 2014, Grutsch et al. 2014). Dies wurde durch eine Konformationsänderung verursacht, die der Ligand bei der Bindung in der hydrophoben Tasche auslöste. Damit geht auch eine stärkere Allergenität einher, da das Allergen dann besser an die IgE-Antikörper auf basophilen Granulozyten und Mastzellen binden kann. Aufgrund der starken Strukturähnlichkeit wäre es denkbar, dass der Lipidligand beim Ara h 8 ebenfalls zu einer Stabilisierung der IgE-Epitope führt und damit direkten Einfluss auf die IgE-Bindung ausübt. Die CD-Spektren von natürlichem Ara h 8 und rekombinantem, lipidfreiem Ara h 8 ließen jedenfalls Strukturunterschiede erkennen.

4.3 Defensin

Bei der Isolierung von natürlichem Ara h 8 wurde ein unbekanntes Erdnussprotein mit einem Molekulargewicht von 10 kDa isoliert. Die Herstellung des Erdnussextraktes war unter alkalischen Bedingungen durchgeführt worden und schloss eine Lipidextraktions-Methode (nach Bligh und Dyer) mit einem organischen Lösungsmittelgemisch (MeOH/Chloroform) ein. Dieses kleine Protein war in Extrakten, die mit wässrigen Puffern hergestellt wurden, nicht vorhanden. Demzufolge wies das Protein amphiphile Eigenschaften auf. Viele lipophile Proteine, darunter auch die Erdnussoleosine Ara h 10 und Ara h 11, sind IgE-reaktiv (Schwager et al. 2015). Einige stehen sogar in Zusammenhang mit schweren anaphylaktischen Symptomen (Zuidmeer-Jongejan et al. 2014, Leduc et al. 2006). Deshalb war es interessant, das Protein zu identifizieren. Die Auftrennung in der 2D-PAGE ergab zwei Proteinspots mit einem pI von 8,4 und 9,0. Über Proteinsequenzierung und EST-Datenbank konnten diese Proteine als Erdnussdefensin EE124955 bestimmt werden.

Defensine sind pflanzliche Abwehrproteine, die unter der Proteinfamilie PR (pathogenesis related) Nr. 12 zusammengefasst werden. Es handelt sich dabei um kleine kompakte Proteine, deren dreidimensionale Struktur durch vier Disulfidbrücken stabilisiert wird (Lay et al. 2003, Shiau et al. 2006). Das isolierte Erdnussdefensin besitzt acht charakteristische Cysteinreste, die zu der typischen kompakten Defensin-Struktur führen. Deshalb verfügt das

Erdnussdefensin vermutlich auch über die für Pflanzendefensine typischerweise hohe Thermostabilität (Picart et al. 2012). Obwohl für pflanzliche Defensine eine Abwehrfunktion gegen Bakterien und Pilze vermutet wird, konnte bisher nur die Wirksamkeit gegen Pilze nachgewiesen werden (Picart et al. 2012, Osborn et al. 1995). Die Aminosäuresequenzen von vielen pflanzlichen Defensinen enthalten ein sekretorisches Signalpeptid (Broekaert et al. 1997). Die bioinformatischen Untersuchungen der beiden Erdnussdefensin EST-Sequenzen (SignalP 4.1, www.cbs.dtu.dk) ergab eine Signalpeptid-Schnittstelle zwischen den Aminosäuren Nr. 21 und 22. Laut dem Computerprogramm TargetP 1.1 (www.cbs.dtu.dk) handelte es sich hierbei um ein sekretorisches Signalpeptid. Da außer der ER-Signalsequenz keine weiteren Sequenzen für den Transport in bestimmte Zellkompartimente vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, dass das Erdnussdefensin in den Extrazellularraum transportiert wird (Pfeffer und Rothman 1987). Da Signalsequenzen nach der Prozessierung abgespalten werden, begann die ansequenzierte Proteinsequenz hinter der Signalpeptid-Schnittstelle. Pflanzliche Defensine werden in zwei verschiedene Klassen unterteilt. Klasse I-Defensine verfügen über ein sekretorisches N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren (Picart et al. 2012, Lay und Anderson 2005). Bei den Klasse II-Defensinen ist zusätzlich noch eine saure C-terminale Prodomäne vorhanden, über deren Funktion bisher nur wenig bekannt ist (De Coninck et al. 2013, Lay und Anderson 2005). Demzufolge gehört das Erdnussdefensin zu den Klasse I-Pflanzendefensinen, da die C-terminale Prodomäne fehlt. Von anderen Klasse I-Defensinen ist bekannt, dass sie das Wachstum von pflanzenpathogenen Pilzen wie *Fusarium oxysporum* und *Botrytis cinerea* stark inhibieren (Osborn et al. 1995, Picart et al. 2012). Aber auch eine Wirkung gegen humanpathogene Pilze wie *Candida albicans* wurde beobachtet (Osborn et al. 1995), weshalb pflanzliche Defensine auch als Therapeutikum bei gestörter Abwehrfunktion der Haut (z.B. bei Diabetes oder Neurodermitis) und der damit häufig auftretenden Superinfektionen mit Hautkeimen interessant sind. Für die antimykotische Wirksamkeit ist die Bildung von Defensin-Dimeren scheinbar besonders wichtig (Song et al. 2011, Lay et al. 2012). In diesem Zusammenhang ist das Bindungsmotiv Arg36-Trp42-Arg40 für die Dimerbildung essentiell (Song et al. 2011). Diese Aminosäuren sind auch in der Defensinsequenz vorhanden. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass auch Dimere gebildet werden können. Zudem ergab die Suche nach ähnlichen Proteinen (BLAST-Search) in der Proteindatenbank UniProt viele pflanzliche Defensine, die Pilze bekämpfen. Demzufolge ist es gut möglich, dass auch das Erdnussdefensin gegen Pilze wirksam ist. Erdnussöl-haltige Hautpflegeprodukte wurden früher häufig und mit sehr guter Effektivität bei Neurodermitis eingesetzt. Da das Defensin lipophile Eigenschaften aufweist, ist es wahrscheinlich auch in Erdnussöl zu finden. Defensine besitzen eine starke Thermostabilität, da die dreidimensionale Struktur durch vier Disulfidbrücken stabilisiert wird (Picart et al. 2012). Die antimykotische Wirksamkeit konnte

bei rekombinant hergestellten Defensinen sogar bis zu einer Temperatur von 100 °C nachgewiesen werden (Picart et al. 2012). Demzufolge ist es nicht auszuschließen, dass intakte Moleküle auch in raffiniertem Erdnussöl zurückbleiben. Bisher wurde der gute Therapie-Effekt ausschließlich auf eine gute Hautdurchfeuchtung durch das Öl zurückgeführt. Möglicherweise ist jedoch auch das im Öl vorhandene Erdnussdefensin für die Heilung mitverantwortlich, indem das Wachstum humanpathogener Pilze gehemmt wird. Da das Erdnussdefensin sehr klein ist und zudem lipophile Eigenschaften aufweist, kann es möglicherweise bei gestörter Hautfunktion leicht durch die Hautbarriere gelangen. Deshalb ist es wichtig, zukünftig zu klären, ob das Protein allergene Eigenschaften aufweist. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit konnte die IgE-Reaktivität nicht ausreichend überprüft werden, da geeignete Patientenserum noch nicht zur Verfügung standen. Der Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der bisher bekannten Defensine mit IgE-Reaktivität wies jedoch bis auf die charakteristischen Cysteinreste keinerlei Homologien auf. Deshalb sind zumindest Kreuzreaktionen mit den bisher bekannten Defensin-Allergenen Gly m 2 (Soja), Amb a 4 (Ambrosia) und Art v 1 (Beifuß) sehr unwahrscheinlich.

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Isolierung des Erdnussallergens Ara h 8 entwickelt. Hierdurch konnten die biologische Funktionsweise und die molekularen Eigenschaften des Ara h 8, auch im Hinblick auf Lipidbindungen, untersucht werden.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ara h 8 verschiedene Lipide binden kann. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass das Allergen neben der Funktion als Abwehrprotein auch eine Rolle beim pflanzlichen Lipidtransport spielt. Jedoch konnte der physiologische Ligand nicht identifiziert werden, obwohl die Ergebnisse stark darauf hinwiesen, dass das natürliche Ara h 8 an einen Lipidliganden gebunden vorliegt. Um die genauere physiologische Funktion aufzuklären, ist es nötig in weiterführenden Untersuchungen den natürlichen Lipidliganden zu identifizieren. Ferner gilt es zu untersuchen, ob die Lipide die Passage durch die Darmschleimhaut erleichtern können und ob dadurch die Allergenität verändert wird. Hierzu ist es nötig, an einem physiologischen Darmmodell aufzuklären, ob unfragmentiertes Ara h 8 in Verbindung mit Lipiden die Epithelbarriere der Darmschleimhaut überwinden kann. Diese Erkenntnisse könnten einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, die Mechanismen der Allergenaufnahme im menschlichen Darm zu verstehen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass die Stabilität des Erdnussallergens Ara h 8 durch Lipidliganden erhöht wird. Dadurch sind theoretisch stärkere allergische Reaktionen möglich, da die Allergene eine längere Verweildauer im Darm haben. Bei dem Ara h 8 wurden jedenfalls starke allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock in Einzelfällen beschrieben (Glaumann et al. 2014, Glaumann et al. 2015). In weiteren Studien wäre zu klären, ob dies auch auf andere Allergene zutrifft. In diesem Zusammenhang sind in erster Linie die Allergene aus anderen Hülsenfrüchtlern interessant, da diese mit der Erdnuss artverwandt sind. Durch das Bet v 1-homologe Allergen aus der Sojabohne, dem Gly m 4, wurden ebenfalls anaphylaktische Reaktionen ausgelöst (Kleine-Tebbe et al. 2002). Deshalb wäre eine Untersuchung dieses Allergens an erster Stelle von Interesse.

Bei der Aufreinigung von Ara h 8 wurde zugleich erstmalig ein neues Erdnussallergen, das Defensin Ara h 13.0102, mit isoliert. Die Entdeckung der hydrophoben Eigenschaften der Erdnussallergene Ara h 8 und Erdnussdefensin erfordern neue Überlegungen, auch Erdnussöle oder Erdnussöl-haltige Formulierungen auf diese Allergene zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Unter den Nahrungsmittelallergenen sind Erdnüsse und Baumnüsse für die Mehrzahl der schweren allergischen Reaktionen, die zum Teil lebensbedrohlich sind, verantwortlich. Für eine sichere Allergiediagnose mit rekombinant hergestellten Einzelallergenen ist es notwendig, die Erdnussallergene genau zu charakterisieren. Ziel dieser Arbeit war es, das Bet v 1-homologe Erdnussallergen Ara h 8 zu untersuchen. Ara h 8 ist der Hauptauslöser von Allergiesymptomen bei der Birkenpollen-assoziierten Erdnussallergie.

Obwohl Ara h 8 zu den Minorallergenen zählt, können durch Ara h 8 in Einzelfällen starke, lebensbedrohliche Reaktionen ausgelöst werden. Dies ist ungewöhnlich, da durch Bet v 1-homologe Allergene in der Regel nur schwache Symptome verursacht werden. Um dieses Phänomen aufzuklären, sollten die molekularen Eigenschaften und die Funktionsweise des Erdnussallergens Ara h 8 untersucht werden. Das Protein konnte bisher nicht charakterisiert werden, da zahlreiche Versuche, das Allergen mit den verschiedensten Methoden zu isolieren, scheiterten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Ara h 8-Isolierung erstmalig auf der Basis einer lipophilen Extraktionsmethode entwickelt. Hierdurch konnte die Ara h 8-Ausbeute soweit erhöht werden, dass erstmalig das natürliche Allergen untersucht werden konnte.

Ara h 8 gehört zur PR-10 Proteinfamilie, die zu den pflanzlichen Abwehrproteinen zählen und deren genaue Funktionsweise bisher noch ungeklärt ist. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Ara h 8 eine Ribonukleasefunktion besitzt, die wahrscheinlich mit der Abwehrfunktion gegen Pilze in Zusammenhang steht. Diese Ribonukleaseaktivität wurde durch die Herstellung von zwei gentechnisch veränderten Ara h 8-Proteinen mit abgeschwächter Enzymfunktion abgesichert. Mit den Ara h 8-Mutanten konnten außerdem die funktionellen Bereiche für die Ribonukleasefunktion identifiziert werden. So sind die p-loop Region und die C-terminale Helix für die RNase-Aktivität von Ara h 8 essentiell. Durch Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ANS konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Ara h 8 verschiedene Lipide binden kann und vermutlich eine Rolle beim Lipidtransport spielt.

Desweiteren wurde die proteolytische Stabilität und die Thermostabilität des Ara h 8 untersucht, da diese beiden Faktoren ausschlaggebend für die Allergenität von Nahrungsmittelallergenen sind. Anders als bei den meisten Bet v 1-homologen Allergenen üblich, wies natürliches Ara h 8 eine hohe Proteaseresistenz auf. Demzufolge ist die hohe Stabilität wahr-

scheinlich für die starken Allergiesymptome mitverantwortlich, die für Bet v 1-homologe Allergene untypisch sind. Rekombinant hergestelltes Allergen wurde hingegen leicht durch die Verdauenzymen abgebaut. Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie zeigten außerdem, dass natürliches Ara h 8 im Vergleich zu rekombinantem Ara h 8 eine höhere Thermostabilität aufwies. Verdau-Experimente mit rekombinantem Ara h 8 und Ölsäure ergaben, dass Lipide einen stabilisierenden Effekt auf das Erdnussallergen haben. Die Stabilität gegenüber Proteasen des menschlichen Verdauungstraktes ist ein zentrales Merkmal für die Symptomstärke bei Nahrungsmittelallergenen, da stabile Allergene unfragmentiert in die Blutbahn gelangen und dort allergische Reaktionen auslösen können. Außerdem führt eine höhere Stabilität auch zu einer längeren Verweildauer im Darm, was auch mit stärkeren Symptomen einhergeht. Zusammen genommen mit den Ergebnissen, dass Ara h 8 an Lipide binden kann, deuteten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass ein physiologischer Lipidligand beim natürlichen Ara h 8 für die Stabilität verantwortlich war. Somit konnte mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit anhand des Erdnussallergens Ara h 8 gezeigt werden, dass Lipide die Allergenität von Nahrungsmittelallergenen verstärken können.

Als Mitglied der PR-10 Proteinfamilie gehört Ara h 8 zu einer Reihe von Abwehrproteinen, deren Expression durch Infektionen mit Pflanzenpathogenen oder ähnlichen Stressfaktoren induziert werden können. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ara h 8-Gehalt in Erdnüssen durch eine Infektion mit dem Bodenpilz *Aspergillus niger* steigt. Dies könnte für bestimmte Patienten ein stärkeres Risiko darstellen; so können Erdnüsse mit einem erhöhten Ara h 8-Gehalt ein Risiko für Birkenpollenallergiker darstellen, die in Nordeuropa stark vertreten sind. Weiterhin konnte die Abwehrfunktion über die verstärkte Expression von Ara h 8 nach der Infektion mit dem Bodenpilz *Aspergillus niger* gezeigt werden.

Neben Ara h 8 wurde mithilfe der neu entwickelten Isolierungsmethode auch ein bisher unbekanntes Erdnussprotein < 10 kDa mit aufgereinigt. Die Untersuchung der Proteinsequenz und ein Homologie-Abgleich mit der EST-Datenbank ("expressed sequence tags") zeigte, dass es sich dabei um das Erdnuss-Defensin EE 124955 handelte. Somit wurde ein neues Allergen (Ara h 13.0102) isoliert, wie sich später herausstellte. Da Defensine kationische, amphiphile pflanzliche Abwehrproteine mit geringem Molekulargewicht, hoher Stabilität, und hydrophoben Eigenschaften sind, kann das Erdnussdefensin vermutlich leicht die Epithelbarriere der Haut durchdringen.

7 Summary

Among food allergens peanuts and tree nuts account for the majority of life-threatening or fatal reactions to foods. The use of recombinant allergens in component-resolved diagnostic tests is a safe tool for the diagnosis of peanut allergy. Therefore, the detailed analysis of the molecular characteristics of the single allergens is essential. The aim of this study was to investigate the molecular structure of the Bet v 1-homologous peanut allergen Ara h 8. Ara h 8 plays a major role in birch pollen-associated peanut allergy.

Although Ara h 8 is a minor allergen, fatal and life-threatening symptoms were described in special cases. Severe allergic reactions to Bet v 1-homologous food allergens are very much uncommon. In order to explain this phenomenon, the biological function and molecular properties of the peanut allergen Ara h 8 should be examined in this thesis. Because numerous isolation and purification methods for Ara h 8 failed, the protein remained uncharacterized so far. In this thesis a new method for the isolation and purification of the allergen Ara h 8 from lipophilic peanut extract was developed for the first time. This yields to increased Ara h 8 contents in peanut extract, thereby leading to a sufficient amount of purified natural Ara h 8 for the studies of the molecular characteristics and biological function.

Ara h 8 belongs to the PR-10 protein family, a family of plant defense proteins whose exact biological functions is still unclear. The investigations of the physiological role of Ara h 8 in this work clearly demonstrated a ribonuclease function that may contribute to the defense mechanism against fungi. These ribonuclease activity was confirmed by the generation of two genetically modified Ara h 8 proteins with reduced enzyme function. By the use of the Ara h 8 mutants, the functional protein regions for the ribonuclease activity have been elucidated as well. Thus, the p-loop region and the C-terminal helix of Ara h 8 are essential for the enzyme function. Besides the plant defense function, the binding of lipids to hydrophobic protein regions of Ara h 8 have been proven for the first time within this work by the molecular probe ANS. Therefore, Ara h 8 may also play a role in the lipid transport system of peanuts.

Furthermore, the thermo and proteolytic stability of Ara h 8 has been examined within this thesis, as these factors are crucial for the allergenicity of food allergens. Unlike most Bet v 1-homologous allergens natural Ara h 8 was protease resistant. Hence, the high stability is probably partly responsible for the strong allergy symptoms that are untypical for Bet v 1-homologous allergens. Recombinant Ara h 8 in contrast was easily degraded by the

gastrointestinal enzymes. Furthermore, investigations on the secondary structure by CD spectroscopy revealed a higher heat stability for the natural protein compared to recombinant Ara h 8. Digestion experiments of recombinant Ara h 8 with oleic acid revealed that lipids have a stabilizing effect in respect to the proteolytic degradation of the peanut allergen. The stability plays a major role for the allergenicity of food allergens due to the fact that stable food allergens are not digested. Based on that unfragmented allergens will be absorbed into the blood and will cause severe allergic reactions. Moreover, a higher stability results in a longer residence time in the intestine, which also goes hand in hand with stronger symptoms. Taken together with the results that Ara h 8 is able to bind to lipids, these findings strongly indicate that the stability of Ara h 8 could be based on the binding of a physiological lipid ligand. Thus, with the results of this thesis based on the peanut allergen Ara h 8, it could be demonstrated that lipids can increase the allergenicity of food allergens.

As a member of the PR-10 protein family, Ara h 8 may be induced by pathogen infections or related stresses. Within this thesis it was shown that the Ara h 8 concentration in peanuts increases with *Aspergillus niger* infection. This may correlate with a higher allergy risk for specific patients; thus peanuts with increased Ara h 8 concentrations may bear a higher risk for birch pollen allergic patients, who are widespread in Northern Europe. Furthermore, it has been possible to demonstrate the defense function of Ara h 8 via the increased Ara h 8 expression after infection with the soil fungus *Aspergillus niger*.

With the Ara h 8 purification procedure, a new peanut protein < 10 kDa has been isolated at the same time. The analysis of the protein sequence revealed that the protein belongs to the defensin protein family. A homology search with the EST ("expressed sequence tags") database identified the protein as the peanut defensin EE 124955. As it turned out later, therefore a new peanut allergen (Ara h 13.0102) has been isolated for the first time. Since defensins are very stable and small amphiphilic cationic plant defense proteins, the peanut defensin may be able to cross the epithelial barrier easily.

8 Literaturverzeichnis

Aalberse, R.C. (2000). Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 228-238.

Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675-680.

Anagnostou, K., Clark, A., King, Y., Islam, S., Deighton, J., Ewan, P. (2011). Efficacy and safety of high-dose peanut oral immunotherapy with factors predicting outcome. *Clin. Exp. Allergy* 41, 1273-1281.

Anagnostou, K., Clark, A. (2014). The management of peanut allergy. *Arch. Dis. Child.* 2014 Aug 25. pii: archdischild-2014-306152. doi: 10.1136/archdischild-2014-306152. [Epub ahead of print]

Arkwright, P.D., Summers, C.W., Riley, B.J., Alsediq, N., Pumphrey, R.S.H. (2013). IgE Sensitization to the nonspecific Lipid-Transfer Protein Ara h 9 and Peanut-associated Bronchospasm. *BioMed Research International Volume 2013, Article ID 746507, 9 pages.*

Asam, C., Batista, A.L., Paula, V.S., Almeida, F.C.L., Aglas, L., Kitzmüller, C., Bohle, B., Ebner, C., Ferreira, F., Wallner, M., Valente A.P. (2014). Bet v 1 - a Trojan horse for small ligands boosting allergic sensitization ? *Clin. Exp. Allergy* 44, 1083-1093.

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

Asero, R., Antonicelli, L. (2010). Does sensitization to foods in adults occur always in the gut? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 154, 6-14.

Astier, C., Morisset, M., Roitel, O., Codreanu, F., Jaquenot, S., Franck, P., Ogier, V., Petit, N., Proust, B., Moneret-Vautrin, D.A., Burks, A.W., Bihain, B., Sampson, H.A., Kanny, G. (2006). Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 250-256.

Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.* 14, 1269-1273.

Baek, C.H., Bae, Y.J., Cho, Y.S., Moon, H.B., Kim, T.B. (2010). Food-dependent exercise-induced anaphylaxis in the celery-mugwort-birch-spice-syndrome. *Allergy* 65 (6), 792-793.

Bantignies, B., Seguin, J., Muzac, I., Dedaldechamp, F., Gulick, P., Ibrahim, R. (2000). Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol. Biol.* 42, 871-881.

Becker, W-M., Jappe, U. (2014). Peanut Allergens. *History of Allergy. Chem. Immunol. Allergy.* Karger, Basel. 100, 256-267.

Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.

- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1995).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8), 911-917.
- Bock, S.A., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A. (2001).** Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 (1), 191-193.
- Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y.D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L., van Ree, R., Werfel, T., Ebner, C. (2006).** Cooking birch-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity *in vitro* and *in vivo*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118 (1), 242-249.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breiteneder, H., Ferreira, F., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., 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., Ebner, C. (2000).** Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (1), 27-36.
- Breiteneder, H., Radauer, C. (2004).** A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 821-830.
- Breiteneder, H., Mills, C. (2005),** Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (1), 14-23.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G., Osborn, R.W. (1997).** RW: Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 16 (3), 297-323.
- Brüske, I., Standl, M., Weidinger, S., Klümper, C., Hoffmann, B., Schaaf, B., Herbarth, O., Lehmann, I., von Berg, A., Berdel, D., Bauer, C.P., Koletzko, S., Heinrich, J. & for the GINIplus and LISApplus Study Groups (2013).** Epidemiology of urticaria in infants and young children in Germany - Results from the German LISApplus and GINIplus Birth Cohort Studies. *Pediatric Allergy and Immunology* 25, 36-42.
- Bublin, M., Breiteneder, H. (2013).** Cross-Reactivity of Peanut Allergens. *Curr. Allergy Asthma Report* 14, 426 (1-12).
- Bublin, M., Kostadinova, M., Radauer, C., Hafner, C., Szepfalusi, Z., Varga, E.M., Maleki, S.J., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H. (2013).** IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and the nonhomologous peanut allergens Ara h 1 and Ara h 3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (1), 118-124.
- Bufe, A., Spangfort, M.D., Kahlert, H., Schlaak, M., Becker, W-M. (1996).** The major Birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* 199, 413-415.
- Burks, W., Sampson, H.A., Bannon, G.A. (1998).** Peanut allergens. *Allergy* 53, 725-730.
- Cabanos, C., Tandang-Silvas, M.R., Odijk, V., Brostedt, P., Tanaka, A., Utsumi, S., Maruyama, M. (2010).** Expression, purification, cross-reactivity and homology modeling of peanut profilin. *Protein Expr. Purif.* 73 (1), 36-45.

- Chadha, P., Das, R.H. (2006).** A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta* 225, 213-222.
- Clark, A.T., Islam, S., King, Y., Deighton, J., Anagnostou, K., Ewan, P.W. (2009).** Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy. *Allergy* 64 (8), 1218-1220.
- D'Andréa, S., Jolivet, P., Boulard, C., Larré, C., Froissard, M., Chardot, T. (2007).** Selective one-step extraction of *Arabidopsis thaliana* seed oleosins using organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* 55 (24), 10008-15.
- De Coninck, B., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2013).** Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol. Rev.* 26, 109-120.
- Dreborg, S (1988).** Food allergy in pollen-sensitive patients. *Ann. Allergy* 61, 41-46.
- Edman, P. (1949).** A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 22 (3), 475.
- Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberg, H.J., 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., Hirtenlehner, K., Briza, P., Breiteneder, H., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Ebner, C. (1997).** Isoforms of atopic allergens with reduced allergenicity but conserved T cell antigenicity: possible use for specific immunotherapy. *Int. Arch. Immunol.* 113, 125-127.
- Fleischer, D.M., Conover-Walker, M.K., Christie, L., Burks, A.W., Wood, R.A. (2003).** The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 183-189.
- Fleischer, D.M., Burks, A.W., Veckery, B.P., Scurlock, A.M., Wood, R.A., Jones, S.M., Sicherer S.H, Liu A.H, Stablein D., Henning A.K., Mayer L., Lindblad R., Plaut M., Sampson H.A.; Consortium of Food Allergy Research (2013).** Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 119-127.
- Flinterman, A.E., van Hoffen, E., den Hartog Jger, C.F., Koppelman, S., Pasmans, S.G., Hoekstra, M.O., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C., Knol, E.F. (2007).** Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h 2 and Ara h 6, which remains stable over time. *Clin. Exp. Allergy* 37 (8), 1221-1228.
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B., Vieths, S., Bohle, B. (2011).** Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG₄ antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 616-622.
- Glaumann, S., Nopp, A., Johansson, S.G.O., Borres, M.P., Lilja, G., Nilsson, C. (2014).** Anaphylaxis to peanuts in a 16-year-old girl with birch pollen allergy and monosensitization to Ara h 8. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 1 (6), 698-699.
- Glaumann, S., Nilsson, C., Johansson, S.G., Asarnoj, A., Wickman, M., Borres, M.P., Nopp, A. (2015).** Evaluation of basophil allergen threshold sensitivity (CD-sens) to peanut

and Ara h 8 in children IgE-sensitized to Ara h 8. *Clin. Mol. Allergy* 13(1):5. doi: 10.1186/s12948-014-0007-3. eCollection 2015.

Graham-Rowe, D. (2011). When Allergy goes west. *Nature* 479, 2-4.

Gruber, P., Becker, W.M., 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.

Gruijthuijsen, Y.K., Grieshuber, I., Stöcklinger, A., Tischler, U., Fehrenbach, T., Weller, M.G., Vogel, L., Vieths, S., Pöschl, U., Duschl, A. (2006). Nitration enhances the allergenic potential of proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 141, 265-275.

Grundy, J. Matthews, S., Bateman, B., Dean, T., Arshad, S.H. (2002). Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 784-789.

Grutsch, S., Fuchs, J., Freier, R., Kofler, S., Bibi, M., Asam, C., Wallner, M., Ferreira, F., Brandstetter, H., Liedl, K.R., Tollinger, M. (2014). Ligand binding modulates the structural dynamics and compactness of the major birch pollen allergen. *Biophys. Journal* 107, 2972-2981.

Guo, B., Chen, X., Dang, P., Scully, B.T., Liang, X., Holbrook, C.C., Yu, J., Culbreath, A. (2008). Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. *BMC Developmental Biology* 8 (12). <http://www.biomedcentral.com/147-213X/8/12>.

Gupta, R.S., Springston, E.E., Warrier, M.R., Smith, B., Kumar, R., Pongracic, J. (2011). The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics.* 128:e9-17.

Haftenberger, M., Laußmann, D., Ellert, U., Kalcklösch, M., Langen, U., Schlaud, M., Schmitz, R., Thamm, M. (2013). Prävalenz von Sensibilisierungen gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt* 2013-56, 687-697.

Hancock, K., Tsang, V.C. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133, 157-162.

Hebling, C.M., Ross, M.M., Callahan, J.H., McFarland, M.A. (2012). Size-selective fractionation and visual mapping of allergen protein chemistry in *Arachis hypogaea*. *J. Proteome Res.* 11 (11), 5384-5395.

Hourihane, J.B., Kilburn, S.A., Nordlee, J.A., Hefle, S.L., Taylor, S.L., 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.

Hourihane, J.O., Aiken, R., Briggs, R., Gudgeon, L.A., Grimshaw, K.E., DunnGalvin, A. et al. (2007). The impact of government advice to pregnant mothers regarding peanut avoidance on the prevalence of peanut allergy in the United Kingdom children at school entry. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1197-1202.

Huang, A.H. (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110, 1055-1061.

- Ipsen, H., Løwenstein, H. (1983).** Isolation and characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 150-159.
- Jain, S., Srivastava, S., Sarin, A.B., Kav, N.V. (2006).** Proteomics reveals elevated levels of PR-10 proteins in saline-tolerant peanut (*Arachis hypogaea*) calli. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 253-259.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002).** Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 5. Auflage.
- Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A.T., Ebner, H., Breitenbach, M. Scheiner, O., Kraft, D. (1989).** IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 44, 385-395.
- Javaloyes, G., Goikoetxea, M.J., Garcia Nunez, I., Sanz, M.L., Blanca, M., Scheurer, S., Vieths, S., Ferrer, M. (2012).** Performance of different in vitro techniques in the molecular diagnosis of peanut allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 22, 508-513.
- Jensen-Jarolim, E., Wiedermann, U., Ganglberger, E., Zurcher, A., Atadler, B.M., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Breiteneder, H. (1999).** Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB J.* 13, 1586-1592.
- Kim, E.H., Bird, J.A., Kulis, M., Laubach, S., Pons, L., Shreffler, W., Steele, P., Kamilaris, J., Vickery, B., Burks, A.W. (2011).** Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Clinical and immunologic evidence of desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 640-646.
- Kinet, J.P. (1999).** The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Ann. Rev. Immunol.* 17, 931-972.
- Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M., Becker, W.M. (1999).** Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119, 931-972.
- Kleber-Janke, T., Cramer, R., Scheurer, S., Vieths, S., Becker, W.M. (2001).** Patient-tailored cloning of allergens by phage display: peanut (*Arachis hypogaea*) profilin, a food allergen derived from a rare mRNA. *J. chromatogr. B. Biomed. Sci., Appl.* 756 (1-2), 295-305.
- Kleine-Tebbe, J., Wangorsch, A., Vogel, L., Crowell, D.N., Haustein, U.F., Vieths, S. (2002).** Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110 (5), 797-804.
- Klemans, R.J., Knol, E.F., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C. (2014).** The diagnostic accuracy of specific IgE To Ara h 6 in adults is as good as Ara h 2. *Allergy* 69 (8), 1112-1114.
- Kofler, S., Asam, C., Eckhard, U., Wallner, M., Ferreira, F., Brandstetter, H. (2012).** Crystallographically mapped ligand binding differs in high and low IgE binding Isoforms of Birch Pollen Allergen Bet v 1. *J. Mol. Biol.* 422 (1), 109-123.
- Kofler, S., Ackaert, C., Samonig, M., Asam, C., Briza, P., Horejs-Hoeck, J., Cabrele, C., Ferreira, F., Duschl, A., Huber, C., Brandstetter, H. (2014).** Stabilization of dimeric birch pollen allergen Bet v 1 impacts its immunological properties. *J. Biol. Chem.* 289, 540-551.

- Koppelman, S.J., Vlooswijk R.A., Knippels, L.M., Hessing, M., Knol, E.F., van Reijssen, F.C., 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 (2), 132-137.
- Kortekangas-Savolainen, O., Dasollainen, J., Einarsson, R. (1993).** Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study. *Clin. Exp. Allergy* 23, 587-590.
- Kosma, P. Sjölander, S., Landgren, E., Borres, M.P., Hedlin, G. (2011).** Severe reactions after the intake of soy drink in birch pollen-allergic children sensitized to Gly m 4. *Acta Paediatr.* 100 (2), 305-306.
- Krause S., Reese, G., Randow, S., Zennaro, D., Quaratino, D., Palazzo, P., Ciardiello, M.A., Petersen, A., Becker, W.M., Mari, A. (2009).** Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 124, 771-778.
- Kreis, M., Forde, B.G., Rahmann, S., Mifflin, B.J., 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).** Electrophoretic transfer 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.
- Lauer, I., Dueringer, N., Pokoj, S., Rehm, S., Zoccatelli, G., Reese, G., Miguel-Moncin, M.S., Cistero-Bahima, A., Enrique, E., Lidholm, J., Vieths, S., Scheurer, S. (2009).** The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut. *Clin. Exp. Allergy* 39 (9), 1427-1437.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680-685.
- Larsen, J.N., Stromann, P., Ipsen, H. (1992).** PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carbinus betulus*, hornbeam. *Mol. Immunol.* 29, 703-711.
- Langen, U., Schmitz, R., Steppuhn, H. (2013).** Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt* 56, 698-706.
- Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003).** The threedimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *nicotiana alata* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *J. Mol. Biol.* 325 (1), 175-188.
- Lay, F.T., Anderson, M.A. (2005).** Defensins-components of the innate immune system in plants. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 6 (1), 85-101.
- Lay, F.T., Mills, G.D., Poon, I.K.H., Cowieson, N.P., Kirby, N., Baxter, A.A. (2012).** Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 287, 19961-19972.

- Leary, J.J., Brigati, D.J., 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. USA* 80, 4045-4049.
- Leduc, V., Monoret-Vautrin, D.A., Tzen, J.T., Morisset, M., Guerin, L., Kanny, G. (2006).** Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy* 61 (3), 349-356.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K.M. (2003).** Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 52, 103-120.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K.M. (2006).** The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol. and Mol. Plant Pathology* 68, 3-13.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M.A., Perez-Iratxeta, C. (2012).** Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins* 80, 374-381.
- Maizels R.M. (2005).** Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulations. *Current Opinion in Immunology* 17, 656-661.
- Maleki, S.J., Chung, S.Y., Champagne, E.T., 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., 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. (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.
- Marsh, J., Rigby, N., Wellner, K., Reese, G., Knulst, A., Allerdaas, J., van Ree, R., Radauer, C., Lovegrove, A., Sancho, A., Mills, C., Vieths, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Shewry, P. (2008).** Purification and characterisation of a panel of peanut allergens suitable for use in allergy diagnosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1-14.
- Mattila, K., Renkonen, R. (2009).** Modelling of Bet v 1 binding to lipids. *Scand. J. Immunol.* 70, 116-124.
- Mellanby, J., Woolley, V.J. (1914).** The ferments of the pancreas. Part IV. Steapsin. *J. Physiol.* 48 (4), 287-302.
- 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., van Ree, R. (2004).** Ara h 8, a Bet v1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (6), 1410-1417.
- Mittag, D., Vieths, S., Vogel, L., Becker, W-M., Rihs, H.P., Helbling, A., Wüthrich, B., 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 (1), 148-154.

- Mogensen, J.E., Wimmer, R., Larsen, J.N., Spangfort, M.D., and 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.
- Moreno, F.J., Maldonado, B.M., Wellner, N., Mills, E.N. (2005).** Thermostability and in vitro digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (*Sesame indicum L.*). *Biochim. Biophys. Acta* 1752, 142-153.
- Moreno F.J. (2007).** Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomed. Pharmacother.* 61 (1), 50-60.
- Moverare, R., Westritschnig, K., Svensson, M., Hayek, B., Bende, M., Pauli, G., Sorva, R., Haahtela, T., Valenta, R., Elfman, L. (2002).** Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six european populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 325-335.
- Mullins, R.J., James, H., Platts-Mills, T.A.E., Commins, S. (2012).** The relationship between red meat allergy and sensitization to gelatin and galactose-alpha-1,3-galactose. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (5), 1334-1342.
- Neudecker, P., Lehmann, K., Nerkamp, J., Haase, T., Wangorsch, A., Fötisch, K., Hoffmann, S., Rösch, P., Vieths, S., Scheurer, S. (2003).** Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *Biochem. J.* 376, 97-107.
- Nicolaou, N, Poorafshar, M., Murray, C., Simpson, A., Winell, H., Kerry, G., Härlin, A., Woodcock, A., Ahlstedt, S., Custovic, A. , (2010).** Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (1), 191-197.
- Niggemann B., Schmitz, R., Schlaud M. (2011).** The high prevalence of peanut sensitization in childhood is due to cross-reactivity to pollen. *Allergy* 66, 979-986.
- Osborn, R.W., De Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S.B., Broekaert, W.F. (1995).** Isolation and characterization of plant defensins from seeds of asteraceae, fabaceae, hippocastanaceae and saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368, 257-262.
- Özcan, M.M. (2010).** Some nutritional characteristics of kernel and oil of peanut (*Arachis hypogaea L.*). *J. Oleo. Sci.* 59, 1-5.
- Pali-Schöll, I., Herzog, R., Wallmann, J., Szalai, K., Brunner, R., Lukschal, A., Karagiannis, P., Diesner, S.C., Jensen-Jarolim, E. (2010).** Antacids and dietary supplements with an influence on the gastric pH increase the risk for food sensitization. *Clin. Exp. Allergy* 40 (7), 1091-1098.
- Petersen, A. Rennert, S., Kull, S., Becker, W-M., Notbohm, H., Goldmann, T., Jappe, U. (2014).** Roasting and lipid binding provide allergenic and proteolytic stability to the peanut allergen Ara h 8. *Biol. Chem.* 395 (2), 239-250.

- Petersen, A., Rennert, S., Böttger, M., Becker, W-M., Krause, S., Gutschmann, T., Lindner, B., Jappe, U. (2012).** Defensin: a novel allergen in peanuts? European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Congress 16-20 June in Geneva. *Allergy* 67 (Suppl 96), 374.
- Petersen, A., Kull, S., Rennert, S., Becker, W-M., Krause, S., Ernst, M., Gutschmann, T., Bauer, J., Lindner, B., Jappe, U. (2015).** Peanut defensins: novel allergens isolated from lipophilic peanut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (5), 1295-1301.
- Pfeffer, S.R., Rothman, J.E. (1987).** Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 829-852.
- Picart, P., Pirttilä, A-M., Raventos, D., Kristensen, H-H., Sahl, H-G. (2012).** Identification of defensin-encoding genes of *Picea glauca*: characterization of PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. *BMC Plant Biology*, 12: 180, www.biomedcentral.com/1471-2229/12/180.
- Pinto, M.P., Ricardo, C.P. (1995).** *Lupinus albus* L. pathogenesis-related proteins that show similarity to PR-10 proteins. *Plant Physiol.* 109, 1345-1351.
- Pons, L., Chery, C., Romano, A., Namour, F., Artesani, M.C., Gueant, J.L. (2002).** The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy* 57, 88-93.
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. (2008).** Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (4), 847-852.
- Rammensee, H.G., Falk, K., Rotzschke, O. (1993).** MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 35-44.
- Reuter, A., Fortunato, D., Garaffo, L.P., Napolitano, L., Scheurer, S., Giuffrida, M.G., Vieths, S., 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.
- Riecken, S., Lindner, B., Petersen, A., Jappe, U., 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.* 389, 415-423.
- Riedler, J., Braun-Fahrländer, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., von Mutius, E., ALEX Study Team. (2001).** Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358 (9288), 1129-1133.
- Ring, J., Bachert, C., Bauer, C.P., Czech, W. (2010).** *Allergie in Deutschland*. Urban & Vogel, München.
- Robert N. Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thevenot, P., Boulay, M., Buffard, D. (2001).** Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 249-261.

- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D. (1995).** Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin (evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family). *J. Biol. Chem.* 270 (37), 21539-21544.
- Roth-Walter, F., Gomez-Casado, C., Pacios, L., Mothes-Luksch, N., Roth, G.A., Singer, J., Diaz-Perales, A., Jensen-Jarolim, E. (2014).** Bet v 1 from birch pollen is a lipocalin-like protein acting as an allergen only when devoid of iron by promoting Th2 lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 289 (25), 17416-17421.
- Sagaram, U.S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T.J., Shah, D.M. (2011).** Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 2011 (6), e18550.
- Saloga, J., Klimek, L., Buhl, R., Mann, W., Knop, J. (2006).** *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis.* Schattauer-Verlag, Stuttgart.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour. New York.
- Sampson, H.A. (2004).** Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 805-819.
- Saraste, M., Sibald, P.R., Wittinghofer, A. (1990).** The p-loop: a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biol. Sci.* 15, 430-434.
- Schenk, M.F., Gilissen, L.-J., Esselink, G.D., 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.
- Schenck, M.F., Cordewener, J.H., America, A.H., Van't Westende, W.P., Smulders, M.J., Gilissen, L.J. (2009).** Characterization of PR-10 genes from eight betula species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. *BMC Plant. Biol.* 9, 24.
- Schimek, E.M., Zwölfer, B., Briza, P., Jahn-Schmid, B., Vogel, L., Vieths, S., Ebner, C., Bohle, B. (2005).** Gastrointestinal digestion of Bet v 1-homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116 (6), 1327-1333.
- Schmidt, H., Krause, S., Gelhaus, C., Petersen, A., Janssen, O., Becker, W.-M. (2010).** Detection and structural characterization of natural Ara h 7, the third peanut allergen of the 2S albumin family. *J. Proteome Res.* 9 (7), 3701-3709.
- Schöll, I., Kalkura, N., Shedziankova, Y., Bergmann, A., Verdino, P., Knittelfelder, R., Kopp, T., Hantusch, B., Betzel, C., Dierks, K., Scheiner, O., Boltz-Nitulescu, G., Keller, W., Jensen-Jarolim, E. (2005).** Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice. *Journal of Immunology* 175, 6645-6650.
- Schwager, C., Kull, S., Krause, S., Schocker, F., Petersen, A., Becker, W.-M., Jappe, U. (2015).** Development of a novel strategy to isolate lipophilic allergens (oleoins) from peanuts. *PLoS ONE* 10 (4): e0123419.doi:10.1371/journal.pone.0123419.
- Sebei, K., Gnouma, A., Herchi, W., Sakouhi, F., Boukhchina, S. (2013).** Lipids, proteins, phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of seeds of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) cultivated in Tunisia. *Biol. Res.* 46 (3), 257-263.

- Seutter von Loetzen, C., Hoffmann, T., Hartl, M.J., Schweimer, K., Schwab, W., Rösch, P., Hartl-Spiegelhauer, O. (2014).** Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: identification of the physiological ligand. *Biochem. J.* 457 (3), 379-390.
- Shek, L.P., Cabrera-Morales, E.A., Soh, S.E., Gerez, I. (2010).** A population-based questionnaire survey on the prevalence of peanut, tree nut, and shellfish allergy in 2 Asian populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 324-331.
- Shewry, P.R., Jenkins, J., Beaudoin, F., Mills, C., Gilissen, L.J.E.J., Wichers, H.J., Savelkoul, H.F.J., Bogers, R.J. (2006).** Plant protein families as a basis for predicting the allergenicity of food proteins. In: *Allergy Matters: New Approaches to Allergy Prevention and Management.* Springer, Dordrecht. 39-44.
- Shreffler, W.G., Beyer, K., Chu, T.H., Burks, A.W., Sampson, H.A. (2004).** Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (4), 776-782.
- Shiau, Y.S., Horng, S.B., Chen, C.S., Huang, P.T., Lin, C., Hsueh, Y.C., Lou, K.L. (2006).** Structural analysis of the unique insecticidal activity of novel mungbean defensin VrD1 reveals possibility of homoplasy evolution between plant defensins and scorpion neurotoxins. *J. Mol. Recognit.* 19, 441-450.
- Shiratori, T., Sato, A., Fukuzawa, M., Kondo, N., Tanno, S. (2015).** Severe Dextran-induced anaphylactic shock during induction of hypertension-hypervolemia-hemodilution therapy following subarachnoid hemorrhage. *Case Rep. Crit. Care Art.* ID 967560,5. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/967560>.
- Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A. (2003).** Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial 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., Wood, R.A. (2001).** The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 367-374.
- Smith, M., Jäger, S., Berger, U., Sikoparija, B., Hallsdottir, M., Sauliene, I., Bergmann, K.C., Pashley, C.H., de Weger, L., Majkowska-Wojciechowska, B., Rybnicek, O., Thibaudon, M., Gehrig, R., Bonini, M., Yankova, R., Damialis, A., Vokou, D., Gitierrez Bustillo, A.M., Hoffmann-Sommergruber, K., van Ree, R. (2014).** Geographic and temporal variations in pollen exposure across Europe. *Allergy* 69 (7), 913-923.
- Song, X., Zhang, M., Zhou, Z., Gong, W. (2011).** Ultra-high resolution crystal structure of a dimeric defensin SPE10. *FEBS Lett.* 585, 300-306.
- Suhr, M., Wicklein, D., Lepp, U., 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 (5), 390-399.
- Sun, J., Hui, X., Ying, W., Liu, D., Wang, X. (2014).** Efficacy of allergen-specific immunotherapy for peanut allergy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Allergy and Asthma Proceedings* 35 (2), 171-177.
- Swoboda, I., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Scheiner, O., Heberle-Bors, E., Vicente, O. (1996).** Bet v 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiologica Plantarum* 96, 433-438.

- Tan, B.M., Sher, M.R., Good, R.A., Bahna, S.L. (2001).** Severe food allergies by skin contact. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 86, 583-586.
- Tibbott, R., Clark, A. (2014).** Diagnosing and managing peanut allergy in children. *Practitioner* 258, (1772), 21-4, 2-3.
- Trautmann, A., Kleine-Tebbe, J. (2013).** *Allergologie in Klinik und Praxis*, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York (USA).
- Turner, P.J., Mehr, S., Sayers, R., Wong, M., Shamji, M.H., Campbell, D.E., Mills, E.N.C. (2014).** Loss of allergenic proteins during boiling explains tolerance to boiled peanut in peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134 (3), 751-753.
- Ukaji, N., Kuwabara, C., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S. (2004).** Accumulation of pathogenesis-related (PR) 10/Bet v 1 protein homologues in mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) tree during winter. *Plant Cell Environ.* 27, 1112-1121.
- Untersmayr, E., Szalai, K., Riemer, A.B., Hemmer, W., Swoboda, I., Hantusch, B., Schöll, I., Spitzauer, S., Scheiner, O., Jarisch, R., Boltz-Nitulescu, G., Jensen-Jarolim, E. (2006).** Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen. *Mol. Immunol.* 43 (9), 1454-61.
- Untersmayr, E., Jensen-Jarolim, E. (2016).** Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacology and Therapeutics* 112, 787-798.
- Vassiliou, E.K., Gonzalez, A., Garcia, C., Tadros, J.H., Chakraborty, G., Toney, J.H. (2009).** Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- α both *in vitro* and *in vivo* systems. *Lipids in Health and Disease* 8 (25). <http://www.lipidworld.com/content/8/1/25>, doi:10.1186/1476-511X-8-25.
- Vereda, A., van Hage, M., Ahlstedt, S., Ibanez, M.D., Cuesta-Herranz, J., van Odijk, J., Wickman, M. (2011).** Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 127 (3), 603-607.
- Vieths, S., Reindl, J., Müller, U., Hoffmann, A., Haustein, D. (1999).** Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 379-388.
- Vieths, S., Scheuer, S., Ballmer-Weber, B. (2002).** Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 964, 47-68.
- 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., Valenta, R. (2001).** Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. *FASEB J.* 15, 2045-2047.
- Wan, H., Winston, H.L., Soeller, C., Tovey, E.R., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Stewart, G.A., Taylor, G.W., Garrod, D.R., Cannell, M.B., Robinson, C. (1999).** Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest.* 104 (1), 123-133.

- Wan, S.B., Bi, Y.P., Shan, L., Su, L., Quan, X.Q., Zhang, H.T., Zhang, X.Q., Lu, C.X., Zhai, H.D., Xia, M. (2006).** Expressed sequence tags from an *Arachis hypogaea* seeds full length cDNA library (EE125175.1) . Unpublished.
- White, B.L., Gökce, E., Nepomuceno, A.I., Muddiman, D.C., Sanders, T.H., Davis, J.P. (2013).** Comparative Proteomic Analysis and IgE Binding Properties of Peanut Seed and Testa (Skin). *J. Agric. Food Chem.* 61, 3957-3968.
- Woodfolk, J.A., Commins, S.P., Schuyler, A.J., Erwin, E.A., Platts-Mills, T.A.E. (2015).** Allergens, sources, particles, and molecules; Why do we make IgE response? *Allergology International* 64, 295-303.
- Wu, F., Yan, M., Li, Y., Chang, S., Song, X., Zhou, Z., Gong, W. (2003).** cDNA cloning, expression, and mutagenesis of a PR-10 protein SPE-16 from seeds of *Pachyrrhizus erosus*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 312, 761-766.
- Wüthrich, B., Schindler, C., Leuenberger, P., Ackermann-Liebrich, U. (1995).** Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of switzerland (SAPALDIA study). Swiss study on air pollution and lung diseases in adults. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106, 149-156.
- Xu, T-F., Zhao, X-C., Jia, Y-T., Wei, J-Y., Wang, L., Xu, Y. (2014).** A pathogenesis related protein, VpPR-10.1, from *Vitis pseudoreticulata*: an insight of its mode of antifungal activity. *PLoS* 9 (4), e95102.
- Yin, H., Cai, N.B., Huang, X.W., Luo, B.M., Li, W.X., Zhuang, W.J. (2007).** Isolation of peanut seed-specific genes by analysis of expressed sequence tags (2007b) (EY 396019). Unpublished.
- Yu, J.W., Kagan, R., Verreault, N., Nicola, N., Joseph, L., St. Pierre, Y., Clarke, A. (2006).** Accidental ingestions in children with peanut allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 118 (2), 466-472.
- Zhou, X.J., Lu, S., Xu, Y.H., Wang, J.W., Chen, X.Y. (2002).** A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. *Plant Sci.* 162, 629-636.
- Zuidmeer-Jongejan, L., Fernandez-Rivas, M., Winter, M.G., Akkerdaas, J.H., Summers, C., Lebens, A., Knulst, A.C., Schilte, P., Briza, P., Gadermaier, G., van Ree, R. (2014).** Oil body-associated hazelnut allergens including oleosins are underrepresented in diagnostic extracts but associated with severe symptoms. *Clin. Transl. Aallergy* 4 (1), doi: 10.1186/2045-7022-4-4.

9 Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Petersen, A., Rennert, S., Kull, S., Becker, W.-M., Notbohm, H., Goldmann, T., Jappe, U. (2014). Roasting and lipid binding provide allergenic and proteolytic stability to the peanut allergen Ara h 8. *Biol. Chem.* 395 (2), 239-250.

Petersen, A., Kull, S., Rennert, S., Becker, W.-M., Krause, S., Ernst, M., Gutschmann, T., Bauer, J., Lindner, B., Jappe, U. (2015). Peanut defensins: Novel allergens isolated from lipophilic peanut extract. *J Allergy Clin Immunol.* 136 (5), 1295-1301.

Abstracts:

Maßmann, S., Riecken, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2008). Funktionelle Untersuchungen des Erdnuss-Allergens Ara h 8: Nachweis einer RNase-Aktivität. Deutscher Allergiekongress, Erfurt 2008.

Rennert, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2009). IgE-reactive contaminations of commercially available peanut agglutinin (PNA) preparations and their elimination. Congress of the European Academy of Allergology and Immunology (EAACI), Warschau 2009.

Rennert, S., Riecken, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2009). Funktionelle Untersuchungen des Erdnussallergens Ara h 8. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz 2009.

Rennert, S., Riecken, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2009). Funktionelle Untersuchungen des Erdnussallergens Ara h 8. Deutscher Allergiekongress, Berlin 2009.

Rennert, S., Krause, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2010). Interaktion von Lipiden mit dem Erdnussallergens Ara h 8. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz 2010.

Rennert, S., Krause, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2010). Interaktion von Lipiden mit dem Erdnussallergens Ara h 8. Deutscher Allergiekongress, Hannover 2010.

Rennert, S., Becker, W.-M., Jappe, U., Petersen, A. (2010). Influence of lipids on the allergenicity of the Bet v 1 homologous peanut allergen Ara h 8. Congress of the European Academy of Allergology and Immunology (EAACI) London, 2010.

Rennert, S., Krause, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2012). Lipids modify structure and digestibility of peanut allergen Ara h 8. Environmental and genetic factors in Allergy and Clinical Immunology. Proceedings of the 27th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (2012), 241-243.

Vorträge:

RNase-Aktivität des Erdnussallergens Ara h 8.
Deutscher Allergiekongress, Erfurt 2008.

Funktionelle Untersuchungen des Erdnussallergens Ara h 8.
Mainzer Allergie-Workshop, Mainz 2009.

Funktionelle Untersuchungen des Erdnussallergens Ara h 8.
Deutscher Allergiekongress, Berlin 2009.

Interaktion von Lipiden mit dem Erdnussallergen Ara h 8.
Mainzer Allergie-Workshop, Mainz 2010.

Interaktion von Lipiden mit dem Erdnussallergen Ara h 8.
Deutscher Allergiekongress, Hannover 2010.

Identifizierung eines Defensins aus der Erdnuss.
Deutscher Allergiekongress, Hannover 2010.

Poster:

Rennert, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2009). IgE-reactive contaminations of commercially available peanut agglutinin (PNA) preparations and their elimination. Congress of the European Academy of Allergology and Immunology (EAACI), Warschau 2009.

Rennert, S., Becker, W.-M., Jappe, U., Petersen, A. (2010). Influence of lipids on the allergenicity of the Bet v 1 homologous peanut allergen Ara h 8. Congress of the European Academy of Allergology and Immunology (EAACI), London 2010.

Rennert, S., Krause, S., Becker, W.-M., Petersen, A. (2010). Lipids modify structure and digestibility of peanut allergen Ara h 8. 27th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, Ischia 2010.

Preise:

Posterpreis beim 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London (2010):

Rennert, S., Becker, W.-M., Jappe, U., Petersen, A. (2010). Influence of lipids on the allergenicity of the Bet v 1 homologous peanut allergen Ara h 8.

Vortragspreis beim 22. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz (2010):

Interaktion von Lipiden mit dem Erdnussallergens Ara h 8.

Vortragspreis beim 21. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz (2009):

Funktionelle Untersuchungen des Erdnussallergens Ara h 8.

10 Danksagung

Meine Dissertation wurde im Forschungszentrum Borstel in einer Zeit des organisatorischen Umbruchs angefertigt. So wechselte die Leitung der Laborgruppe von Dr. Becker (wg. Ruhestand) an Frau Professor Dr. Uta Jappe. Dies hatte auch eine Umbenennung der Laborgruppe in Klinische und Molekulare Allergologie zur Folge. Die für die Forschung verantwortliche Abteilungsstruktur wurde zugunsten einer Straffung auf die Programmstränge "Infektiologie" und "Asthma und Allergie" übertragen. So wechselte die Verantwortlichkeit von Prof. Dr. P. Zabel auf Prof. Dr. H. Fehrenbach.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Arnd Petersen für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas, das zusammen mit Dr. W.-M. Becker entwickelt wurde. Vielen Dank für die stete Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf zahlreichen Kongressen präsentieren zu können.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Wolf-Meinhard Becker für die konstruktiven Anregungen, den Ansporn durchzuhalten und das Korrekturlesen von Manuskripten danken; insbesondere auch dafür, dass Herr Dr. Becker selbst im Ruhestand den Fortgang dieser Arbeit mit hohem Interesse weiterverfolgt hat.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Uta Jappe, welche die Fragestellung meiner Dissertation nachdrücklich klinisch konzeptionell unterstützte. Für die Bereitstellung der Seren von klinisch exzellent charakterisierten Allergie-Patienten und weiteren Probanden als Kontrolle bin ich sehr dankbar, da ohne sie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

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

Herrn Prof. Dr. Stefan Anemüller möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Gutschmann aus der Biophysik danke ich für die anregenden Diskussionen und die Durchführung der antimikrobiellen Tests.

Herrn PD Dr. Buko Lindner danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und die Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Holger Notbohm von der Universität zu Lübeck danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der CD-Spektroskopie.

Mein besonderer Dank gilt meinen netten Kollegen aus der Arbeitsgruppe Molekulare und Klinische Allergologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe beim Erlernen neuer Arbeitsmethoden. Die exzellente technische Unterstützung von Marisa Böttger und Daniela Warneke waren stets sehr hilfreich.

Den von mir betreuten Auszubildenden Markus Hartmann, Kathrin Handge, Denise Nitter und Alexander Witthöft möchte ich für die Mithilfe an meiner Arbeit danken.

Der Kanert-Stiftung gilt mein Dank für die Mitfinanzierung der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, die mich während dieser Arbeit stets unterstützt haben.

Ganz besondere und tiefe Dankbarkeit empfinde ich für meinen Mann und meine Kinder. Meinem Mann Carsten danke ich dafür, dass er immer daran festhielt, dass ich diese Arbeit fertigstellen werde. Für die vielen Stunden, die er allein unser Familienleben geregelt hat und mir stets den Rücken gestärkt und freigehalten hat, möchte ich mich ganz besonders bedanken. Meinen Kindern Lotta und Oskar bin ich unendlich dankbar für das entgegengebrachte Verständnis dafür, wenn "Mama mal wieder länger an ihrer Arbeit gesessen hat". Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft!